CAMILA DE BARROS GALLO

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES TOLL-LIKE (2, 4 E 7)
EM CÉLULAS DO SANGUE E DA MUCOSA ORAL DE PACIENTES
PORTADORES DE ULCERAÇÃO AFTOSA RECORRENTE**

São Paulo

2008

Camila de Barros Gallo

**Expressão de receptores Toll-Like (2, 4 e 7)
em células do sangue e da mucosa oral de pacientes
portadores de ulceração aftosa recorrente**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São Paulo,
para obter o título de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Diagnóstico Bucal

Orientador: Prof. Dr. Norberto Nobuo Sugaya

São Paulo

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gallo CB. Expressão de receptores Toll-Like (2, 4 e 7) em células do sangue e da mucosa oral de pacientes portadores de ulceração aftosa recorrente [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo, ____/____/2008

Banca Examinadora

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Carlos e Maria da Consolação, por tudo que fizeram e ainda fazem por mim em todos os dias de minha vida, pois não bastou ser pai e mãe. “É na educação dos filhos que se reconhecem as virtudes dos pais” (Coelho Neto).

Aos meus irmãos, Luciana e Alexandre, por uma convivência unida e pela colaboração, do meu primeiro contato com o laboratório às dúvidas com computador, e em todo o resto! “O irmão que é ajudado por seu irmão é como uma cidade forte” (Provérbio latino – Vulgata).

Ao Norberto, pela sua amizade e paciência infinita, por ter depositado grande confiança em mim, se dispor a entrar num “novo mundo” e aprender comigo. “Ser professor é apontar caminhos, mas deixar que o aluno caminhe com seus próprios pés...” (Autor desconhecido).

Aos meus queridos amigos, Ana Carola, Beatriz, Carina, Cassiano, Fabiana, Fabricia, Maria Angela, Renata e Vivian pela presença nos momentos felizes, mas principalmente pelo apoio nos mais difíceis. “A verdadeira amizade é uma força infinita, que surge em nossos caminhos quando dela precisamos” (Autor desconhecido).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Norberto Nobuo Sugaya**, pelos ensinamentos, amizade e confiança.

À minha irmã, **Luciana de Barros Gallo**, por me iniciar no laboratório de biologia molecular.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Borra** da Universidade Ibirapuera, por sua indispensável colaboração em todas as fases deste trabalho, desde sua concepção aos seus resultados.

Ao **Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes** da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, pela disposição, paciência e colaboração. Pela possibilidade de desenvolver a pesquisa no Laboratório de Patologia Molecular, com a colaboração de sua equipe.

À doutoranda **Camila Oliveira Rodini** e à já doutora **Márcia Sampaio Campos**, ambas da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, por toda ajuda e carinho.

À Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos **do Instituto de Ciências Biomédica da USP e às suas ex-alunas** Mara Rubia Marques e Michelle Tillmann Biz; ao Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata **da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e à doutoranda** Simone Sorkin Arazi, **pela possibilidade de aprendizado das técnicas de biologia molecular.**

À **Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar** do Instituto de Química da UAR e à doutoranda **Luciana Gomes**, pela possibilidade e auxílio na execução do PCR em tempo real em seu laboratório.

À enfermeira **Rosemary Aparecida Fracoli** da Clínica Odontológica da FOUSP, pela presteza e colaboração na coleta de sangue.

Aos **pacientes** e aos **voluntários** (Adriana, Bianca, Camila Rodini, Carina, Luciana, Mami, Marcelo, Norberto, Rose, Valdirene, Vivian). Sem vocês este trabalho não aconteceria.

À farmacêutica **Renata Chaves Albuquerque** do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela colaboração nos exames laboratoriais.

Ao **Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira** e ao técnico de laboratório **Douglas Nezadal de Souza** da Disciplina de Bioquímica Oral da FOUSP, pela possibilidade de utilização do espectrofotômetro.

Ao **Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Júnior** da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOUSP, pelas excelentes fotografias.

Ao **Prof. Titular Dante Antônio Migliari** da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOUSP, pelas oportunidades oferecidas.

Aos demais **Professores da Disciplina de Estomatologia Clínica e Patologia Bucal** da FOU SP, pela amizade e convivência compartilhada.

Aos **alunos e ex-alunos da pós-graduação, estagiários e monitores da Disciplina de Estomatologia Clínica**: Adriana, Alessandra, Amanda, Ana Cláudia, Ana Rosa, Ana Paula, Ana Torrenzan, André, Angelo, Bianca, Cláudia, Fábio Braga, Gabriela, Juliana, Liane, Marcelo (mineiro), Marcelo Zillo, Ophir, Rhoner, Sílvia, Valdirene. Aos **alunos e ex-alunos de pós-graduação da Disciplina de Patologia Bucal**: Aluana, Fábio Coracin, Flávia Caló, Katiúcia, Patrícia Adachi, Paulo Sérgio, Renata Acay, Tatiana Libório. E **alunos de pós-graduação de outros Departamentos** Jacob, Júlio, Rodrigo. Muito obrigada pelo carinho, amizade e os momentos agradáveis de convivência.

Às **secretárias** (Cecília, Márcia, Nina, Vera, Vilma, Sandra) e **técnicas** (Cida e Débora) do Departamento de Estomatologia da FOU SP, pela convivência e colaboração.

À **FAPESP** pelo auxílio concedido ao projeto de pesquisa.

... se antes de cada acto nosso nos puséssemos a prever todas as conseqüências dele, a pensar nelas a sério, primeiro as imediatas, depois as prováveis, depois as possíveis, depois as imagináveis, não chegaríamos sequer a mover-nos de onde o primeiro pensamento nos tivesse feito parar. Os bons e maus resultados dos nossos ditos e obras vão-se distribuindo, supõe-se que de uma forma bastante uniforme e equilibrada, por todos os dias do futuro, incluindo aqueles, infindáveis, em que já cá não estaremos para poder comprová-lo, para congratular-nos ou pedir perdão, aliás, há quem diga que isso é que é a imortalidade de que tanto se fala...

José Saramago

"O real não está nem na saída nem na chegada:
ele se impõe pra gente é no meio da travessia"
João Guimarães Rosa

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".
Fernando Pessoa

Gallo CB. Expressão de receptores Toll-Like (2, 4 e 7) em células do sangue e da mucosa oral de pacientes portadores de ulceração aftosa recorrente [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

A ulceração aftosa recorrente (UAR) é uma das lesões mais freqüentes da cavidade bucal, comprometendo a qualidade de vida de seus portadores muitas vezes de maneira importante. Embora sua etiopatogenia ainda não esteja esclarecida, vários fatores têm sido consistentemente relacionados ao surgimento da UAR, especialmente alterações imunológicas e genéticas, conduzindo grande parte da investigação científica para esses campos do conhecimento. Os receptores Toll-Like (TLR) reconhecem produtos moleculares derivados, principalmente, de microrganismos, desencadeando a resposta inflamatória protetora. Entretanto, anormalidades em sua função podem estar relacionadas ao desenvolvimento de doenças, pela ativação aberrante do sistema imunológico. A proposta desta investigação foi a de se avaliar a expressão dos receptores TLR-2, TLR-4 e TLR-7 através do RT-PCR em tempo real, a partir de amostras de sangue periférico e da mucosa bucal de população portadora de UAR e indivíduos controles sadios. Cinco pacientes UAR e quatro controles voluntários compuseram a casuística estudada, sendo submetidos à biópsia de lesões de UAR ou de mucosa de revestimento sadia. Na mesma sessão os pacientes tiveram sangue coletado por venopunção. Posteriormente, ambos os materiais foram submetidos aos procedimentos laboratoriais de extração do RNA e análise de expressão dos receptores TLR por meio da técnica de RT-PCR real time. Não houve diferença significativa na

expressão destes receptores entre portadores de UAR e controles sadios, nos dois tipos de amostra. Estudos mais aprofundados são necessários a fim de se verificar a real participação destes receptores na UAR, visto que não há outros estudos nesta área e a amostra analisada foi pequena.

Palavras-Chave: ulceração aftosa recorrente, receptores Toll-Like, RT-PCR em tempo real

Gallo CB. Toll-like receptors expression in peripheral blood and oral mucosa of recurrent aphthous stomatitis [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

Recurrent aphthous stomatitis (RAS) is one of the most common oral mucosal diseases which may cause serious impairment on patient's quality of life. Despite its still unknown pathogenesis, several factors have been consistently associated with RAS, especially genetic and immunological changes, which has driven a lot of research effort towards these issues. Toll-Like receptors (TLR) recognize molecular products, mainly derived from microorganisms, triggering the inflammatory response. However, abnormalities in their function may give rise to the development of diseases, through abnormal activation of the immune system. The purpose of this investigation was to evaluate the expression of receptors TLR-2, TLR-4 and TLR-7 in peripheral blood and tissue samples of RAS and healthy controls, through real time RT-PCR technique. Five UAR patients and four healthy volunteers with no RAS history composed the casuistic and were submitted to biopsy of their UAR lesions or normal oral mucosa. On that same session patients had a blood sample taken through venopuncture. Both samples (tissue and blood) were, afterwards, submitted to lab procedures of RNA extraction and toll-like receptors expression through real time RT-PCR. There were no significant differences in the expression of these receptors between RAS and healthy controls in the two sample types. Further studies are necessary to allow sound conclusions on the actual participation of these

receptors in RAS, since the sample followed were small and there are no similar studies published.

Keywords: recurrent aphthous stomatitis, Toll-Like receptors, real time RT-PCR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Esquema da localização da biópsia na lesão ulcerada com <i>punch</i> de 5 mm	61
Figura 4.2 - Esquema ilustrativo das etapas do processamento do sangue com Ficoll-Paque	64
Figura 4.3 - A: maceração em nitrogênio líquido do fragmento de tecido, B: aspecto após maceração e adição do reagente Trizol	65
Figura 4.4 - Gel de integridade do RNA	68
Figura 5.1 - Corte histológico da UAR (10x), evidenciando processo inflamatório crônico inespecífico com ulceração.....	74
Figura 5.2 - Exemplo de curva de dissociação adequada (extraída do programa do 7300 Real-Time PCR System – Applied Biosystems).....	75
Figura 5.3 - Exemplo de curvas logarítmicas de amplificação: log da fluorescência X números de ciclos (amostras: A3.1, A3.2, C2.1, C2.2; iniciador: β -actina).....	76
Figura 5.4 - Delimitação da faixa em que as curvas de amplificação das amostras analisadas se apresentam lineares.....	77
Figura 5.5 - Gráfico da análise da expressão dos TLR, normalizada pelo gene constitutivo β -actina, nas amostras de sangue e de tecido do grupo UAR em relação ao grupo controle.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Valores obtidos a partir da leitura por espectrofotômetro e do cálculo da quantificação do RNA das amostras processadas	68
Tabela 4.2 - Iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real	69
Tabela 5.1 - Caracterização dos portadores de UAR em acompanhamento no Ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOU SP	73

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Epidemiologia.....	20
2.2 Características clínicas.....	21
2.3 Características histológicas.....	23
2.4 Diagnóstico	24
2.5 Etiologia	25
2.5.1 Fatores relacionados	25
2.5.1.1 <i>alterações hematológicas ligadas a deficiências nutricionais</i>	<i>25</i>
2.5.1.2 <i>trauma</i>	<i>28</i>
2.5.1.3 <i>ansiedade e estresse</i>	<i>28</i>
2.5.1.4 <i>distúrbios hormonais e ciclo menstrual.....</i>	<i>30</i>
2.5.1.5 <i>hipersensibilidade a alimentos ou outras substâncias.....</i>	<i>31</i>
2.5.1.6 <i>tabagismo e abandono do hábito de fumar</i>	<i>33</i>
2.5.1.7 <i>agentes microbianos</i>	<i>34</i>
2.5.1.8 <i>outros fatores</i>	<i>36</i>
2.5.2 Envolvimento genético	37
2.5.3 Envolvimento imunológico	40
2.5.3.1 <i>subpopulação celular.....</i>	<i>41</i>
2.5.3.2 <i>citocinas</i>	<i>45</i>
2.5.3.3 <i>receptores toll-like</i>	<i>47</i>
2.6 Tratamento	49
2.7 Metodologia utilizada no estudo da expressão dos receptores Toll-Like.....	53
2.7.1 Aspectos do processamento das amostras de sangue periférico	53
2.7.2 RT-PCR em tempo real.....	55

3 PROPOSIÇÃO	57
4 MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1 Casuística	58
4.1.1 Critérios de inclusão do Grupo de Estudo	59
4.1.2 Critérios de inclusão do Grupo Controle	59
4.1.3 Critérios de exclusão para ambos os grupos	59
4.2 Obtenção das amostras	60
4.2.1 Biópsia incisional	60
4.2.1.1 grupo de estudo	61
4.2.1.2 grupo controle	62
4.2.2 Coleta de sangue periférico	62
4.3 Experimentos	63
4.3.1 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	63
4.3.2 Extração do RNA total	65
4.3.2.1 tecido biopsiado	65
4.3.2.2 células sangüíneas isoladas	67
4.3.2.3 quantificação do RNA e verificação de sua qualidade	67
4.3.3 RT-PCR em tempo real	69
4.3.3.1 iniciadores	69
4.3.3.2 tratamento das amostras de RNA com DNase	70
4.3.3.3 reação de transcrição reversa – síntese do cDNA	70
4.3.3.4 reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real	71
4.4 Avaliação dos resultados e análise estatística	72
5 RESULTADOS	73
5.1 Característica gerais dos pacientes	73
5.2 Avaliação da expressão dos receptores Toll-Like	75
6 DISCUSSÃO	79
6.1 Característica gerais da população portadora de UAR	79
6.2 Metodologia utilizada	83
6.3 Expressão dos receptores Toll-Like	85

7 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICES	105
ANEXOS.....	109

1 INTRODUÇÃO

A ulceração aftosa recorrente (UAR) é a lesão ulcerativa mais comumente encontrada na cavidade bucal. A manifestação geralmente se inicia na adolescência, mas é na idade adulta, fase de crescimento profissional, que os afetados enfrentam períodos de maior desconforto e prejuízo à sua qualidade de vida.

Apesar da vasta quantidade de trabalhos, publicada na literatura mundial, voltada à investigação dos vários aspectos relacionados à expressão das ulcerações aftosas recorrentes orais, ainda não foi esclarecida definitivamente sua causa e, por conseqüência, ainda inexistente protocolo de tratamento satisfatório para controlar as manifestações dessa doença.

A expressão das UAR parece depender de um traço genético, conforme sugerem investigações epidemiológicas já empreendidas, apesar de não estabelecerem, de forma objetiva, quais genes seriam responsáveis por tal herança.

O envolvimento imunológico é indubitável e tem sido objeto de investigação há várias décadas. Os mecanismos envolvidos e a seqüência de eventos carecem de esclarecimento, entretanto todas as terapêuticas, empíricas e sintomáticas, empregadas atualmente com algum sucesso, baseiam-se na utilização de imunossuppressores, locais ou sistêmicos.

As modernas técnicas de pesquisa em biologia molecular abriram novas perspectivas de investigação e constituem um caminho promissor rumo ao esclarecimento dessa condição tão comum e, ainda, tão desconfortavelmente obscura.

Uma pesquisa publicada recentemente (BORRA et al., 2004), utilizando técnica de microarray, evidenciou a expressão diferencial de um grupo de genes associados à reação inflamatória tipo Th1 em pool de amostras de tecido de indivíduos com UAR em relação aos controle. O predomínio da expressão deste tipo de resposta inflamatória e deficiências nos mecanismos de supressão levariam a uma excessiva ativação da resposta imunológica contra antígenos, ainda não definidos, em portadores de UAR.

No campo das pesquisas moleculares, receptores Toll-Like, responsáveis pelo reconhecimento de diferentes classes de microrganismos e por desencadear a resposta imunológica inata, com a conseqüente produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas (PASARE; MEDZHITOV, 2005), podem estar relacionados a algumas doenças, tais como a Doença de Crohn, colite ulcerativa e enterocolite necrotizante (GRIBAR et al., 2008; SHIH; TARGAN, 2008).

O tratamento, em ratos, com o agonista do receptor TLR-9 promove melhora na severidade da colite ulcerativa induzida e espontânea. Quando administrado previamente a indução do desenvolvimento da doença, previne-se o aparecimento de lesões e há redução na produção e liberação de citocinas inflamatórias (GRIBAR et al., 2008; SHIH; TARGAN, 2008). Desta forma esclarecimentos das funções destes receptores na UAR pode levar ao desenvolvimento de novas terapêuticas que bloqueariam a seqüência de eventos inflamatórios responsáveis pela expressão da doença.

Esses fatos apontados por investigações recentes e como conseqüência a uma evolução natural da linha de pesquisa em UAR mantida pela Disciplina de Estomatologia Clínica da FOUSP, suscitaram o desenvolvimento de pesquisa voltada à análise da expressão de receptores Toll-Like em portadores de UAR.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O termo afta (do grego: *aphthae*, úlcera) foi primeiramente empregado por Hipócrates (460 a 370 a.C.) para designar desordens bucais em geral. A descrição clínica da ulceração aftosa recorrente (UAR) propriamente dita, é atribuída a von Mikulicz e Kümmel, e data de 1888 (SHIP, 1996).

A UAR é caracterizada pelo surgimento de lesões ulcerativas, únicas ou múltiplas, em mucosa oral geralmente com história de episódios prévios, intervalo variável de recorrência e cura espontânea. Podem ser clinicamente distinguidas de infecções virais primárias e secundárias, infecções bacterianas, doenças dermatológicas (líquen plano oral, pênfigo vulgar e penfigóide benigno de mucosa), traumas (contusão, laceração, queimadura); desde que os tecidos adjacentes apresentam aparência saudável e o indivíduo afetado não apresenta qualquer alteração sistêmica relacionada ao episódio (KOYBASI et al., 2006; MILLER; SHIP; RAM, 1977; SHIP, 1972).

É a lesão ulcerativa mais comumente observada na cavidade bucal humana, e a presença das úlceras bucais afeta negativamente a qualidade de vida dos indivíduos afetados. A dor e o desconforto causados por este tipo de lesão propiciam diversos danos às funções da cavidade bucal – alimentação, deglutição e fala – dificuldade de relacionamento, auto-imagem e percepção negativa, reduzindo a qualidade de vida (MUMCU et al., 2007).

2.1 Epidemiologia

A UAR é uma doença de distribuição mundial e sua prevalência, de acordo com estudos epidemiológicos, varia entre 5% e 25% na população em geral (SHIP, 1996), mas dependendo do grupo examinado esta prevalência pode chegar a 66% (SHIP, 1972).

Grupos de estudantes de enfermagem, odontologia e medicina apresentam alta prevalência de UAR (50 a 60%), e os indivíduos afetados apresentam alta frequência de UAR principalmente durante o período da graduação (MILLER; SHIP; RAM, 1977; SHIP, 1972). Além desta elevada prevalência de UAR, Miller, Ship e Ram (1977) observaram redução na frequência dos episódios de UAR após a conclusão do curso acadêmico e relacionaram a intensificação da frequência de UAR ao estilo de vida dos estudantes.

Não há predileção por sexo, condição socioeconômica ou raça (CASIGLIA, 2002). Alguns autores referem uma discreta predominância no sexo feminino (FAHMY, 1976; MILLER; SHIP; RAM, 1977), aumento na incidência e severidade de UAR em indivíduos de classes socioeconômicas mais elevadas (SHIP, 1972), e maior frequência em indivíduos da raça branca na população adulta dos EUA (RIVERA-HIDALGO; SHULMAN; BEACH, 2004).

A manifestação geralmente inicia-se durante a juventude, antes dos trinta anos de idade – 80% dos pacientes – com tendência a diminuir sua frequência e severidade ao longo dos anos (CASIGLIA, 2002; SCULLY; GORSKY; LOZADANUR, 2003; SHIP, 1996). Cerca de 10% dos casos de UAR tem início antes dos 10 anos de idade, e estima-se que um terço das crianças em idade escolar tenha

histórico de UAR, sendo esta a lesão mais prevalente em crianças (FIELD; BROOKES; TYLDESLEY, 1992; RIOBOO-CRESPO; PLANELLS-DEL POZO; RIOBOO-GARCIA, 2005).

2.2 Características clínicas

São reconhecidas três formas clínicas distintas: afta menor, maior e herpetiforme. A afta menor, também conhecida como afta de Mikulicz, é a forma mais comum e ocorre em aproximadamente 70% dos pacientes portadores de UAR. Apresenta forma circular ou ovalada, borda bem definida, centro necrótico com pseudomembrana amarelo-acinzentada, halo eritematoso circundando a lesão, medindo até um centímetro em seu maior diâmetro. São muito dolorosas e apresentam cura espontânea em 10 a 14 dias, ocorrendo preferencialmente em mucosa não queratinizada e em número variável, comumente de uma a cinco lesões simultâneas.

As outras formas de afta são menos comuns, sendo que o tipo maior, também conhecida como doença de Sutton ou periadenite mucosa, tem características mais severas, pois apresenta tamanho maior que um centímetro, sendo mais profunda e dolorosa. Sua resolução pode demorar semanas ou até mesmo meses, debilitando o paciente pela dificuldade de alimentação adequada. Ocorre normalmente em lábios, língua, palato mole e fauces palatinas, provocando dor, disfagia e reparação com formação de cicatriz. Esta variante da UAR é comum em pacientes HIV positivos. A última forma consiste na chamada herpetiforme, em que acontecem numerosas

úlceras, de 10 a 100, com tamanho aproximado de três milímetros, que podem se coalescer e manifestar úlceras maiores. Frequentemente confunde-se este tipo de apresentação com as causadas pelo vírus herpes (CASIGLIA, 2002; SCULLY; GORSKY; LOZADA-NUR, 2003; SCULLY; FELIX, 2005; SHIP, 1996; SHIP et al., 2000; WOO; SONIS, 1996).

O curso clínico de um episódio típico de UAR foi didaticamente dividido em quatro estágios: estágio premonitório ou prodromico com duração de 24 horas, correspondente à sensação de queimação na área em que a úlcera irá se desenvolver, porém sem sinais clínicos; estágio pré-ulcerativo, 18 a 72 horas precedentes à manifestação clínica, em que se observa a presença de uma pequena mácula avermelhada, um discreto aumento de volume e dor; estágio ulcerativo, presença de úlcera rasa e bem delimitada, que pode aumentar de tamanho e profundidade nos primeiros cinco dias, bastante sintomático; e estágio cicatricial que pode levar de 4 a 35 dias, geralmente sem formação de cicatriz, exceto em casos de úlceras profundas e persistentes. O tempo de cicatrização de uma UAR é usualmente três vezes maior que o da úlcera traumática, e quando a UAR é removida cirurgicamente a cicatrização é normalizada, pois o processo é abortado (CASIGLIA, 2002; STANLEY, 1972).

A severidade da doença foi dividida em três categorias, definidas principalmente a partir da frequência das recorrências: quadro leve, compreende de um a cinco episódios anuais; moderado, seis a onze episódios anuais e severo, doze ou mais episódios anuais, manifestações com lesões múltiplas ou lesões tipo major, surtos sem períodos de alívio (MILLER; SHIP; RAM, 1977; SHIP, 1972).

2.3 Características histológicas

A UAR não apresenta um quadro histológico característico, sendo representada por úlcera com infiltrado inflamatório crônico e inespecífico.

No início da lesão de UAR (estágio pré-ulcerativo) observa-se a presença de infiltrado inflamatório mononuclear na lâmina própria e agregados perivasculares nos tecidos mais profundos. Com a progressão da lesão há o aumento do infiltrado inflamatório, principalmente na região epitelial; edema, acantólise e degeneração das células epiteliais. Há, então, a formação da úlcera (estágio ulcerativo) com presença de infiltrado inflamatório neutrofílico junto ao exudato fibrinopurulento e ao epitélio adjacente. A membrana fibrinopurulenta é, aos poucos, substituída por tecido de granulação (fase de reparação) com numerosos capilares imaturos. Há proliferação das células epiteliais marginais, até a reestruturação total do epitélio, diminuição gradual do infiltrado inflamatório, porém o acúmulo destas células na região perivascular permanece mesmo após a cicatrização (SAVAGE; SEYMOUR; KRUEGER, 1985; STANLEY, 1972).

Através de análise imunoistoquímica verifica-se que a maioria destas células é composta por linfócitos (CD3 positivo) nos três estágios da UAR (pré-ulcerativo, ulcerativo e reparação), sendo que, no estágio pré-ulcerativo e de reparação, as células predominantes são os linfócitos T CD4+, enquanto os linfócitos T CD8+ são ocasionais e isolados. E no estágio ulcerativo há diminuição no número de linfócitos T CD4+ e predomínio de CD8+ (SAVAGE; SEYMOUR; KRUEGER, 1985).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico é inteiramente baseado em critérios clínicos, desde que não existem exames laboratoriais específicos para confirmação da doença (NATAH et al., 2004; SCULLY; FELIX, 2005). No entanto, a biópsia pode ser utilizada para afastar outras doenças ulcerativas, tais como: herpes recorrente, varicela-zoster, herpangina, doença das mãos, pés e boca, eritema multiforme, líquen plano, penfigóide benigno de mucosa e pênfigo vulgar (SHIP et al., 2000; VINCENT; LILLY, 1992).

Deve-se investigar a possível relação entre as úlceras bucais e algum distúrbio sistêmico, através de adequada anamnese e análise da história médica do paciente. Algumas desordens sistêmicas podem apresentar a UAR como parte de sua manifestação, a exemplo: lupus eritematoso, colite ulcerativa, Doença de Crohn, Doença de Behçet, Síndrome de Reiter, AIDS, neutropenia cíclica (WOO; SONIS, 1996). Além dessas possibilidades, a utilização de certos medicamentos, como antiinflamatórios não esteroidais e nicorandil, pode produzir lesões semelhantes clinicamente às UAR, porém sem a periodicidade de recorrência (BOULINGUEZ et al., 2000; JURGE et al., 2006; SHOTTS et al., 1999).

2.5 Etiologia

Apesar de a UAR constituir uma condição descrita desde a antiguidade, com prevalência relevante na população mundial, sua etiologia permanece ainda desconhecida.

2.5.1 Fatores relacionados

Estudos longitudinais buscam identificar fatores desencadeantes ou agravantes da UAR através de associações entre períodos de exacerbação ou remissão da UAR e as características do estado de saúde e comportamento em indivíduos susceptíveis (SHIP, 1972). Desta forma muitos fatores foram identificados e parecem contribuir para o surgimento das UAR, tais como:

2.5.1.1 alterações hematológicas ligadas a deficiências nutricionais

A alteração hematológica na UAR é um assunto controverso na literatura, sua relação na etiopatogenia é questionada, principalmente pela diferença nos resultados dos diversos estudos e o fato da terapia de reposição não provocar

grande impacto no quadro ulcerativo dos pacientes (PORTER; SCULLY; FLINT, 1988).

Porter, Scully e Flint (1988) verificaram, em estudo caso-controle, diferença significativa em relação à deficiência de ferritina entre o grupo UAR (11,6%) e o grupo controle, portador de outras doenças bucais não ulcerativas (4,9%). Entretanto, não observaram casos de anemia e as dosagens de vitamina B12 e folato foram semelhantes entre os grupos, sendo que 3,2% dos pacientes com UAR apresentavam deficiência destes componentes.

A deficiência de vitamina B12 é mais frequentemente observada em indivíduos portadores de anemia perniciosa, doença que apresenta maior prevalência em países da Europa em relação aos EUA. Verificou-se que todos os casos de deficiência de vitamina B12, nos pacientes com UAR estudados, apresentavam alterações no hemograma, mais frequentemente o aumento dos valores de volume corpuscular médio (WRAY et al., 1978). Outros estudos, entretanto, verificam níveis diminuídos desta vitamina em cerca de 30% dos pacientes UAR, sem impacto nos valores do hemograma e não relacionados à anemia megaloblástica (BUBIROVA, 2007; KOYBASI et al., 2006).

Cerca de 30% dos 60 pacientes com UAR, sem alterações no hemograma e nos níveis de ferro, folato e vitamina B12, apresentavam deficiência de outras vitaminas do complexo B (B1, B2, B6). A reposição destas proporcionou redução significativa na frequência das úlceras (NOLAN et al., 1991a).

Olson et al. (1982) verificaram em estudo realizado na Califórnia (EUA), baixa prevalência de anemia nos pacientes UAR, semelhante a grupo controle. Os valores para vitamina B12 e folato foram normais, conforme os valores de referência, para ambos os grupos. Ausência de diferença significativa em relação à deficiência de

ferro e à saturação da transferrina. Apenas três pacientes com UAR apresentaram deficiência de ferro sem alteração no hemograma. Normalizou-se o déficit com a terapia de reposição, porém, sem impacto no quadro da UAR.

É improvável que a deficiência de vitamina B12 e folato tenham algum impacto na patogênese da UAR, devido a sua baixa frequência mesmo em estudos de larga escala. Entretanto, a deficiência de ferro não deve ser ignorada, pois parece ser o achado mais comum em portadores de UAR (entre 10 e 30%). Contudo, esta deficiência não é específica para a UAR, na medida em que também é identificada em pacientes com outras doenças bucais ulcerativas, o que sugere que seja secundária à ulceração bucal (CHALLACOMBE; BARKHAN; LEHNER, 1977).

A relação custo-benefício da investigação hematológica em pacientes UAR é bastante controversa. Alguns autores recomendam a dosagem de derivados da vitamina B, ferro e frações, em todos os pacientes portadores de UAR, desde que estas deficiências podem estar presentes sem provocar alterações no hemograma, além de alguns estudos referirem melhora com a terapia de reposição (Challacombe; Barkhan; Lehner, 1977; KOYBASI et al., 2006; NOLAN et al., 1991a; PORTER; SCULLY; FLINT, 1988; WRAY et al., 1978). Para outros não há necessidade da realização de tais testes bioquímicos, sendo suficiente a solicitação do hemograma completo (OLSON et al., 1982).

2.5.1.2 trauma

Existe predisposição para o desenvolvimento de novas lesões em locais de trauma em portadores de UAR (SCULLY; GORSKY; LOZADA-NUR, 2003; WOO; SONIS, 1996).

No estudo de Wray, Graykowski e Notkins (1981) foram realizadas punções com agulha de sutura e hipodérmica na mucosa bucal sem lesão de 30 pacientes UAR e 15 controles saudáveis. Estes pacientes foram monitorados nos sete primeiros dias para a verificação do desenvolvimento de úlceras. Constatou-se a indução de 26 lesões em 13 pacientes portadores de UAR e nenhuma lesão no grupo controle. Além disso, os autores concluíram que as úlceras induzidas mecanicamente eram clinicamente indistinguíveis das UAR de instalação espontânea, exceto pelo fato de que as lesões eram geralmente menores e cicatrizavam mais rapidamente.

2.5.1.3 ansiedade e estresse

O estresse tem sido apontado por alguns autores como um importante componente no surgimento de lesões de afta em pacientes predispostos (KAUFMAN, 1976; LARATO, 1972; SUGAYA et al., 2006).

Desordens psicológicas agudas, como o enfrentamento de situações de estresse, estão relacionadas ao desenvolvimento das lesões em indivíduos

predispostos a UAR (CHIAPPELLI; CAJULIS, 2004; SOTO-ARAYA; ALCAYAGA; ESGUEP, 2004).

McCartan, Lamey e Wallace (1996) mensuraram o nível de ansiedade, através da Escala de Ansiedade e Depressão (HAD) e o nível de cortisol salivar, através de radioimunoensaio, em dois grupos de pacientes UAR. O primeiro grupo era composto por indivíduos que apresentavam aftas persistentes aos tratamentos propostos e o segundo, por indivíduos que apresentaram alívio no quadro de UAR após o tratamento das deficiências hematológicas que apresentavam. Verificou-se diferença significativa no nível médio de cortisol salivar, mais elevado no primeiro grupo em relação ao segundo, assim como nos valores na escala HAD.

Resultados semelhantes foram encontrados por Albanidou-Farmaki et al. (2008) na correlação entre o nível de cortisol, salivar e sérico, e ansiedade, que se apresentaram mais elevados em portadores de UAR em relação a indivíduos saudáveis.

Desta forma, a ansiedade estaria relacionada ao surgimento das lesões em indivíduos que não apresentam uma causa orgânica (deficiências nutricionais), apesar deste mecanismo ainda não ter sido elucidado. Há especulações de que o estresse e a ansiedade levam o indivíduo a hábitos parafuncionais, como morder lábios ou bochechas. Este trauma físico poderia propiciar o início do processo ulcerativo em indivíduos suscetíveis (MCCARTAN; LAMEY; WALLACE, 1996) ou, ainda, que o estresse agudo, ao induzir o aumento do recrutamento de linfócitos em locais de inflamação, via ativação de receptores adrenérgicos, facilitaria o desencadeamento do quadro ulcerativo (REDWINE et al., 2003).

Estudo preliminar dos efeitos do relaxamento/treinamento imaginário em portadores de UAR verificou, após 12 sessões de tratamento, uma significativa

diminuição da frequência de úlceras. A intervenção pareceu apresentar influência sobre a dor por meio da redução do número de úlceras, e não diretamente pela alteração da experiência da dor em si (ANDREWS; HALL, 1990).

Entretanto, no estudo de Pedersen (1989), não foi observada associação entre o estresse psicológico e as recorrências de UAR, na avaliação dos pacientes nos estágios ativo e inativo da doença, por meio de preenchimento de questionário desenvolvido por Holmes & Rahe (SRRS) e de escala visual analógica, levando-se em consideração o nível de estresse da semana. Mesmo nos casos em que os indivíduos relatavam subjetivamente a relação positiva entre o fator emocional e o surgimento de lesões.

As conseqüências do estresse fazem parte de um processo dinâmico e multifacetado, em que as respostas não são uniformes nem mesmo em um mesmo indivíduo (CHIAPPELLI; CAJULIS, 2004). Isto poderia explicar o porquê durante alguns períodos de estresse o paciente não desenvolve as lesões.

2.5.1.4 distúrbios hormonais e ciclo menstrual

Muitos estudos apontam para uma maior prevalência da UAR em mulheres, e este achado pode estar relacionado com a possibilidade de que a UAR seja influenciada pelas variações hormonais femininas. Algumas mulheres apresentam correlação entre o surgimento das úlceras bucais e o ciclo menstrual, principalmente na fase lútea do ciclo. Outras apresentam remissão das úlceras durante o período da

gravidez e exacerbação durante o puerpério, devido às diferentes variações hormonais nesses períodos (FERGUSON; CARTER; BOYLE, 1984).

Entretanto, na ampla revisão sistemática da literatura sobre o tema, realizada por McCartan e Sullivan (1992), não foi possível estabelecer associações entre UAR e o período menstrual, gravidez ou menopausa. Nos estudos clínicos da utilização de hormônios ovarianos no tratamento da UAR não foi demonstrado nenhum efeito terapêutico.

Apesar de esta relação ser comumente citada, há necessidade de um maior número de estudos para o estabelecimento ou não desta relação (CASIGLIA, 2002; SCULLY, GORSKY, LOZADA-NUR, 2003).

2.5.1.5 hipersensibilidade a alimentos ou outras substâncias

A hipersensibilidade pode estar envolvida na UAR, na medida em que a avaliação de pacientes com alergia demonstrou incidência de UAR em 30 a 56% desses indivíduos (CASIGLIA, 2002).

Especula-se que certos elementos presentes em alguns alimentos, tais como leite de vaca, queijos, glúten, castanhas, chocolate, tomate, morango, corantes alimentícios e conservantes; possam atuar como agentes alergênicos e propiciar os surtos de UAR. Anticorpos contra leite de vaca e frações proteicas do glúten foram demonstradas, e a dieta restringindo esses alimentos pode colaborar com a redução de 25 a 75% do número de lesões (WOO; SONIS, 1996).

Nolan et al. (1991b) verificaram através de testes epicutâneos de bateria de agentes flavorizantes, óleos essenciais e conservantes de alimentos em 21 indivíduos, sem quaisquer alterações hematológicas, que 20 destes apresentaram teste positivo para um ou mais dos alérgenos, sendo as principais substâncias o ácido benzóico e o cinamaldeído, um conservante e um agente flavorizante respectivamente. Estes indivíduos foram, então, orientados a uma dieta que excluía estas substâncias. Durante o acompanhamento, 38% destes pacientes não apresentaram mais lesões UAR, 47% tiveram uma melhora de 80% do quadro e 14% não experimentaram nenhuma mudança.

Eversole, Shopper e Chambers (1982), investigaram pacientes que relacionaram alguns alimentos (castanhas, tomates e morangos) ao surgimento de UAR. Submeteram os indivíduos a esses alimentos e os examinaram após 24 e 72 horas para verificação do surgimento de novas lesões. Não se observou diferença significativa, na prevalência de lesões, com outro grupo de indivíduos portadores de UAR que não fez uso destes alimentos.

Alguns estudos apontam que o detergente encontrado na grande maioria dos dentífricos, o lauril sulfato de sódio, poderia facilitar a ulceração em pacientes predispostos à UAR pela desnaturação da camada de mucina que recobre o epitélio, que ficaria exposto à ação de outros fatores etiológicos (HERLOFSON; BARKVOLL, 1994). Não existe um consenso sobre esta relação, mas devido à facilidade de se encontrar o produto sem o detergente, o mesmo deveria ser indicado para estes pacientes (CASIGLIA, 2002).

McCullough, Abdel-Hafeth e Scully (2007) também não verificaram correlação entre o diagnóstico de UAR e hipersensibilidade a medicações ou alimentos, supondo-se que não apresentam papel importante na etiologia da UAR.

Constataram correlação negativa da incidência de UAR e a amamentação materna. Esta hipótese baseia-se no fato de que o indivíduo amamentado com leite materno desenvolve os mecanismos de tolerância oral a antígenos comuns durante a primeira infância, evitando reações imunológicas aberrantes, como a UAR, no indivíduo adulto.

2.5.1.6 tabagismo e abandono do hábito de fumar

Existe uma correlação negativa entre o tabagismo e a UAR, demonstrada por estudos epidemiológicos (RIVERA-HIDALGO; SHULMAN; BEACH, 2004; SHAPIRO; OLSON; CHELLEMI, 1970; TUZUN et al, 2000). O estudo de Atkin, Xu e Thornhill (2002) investigou o nível plasmático da cotinina, indicador confiável de uso de tabaco, desde que se trata de um metabólito da nicotina que apresenta longa meia-vida na circulação sanguínea. Apenas 2% da população de pacientes com UAR são tabagistas, enquanto se estima que 26% da população em geral apresentam este hábito.

Geralmente atribui-se este efeito à hiperqueratinização da mucosa bucal proporcionada pelo fumo, mas estudos demonstram que o uso do tabaco sem fumaça (utilização do tabaco aspirado, aplicado à mucosa e/ou mascado) também apresenta efeito “protetor” em relação à predisposição à UAR (GRADY et al., 1992). O que corrobora com a hipótese de que agentes presentes no fumo, como a nicotina, quando absorvidos sistemicamente promoveriam este efeito. Desde que a nicotina pode afetar direta e indiretamente a resposta imunológica, seja pela

ativação de receptores em macrófagos responsáveis pela diminuição de citocinas pró-inflamatórias, ou pela ativação central da produção de esteróides endógenos (RIVERA-HIDALGO; SHULMAN; BEACH, 2004). Além disso, existem relatos de que a utilização de adesivos ou tabletes de mascar contendo nicotina apresentam algum efeito terapêutico na UAR (BITTOUN, 1991; SCHEID; BOHADANA; MARTINET, 2000).

A cessação deste hábito parece precipitar ou exacerbar a UAR (JURGE et al., 2006). No estudo de Marakoglu et al. (2007) envolvendo 90 indivíduos tabagistas, observou-se prevalência progressiva de UAR em relação ao período sem utilização de tabaco, sendo a UAR uma complicação da interrupção do tabagismo. A frequência das lesões também se mostrou significativamente inferior naqueles que faziam uso de tabletes de mascar contendo nicotina.

2.5.1.7 agentes microbianos

Por muito tempo cogitou-se a participação de agentes microbianos no surgimento da UAR. Não há evidências que demonstrem relação da UAR com os vírus do herpes simples 1 e 2, herpes humano 6 e 7, varicela-zooster, Epstein-Barr ou citomegalovírus, através de avaliação da presença destes nas células da mucosa bucal e sangue com a utilização da reação em cadeia da polimerase. A detecção de DNA proveniente destes vírus parece representar derramamento viral normal (BRICE et al., 2000), embora existam relatos da detecção de adenovírus (SALLAY et

al., 1973¹, apud EVERSOLE; SHOPPER; CHAMBERS, 1982), Epstein-bar e citomegalovírus em lesões pré-ulcerativas de UAR (SUN et al., 1996, 1998).

Procedimentos de cultura bacteriana permitiram verificar correlação entre ulcerações bucais em pacientes imunossuprimidos pelo HIV e maior ocorrência de enterobactérias, mas a mesma relação não foi observada na UAR (SUGAYA; BIRMAN; COSTA, 1995). Também não se verificou a relação do *Streptococcus oralis* e a UAR, por meio de técnicas de PCR em amostras provenientes de biópsias de lesões de UAR (RIGGIO et al, 2000a).

Apesar da inexistência (FRITSCHER et al., 2004; VICTORIA et al., 2003) ou pequena quantidade (RIGGIO et al., 2000b) da bactéria *Helicobacter pylori* na lesão de UAR ou na mucosa bucal dos indivíduos afetados, alguns estudos que detectaram o *Helicobacter pylori*, através de imunoglobulinas presentes no sangue ou saliva ou através de biópsia gástrica, e fizeram o tratamento de erradicação desta bactéria nos casos positivos, obtiveram redução na recorrência da UAR (ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2005; KARACA et al., 2008).

As modernas técnicas de biologia molecular permitiram uma melhor identificação da diversidade de microrganismos sem a utilização de técnicas de cultura, evidenciando que a microbiota, em pool de amostras de pacientes UAR, além de apresentar uma maior diversidade bacteriana, diverge da encontrada nos controles saudáveis, principalmente em relação ao gênero *Prevotella sp.* A utilização destes métodos permite aprofundamento dos estudos da participação microbiana na etiologia das UAR (MARCHINI et al., 2007).

Até o momento, os esforços para identificar a participação microbiana na UAR falharam. Entretanto, existe a possibilidade da ulceração oral ser resultado da

¹ Sallay K, Kulcsar G, Nasz I, Dan P, Geck P. Adenovirus isolation from recurrent oral ulcers. J Periodontol. 1973 Nov;44(11):712-4.

reação cruzada de um derivado de proteína de choque térmico, proveniente de bactérias que comumente colonizam a mucosa bucal (peptídeo 91-105, HSP 65-60 kDa), uma vez que existe um aumento de anticorpos contra proteínas HSP no soro de pacientes portadores de UAR. Estas proteínas estimulam, através das células de Langerhans, a indução da diferenciação de clones de células T auto-reativas ao peptídeo 116-130, homólogo humano. Isto acontece devido ao alto grau de conservação das HSP entre as espécies, propiciando as alterações imunológicas contra as proteínas epiteliais do próprio indivíduo (HASAN et al., 1995, 2002).

2.5.1.8 outros fatores

O desequilíbrio dos compostos oxidantes e antioxidantes do organismo, proporcionando o acúmulo de radicais livres, está envolvido em várias doenças, uma vez que esses radicais, em concentrações acima de valores fisiológicos, podem danificar macromoléculas, como proteínas, lipídeos e até mesmo o DNA. O próprio organismo apresenta sistemas antioxidantes de defesa, compostos por uma série de enzimas e vitaminas, para prevenção destes danos oxidativos. Entretanto, estes mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de defesa parecem estar prejudicados na UAR (CIMEN et al., 2003).

Os pacientes com UAR apresentam níveis séricos de malondialdeído, óxido nítrico e ácido úrico significativamente elevados em relação a controles saudáveis, bem como elevada atividade das enzimas xantine oxidase (XO – enzima que catalisa a formação do ácido úrico cuja alta concentração no sangue pode indicar

dano hepático) e adenosina deaminase (enzima existente em grande quantidade em linfócitos e monócitos ativados, sobretudo linfócitos Th). Estes eletrólitos e enzimas podem desempenhar papel na etiologia da UAR, uma vez que a enzima XO estimula a produção de radicais livres que podem causar injúria tecidual, tanto pela oxidação de lipídeos da membrana celular que leva a célula à lise, quanto por estimulação da produção de certas citocinas. Inibidores da XO deveriam ser avaliados para o tratamento da UAR (GUREL et al., 2007).

A atividade das enzimas antioxidantes superóxido desmutase e catalase apresenta-se significativamente reduzida no plasma de pacientes portadores de UAR em relação a indivíduos controle saudáveis, enquanto a atividade da enzima glutathione peroxidase encontra-se aumentada. O quadro inverso é observado na análise de amostra de saliva destes pacientes. Entretanto, as relações entre a UAR e os mecanismos oxidativos ainda requerem maiores esclarecimentos para o estabelecimento de relações etiopatogênicas fundamentadas (KARINCAOGLU et al., 2005).

2.5.2 Envolvimento genético

Supõe-se que exista um envolvimento genético na expressão da UAR, visto que são freqüentes os relatos de história familiar (MCCULLOUGH; ABDEL-HAFETH; SCULLY, 2007; SCULLY; GORSKY; LOZADA-NUR, 2003; SHIP, 1965; SHIP, 1996). Jaber et al. (2001), Koybasi et al. (2006) e Shohat-Zabarski et al. (1992) observaram

que 73%, 54,2% e 42% dos pacientes UAR, respectivamente, apresentam algum parente de primeiro grau afetado.

No estudo de Ship (1965) verificou-se o aumento de 20% na prevalência de UAR em crianças que apresentavam pai e mãe afetados. Não foi possível definir o tipo de herança, autossômica dominante ou recessiva. Além disso, os resultados não foram compatíveis com padrão de herança ligada ao sexo, o que sugere transmissão ligada à combinação de múltiplos genes.

A correspondência da condição é significativamente maior em gêmeos univitelinos em relação aos bivitelinos, o que também sugere um tipo de herança poligênica (LAKE; THOMAS; MARTIN, 1997).

Muitos genes foram estudados na UAR. Um grupo destes corresponde aos genes da região do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) do genoma humano, que codificam os antígenos dos leucócitos humanos (HLA). Indivíduos que herdam certos antígenos HLA são mais susceptíveis ao desenvolvimento de algumas doenças auto-imunes, tais como, diabetes tipo I, doença celíaca, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, esclerose múltipla, psoríase, e outras (MONSUUR et al., 2008).

Devido ao alto polimorfismo destes genes, alguns podem estar envolvidos em diferentes doenças, como no caso de alelos dos genes HLA-DQA1 e DQB1 que conferem risco para diabetes tipo I e para doença celíaca. Por outro lado, em certas doenças auto-imunes, nem todos os pacientes transportam os mesmo alelos de risco, e múltiplos alelos de risco podem estar envolvidos numa mesma doença (MONSUUR et al., 2008).

As pesquisas neste tema não puderam demonstrar uma conexão entre a UAR e um antígeno HLA específico, observando-se, no entanto, a existência de algumas

associações. Os antígenos HLA-B44 e HLA-B52 foram encontrados em maior frequência em jovens israelenses com descendência árabe portadores de UAR, em relação aos controles saudáveis, sendo que os indivíduos que apresentavam um dos antígenos não apresentavam o outro (JABER et al., 2001).

Outros estudos em indivíduos israelenses portadores de UAR verificaram alta frequência dos antígenos HLA-Cw7 e HLA-B51 (SHOHAT-SABARSKI et al., 1992). Existe uma alta frequência do HLA-B51 e B52 em parentes de pacientes com Doença de Behçet, e que apresentam apenas UAR, o que poderia sugerir que indivíduos com UAR poderiam desenvolver a Doença de Behçet em alguma fase da vida (ARBER et al., 1991). Recomenda-se, desta forma, estudos de acompanhamento destes jovens indivíduos UAR, que apresentam tais antígenos (HLA-B51 e B52), no sentido de se observar o risco de desenvolvimento daquelas doenças e estabelecer, ou não, esta associação (JABER et al., 2001; SHOHAT-SABARSKI et al., 1992).

A herança de polimorfismos genéticos específicos poderia predispor alguns indivíduos à UAR. Os pacientes portadores de UAR apresentam o polimorfismo 5-HTTLPR da região promotora do gene 5-HTT (transportador de serotonina) que os torna propensos a distúrbios emocionais, tal como a ansiedade (VICTORIA et al., 2005). Corroborando com os achados de estudos já desenvolvidos correlacionando aspectos psicológicos e a UAR (ver item 2.5.1.3).

A análise de polimorfismos para os genes de IL-10 e IL-12 não demonstrou diferença significativa entre grupo UAR e controle (BAZRAFSHANI et al., 2003). Assim como não se verificou relação entre a herança de polimorfismos genéticos da TNF- α (região TNF- α -308), TNF- β e receptor para vitamina D com susceptibilidade à UAR (BAZRAFSHANI et al., 2002a). Entretanto, outro estudo verificou correlação

positiva entre o polimorfismo da mesma região TNF- α -308(G/A) com a alta produção de TNF- α e risco para desenvolvimento de UAR (GUIMARÃES et al., 2007).

A herança de alelos G em heterozigose e homozigose nos polimorfismos da IL-1 β (região IL-1 β -511) e IL-6 (região IL-6-174) foram relacionadas a risco significativo de desenvolvimento de UAR (BAZRAFSHANI et al., 2002b).

Em relação a IL-1 β , existe também o aumento da frequência do polimorfismo de outra região (IL-1 β +3954(C/T)) com aumento da produção de IL-1 β em pacientes UAR (GUIMARÃES et al., 2006). Mas a herança do polimorfismo da IL-6 desta mesma região, em heterozigose, não foi verificada no estudo de Guimarães et al. (2007). Este mesmo estudo também não observou correlação entre polimorfismo da região IL-10-1082(G/A) e a UAR, assim como no estudo de Bazrafshani et al. (2003).

No estudo de microarray, conduzido por Borra et al. (2004), evidenciou-se a expressão diferencial de 41 genes, associados principalmente à reação inflamatória tipo Th1, em pool de amostras de tecido de pacientes portadores de UAR em relação a população controle, o que pressupõe uma ativação diferencial destes mecanismos nos indivíduos afetados.

2.5.3 Envolvimento imunológico

A etiologia da manifestação de UAR está provavelmente relacionada a alterações imunológicas mediadas por células (BORRA et al., 2004; JURGE et al., 2006; LEHNER, 1972). Sugere-se que a alteração da resposta imune inata também tenha importante função na patogênese da UAR, com aumento da secreção de

citocinas que recrutariam e ativariam os linfócitos (SISTIG et al., 2001; LEWKOWICZ et al., 2003).

Também se supõe que os danos a mucosa bucal produzidos pela resposta imunológica anormal, pode ser resultado de redução da tolerância oral – processo fisiológico pós-natal, responsável pela adequação do sistema imunológico que atenua ou suprime a resposta a estruturas reconhecidas como inerentes ao organismo (BORRA et al., 2004).

2.5.3.1 subpopulação celular

As alterações imunológicas das manifestações bucais da UAR são também acompanhadas por alterações sistêmicas. Existem controvérsias na literatura em relação à distribuição dos linfócitos T no sangue periférico, mas há um consenso de que existe uma diminuição na relação CD4+/CD8+, e uma diminuição geral dos linfócitos T, independentemente do estágio da doença. Este quadro de desequilíbrio imunológico constante favoreceria a precipitação da doença (PEDERSEN et al., 1989; PEDERSEN et al., 1991; SISTIG et al., 2001).

Pedersen et al. (1989) observaram aumento do número de linfócitos T CD8+ e níveis normais de linfócitos T CD4+ no sangue periférico de indivíduos portadores de UAR em relação a indivíduos controles normais. Entretanto, em outro estudo do mesmo grupo, com outros pacientes portadores de UAR, verificou-se diminuição do número de linfócitos T CD4+, principalmente nas fases iniciais da lesão, e a conseqüente diminuição da relação CD4+/CD8+. Constatou-se também a presença

de alteração significativa no número de células Natural Killer (NK) no sangue periférico, pela presença de células CD45RA+ (PEDERSEN et al., 1991).

Como neste último, o estudo de Landesberg, Fallon e Insel (1990), embora com uma pequena casuística, verificou diminuição do número de linfócitos CD4+ tanto no estágio ativo quanto no inativo da UAR, mas apenas um paciente apresentou diminuição da relação CD4+/CD8+. Observou-se também que os linfócitos T CD4+ CDw29+ encontravam-se em número superior ao de linfócitos T CD4+ CD45R+, ou seja, há um maior número de células que carregam sinais de ativação prévia em relação a células não ativadas.

As alterações teciduais em relação aos linfócitos T CD4+ e CD8+ (ver item **2.3**) também sugerem o envolvimento de uma alteração imunológica local em todas as fases da ulceração. Os linfócitos T CD4+ contam aproximadamente 60% de todas as células, os linfócitos T CD8+ 20%, os linfócitos B CD19+ até 12% e o restante é composto principalmente por macrófagos e neutrófilos. Assim como no sangue, a maioria das células mononucleares são CDw29+ (células de memória) em relação as células CD45R+ (células naive). Células (NK) também foram identificadas em lesões pré-ulcerativas e em úlceras recentes (HÄYRINEN-IMMONEN et al., 1991; SAVAGE; SEYMOUR; KRUGER, 1985).

As células NK encontram-se ativadas e apresentam atividade aumentada durante a fase ativa da doença, principalmente nas aftas maiores. Esta ativação se deve à secreção da IL-2 no estágio ativo da doença. Durante a fase de remissão, a atividade destas células é semelhante à de indivíduos controle sadios (SUN et al., 1991, 2000). Por outro lado, outro estudo não verificou alterações quantitativas ou funcionais das células NK circulantes, mas não exclui a possibilidade de

envolvimento das células existentes no desenvolvimento da lesão (PEDERSEN; PEDERSEN, 1993).

O aumento da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) foi verificada nos estágios iniciais da ulceração, sugerindo a ocorrência de um aumento do número de células efectoras (GREENSPAN et al., 1981). Isto sugere o envolvimento das células NK e dos linfócitos T que apresentam o receptor γ/δ . Estes linfócitos T γ/δ apresentam-se em número elevado no sangue periférico de pacientes com UAR (PEDERSEN; RYDER, 1994). Estas células também se encontram em número elevado na lesão de UAR, em relação à mucosa íntegra de pacientes portadores ou não de UAR, sendo restritos a áreas de inflamação, através da verificação de marcação por imunoistoquímica. Apesar das funções deste tipo de célula não estar bem definida, a ativação deste receptor por HSP induz a produção de IL-2 e atividade citotóxica. Existem trabalhos que relacionam a HSP 65 kDa com o desenvolvimento da UAR (ver item 2.5.1.7), condicionado à ativação destes receptores (NATAH et al., 2000).

Linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ representam subtipos de linfócitos T regulatórios e possuem capacidade de suprimir a ativação e expansão de linfócitos auto-reativos, colaborando para a manutenção da auto-tolerância. Estes se apresentam em número reduzido no sangue periférico de pacientes com UAR em relação a indivíduos controles, tanto no estágio ativo quanto no estágio inativo da doença. Além disso, são menos eficientes na supressão da produção de citocinas, configurando uma deficiência de proteção quantitativa proporcionada por estas células, além de qualitativa e permanente, nos pacientes com UAR. Tal condição sugere que a manifestação da lesão está fortemente relacionada com a perda da tolerância imunológica local (LEWKOWICZ et al., 2005, 2008).

Aparentemente, a imunidade humoral não está relacionada à patogênese da UAR, visto que não há alteração específica ou deficiências de imunoglobulinas no soro ou saliva. O número de linfócitos B (CD19+) tende a ser inferior na UAR aguda, em relação aos pacientes livres de UAR, mas esta diferença não é significativa (SISTIG et al., 2001). O estudo de BEN-ARYEH et al. (1976) não verificou correlação entre as lesões de UAR, alterações de fluxo salivar e deficiências de IgA salivar e IgA e IgG séricas.

Outros tipos celulares, como os leucócitos polimorfonucleares (PMNC), podem estar envolvidos no processo de dano tecidual, embora os resultados sejam contraditórios, talvez pelos diferentes métodos empregados de mensuração das funções destas células. Dagalis, Bagg e Walker (1987) observaram que a atividade quimiotática e a migração espontânea de neutrófilos, estimulada por peptídeos específicos, não apresentam diferenças significativas entre pacientes com UAR e indivíduos controle.

Lewkowicz et al. (2003) verificaram que os neutrófilos apresentam-se ativados em ambos os estágios, ativo e inativo da UAR, o que pode ser consequência da ação das citocinas inflamatórias produzidas durante a reação inflamatória que culmina no desenvolvimento da lesão de UAR. Já Sistig et al. (2001) verificaram diminuição da migração espontânea das PMNC em lesões agudas de UAR.

2.5.3.2 citocinas

As citocinas, mediadores cruciais na reatividade imunológica, têm sido foco de estudo na patogênese de diversas doenças, desde que orientam a resposta imunológica em direção à tolerância ou à auto-imunidade.

O envolvimento das citocinas Th1 (pró-inflamatórias) é bastante evidente na patogênese da UAR, tendo sido observada em diversos estudos. Lewkowicz et al. (2005) verificaram, através de citometria de fluxo e ELISA, a produção de citocinas em culturas de PBMC estimuladas com fitohemaglutinina e constataram que o nível das citocinas pró-inflamatórias, indutoras da imunidade mediada por células (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-8, IL-12), encontrava-se aumentado de 3 a 5 vezes em indivíduos portadores de UAR, em relação a indivíduos controle. Nas culturas não estimuladas o nível de TNF- α encontrava-se aumentado em todos os estágios da doença, o INF- γ estava aumentado apenas na fase de remissão, enquanto a IL-2 apresentava-se semelhante aos controles. Além disso, observou-se diminuição das citocinas antiinflamatórias, promotoras da imunidade humoral e tolerância (IL-4, IL-10, TGF- β), em culturas estimuladas ou não.

No tecido verifica-se, através de imunoistoquímica, que portadores de UAR apresentam alta marcação para as citocinas IL-12, IFN- γ e TNF- α , correspondente ao quadro sistêmico (DALGHOUS; FREYSDOTTIR; FORTUNE, 2006). Além destas alterações também se observa a presença de níveis elevados de IL-2 e níveis diminuídos de IL-10 (BUNO et al., 1998).

Na saliva dos pacientes UAR, observa-se aumento significativo do nível de TNF- α nas fases aguda e de remissão, em relação a indivíduos sadios livres de

doença periodontal. O mesmo não foi observado em relação a IL-6, que se apresentou semelhante para os grupos – UAR ativa e em remissão, bem como para o grupo controle saudável (BORAS et al., 2006).

A determinação da capacidade de produção das citocinas pelos linfócitos Th1 e Th2 parece ser um método mais confiável do que a mensuração sérica destas. O número de linfócitos Th1 que secretam IL-2, IL-12 e INF- γ , determinado através do ensaio ELISPOT, encontra-se aumentado no sangue periférico de pacientes UAR em relação a indivíduos saudáveis. Entretanto, o número de células Th1 secretoras de TNF- α é semelhante ao dos indivíduos sem UAR, apesar dos níveis séricos desta citocina apresentar-se elevado. Em relação aos linfócitos Th2, observa-se um maior número de células secretoras de IL-10, diminuição do número de células secretoras de IL-4 e não há diferença em relação aos controles para IL-5 e IL-6 (ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2007).

As consequências do aumento do nível das citocinas pró-inflamatórias são numerosas, proporcionando a maturação e ativação de células dendríticas e indução da diferenciação de linfócitos T virgens em linfócitos Th1. Quimiocinas e moléculas de adesão poderiam estar superexpressas, promovendo o recrutamento dos linfócitos para a mucosa e acarretando a resposta contra o tecido. Além disso, o predomínio de citocinas pró-inflamatórias e a diminuição dos linfócitos T regulatórios CD4+CD25+, pode facilmente ativar linfócitos auto-reativos (LEWKOWICZ et al., 2005).

Estudos sobre a expressão local de quimiocinas em portadores de Doença de Behçet revelam aumento na expressão das quimiocinas IL-8 e fator ativador e quimiotático de monócitos (MCP)-1, observado através de RT-PCR em tempo real a partir de amostras de lesões orais ou genitais (BEN AHMED et al., 2004). O nível da

quimiocina MCP-1 também se encontra elevado sistemicamente, mesmo no estágio inativo da doença, em relação a indivíduos controle (KABURAKI et al., 2003). Existem indícios de que as quimiocinas estejam alteradas na UAR, visto que alguns dos genes encontrados superexpressos, através da análise por microarray, codificam as quimiocinas: proteína inflamatória do macrófago (MIP)-1 α , MIP-1 β , MCP-1 (BORRA et al., 2004).

2.5.3.3 receptores toll-like

Os receptores toll-like (TLR) são responsáveis pelo reconhecimento dos produtos moleculares derivados de diferentes classes de microrganismos, tais como bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, protozoários e vírus. Após este reconhecimento, estes receptores sinalizam eventos que desencadeiam a resposta imunológica inata, pela indução de genes antimicrobianos de vários tipos celulares e ativação dos macrófagos, com conseqüente produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, culminando na resposta inflamatória aguda (PASARE; MEDZHITOV, 2005).

Também desempenham importantes funções na iniciação da resposta imunológica adaptativa, já que a presença de agentes microbianos também é detectada pelos TLR das células dendríticas. Desta forma, estas células sofrem o processo de maturação, e passam a secretar diversos tipos de citocinas e quimiocinas que são responsáveis por transformar os linfócitos T-helper refratários à supressão exercida pelos linfócitos T-regulatórios. Também passam a expressar

moléculas MHC específicas e outros fatores que em conjunto são responsáveis pela ativação de linfócitos T naíve (PASARE; MEDZHITOV, 2005).

Os TLR são divididos em 13 subtipos de acordo com os tipos de ligantes que eles reconhecem, e, em sua grande maioria, estão presentes em monócitos e macrófagos, mas também em células dendríticas, mastócitos, células do epitélio intestinal, e outras. Estruturas lipídicas são reconhecidas pelos TLR2 e TLR4, ácidos nucléicos bacterianos e virais são reconhecidos pelos TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 (KAJITA et al., 2007).

Kajita et al. (2007) observaram, através de PCR em tempo real, maior expressão dos TLR-2, -4, -5, -7 e -9 em amostras de tecido de gengiva com doença periodontal em relação à gengivite, apesar do níveis séricos de anticorpos para os vírus do grupo herpes serem iguais para as duas doenças, revelando a possibilidade de envolvimento de diversos agentes virais na etiologia da doença periodontal.

A relação entre os TLR, o reconhecimento de patógenos e o desencadeamento da resposta inflamatória são bastante conhecidas, mas anormalidades envolvendo as funções dos TLR poderiam explicar a resposta imunológica aberrante em diversas doenças (BARRAT et al., 2005; BLANCO et al., 2008; GRIBAR et al., 2008; LANG et al., 2005; SHIH; TARGAN, 2008).

A ativação do TLR-4 em enterócitos inibe a proliferação e migração celular e induz estas células à apoptose, culminando na injúria do epitélio intestinal associada à dificuldade de reparação deste. Este tipo de alteração está presente em diversos tipos de inflamação intestinal, incluindo a Doença de Crohn, colite ulcerativa e enterocolite necrotizante (GRIBAR et al., 2008; SHIH; TARGAN, 2008).

O TLR-2 encontra-se expresso e ativo na superfície dos linfócitos T CD4+ e CD8+, atuando como co-estimulador dos linfócitos T e manutenção de células T de

memória. Num estudo utilizando-se lipoproteína bacteriana sintética, agonista do TLR-2, verifica-se a indução da proliferação de linfócitos T regulatórios (CD4+CD25+) e efetores, mesmo na ausência de moléculas apresentadoras de antígeno. Entretanto, os linfócitos T regulatórios apresentam perda momentânea da capacidade de supressão, pela indução da secreção da IL-2, culminando nos efeitos proporcionados pelos linfócitos T efetores (LIU et al., 2006). Observam-se algumas destas características na UAR, tais como aumento da produção de IL-2 e diminuição da atividade dos linfócitos T regulatórios CD4+CD25+, mas pouco se sabe sobre a relação entre os TLR e a UAR (ver itens 2.5.3.1 e 2.5.3.2).

O polimorfismo funcional do gene do TLR-2 (Arg753Gln (A/G)) é responsável pela predisposição ao choque séptico por microrganismos gram-positivos e pela ineficiência da resposta imunológica frente a peptídeos de bactérias como *Borrelia*, *Mycoplasma* e *Treponema*, por exemplo, relacionadas à Doença de Behçet. Entretanto, não foi possível associar este polimorfismo a Doença de Behçet, UAR e artrite reumatóide. É possível que exista algum outro polimorfismo do TLR-2, ainda não identificado, envolvido no processo de desenvolvimento destas doenças, ou mesmo outros fatores relacionados à alteração dos TLR (BACANLI et al., 2006).

2.6 Tratamento

O desconhecimento da etiologia da UAR tem como consequência a inexistência de protocolo de tratamento satisfatório para cura ou, ao menos, redução da recorrência das manifestações dessa doença. O tratamento é paliativo, uma vez

que a maioria das terapêuticas existentes apenas reduz a sintomatologia e, algumas vezes, a duração da lesão. Diversos estudos avaliaram medicações tópicas e sistêmicas para o tratamento da UAR, de forma que a terapêutica hoje empregada com algum sucesso, baseia-se na utilização de corticóides e imunossupressores, locais ou sistêmicos.

O tratamento inicial corresponde, comumente, a uma abordagem local, reservando-se a medicação sistêmica para as situações mais severas ou resistentes ao uso tópico de corticóides, anti-sépticos, antibacterianos, bioadesivos, utilizados isoladamente ou em combinações diversas (MIMURA, 2001).

Pacientes que apresentam quadro leve de UAR, até cinco episódios anuais, acabam recorrendo a medicações de prateleira, quando optam pelo uso de medicamentos para o tratamento das lesões. Estes medicamentos podem ser úteis e eficazes no alívio da dor e apresentam como vantagens o baixo custo, a disponibilidade e a ausência de efeitos colaterais (CARPENTER; SILVERMAN, 1998).

Alguns estudos avaliaram o efeito de substâncias cáusticas no tratamento da UAR, e verificaram que promovem alívio imediato da sintomatologia dolorosa e não apresentam efeitos colaterais (ALIDAEI et al., 2005; RHODUS; BEREUTER, 1998).

É nas manifestações entre moderadas e severas, de curso crônico e doloroso, que o tratamento torna-se um desafio. Frequentemente se indica o uso de corticóides tópicos (betametasona, clobetasol), corticóides sistêmicos (prednisona) e agentes imunossupressores (dapsona, pentoxifilina, colchicina, levamisol, talidomida). Injeção intra-lesional de corticóide, como triancinolona, betametasona e dexametasona, também pode ser útil para reduzir o tempo de tratamento sistêmico (SCULLY; GORSKY; LOZADA-NUR; 2003).

Estudos randomizados adequadamente conduzidos, sem erros sistemáticos e com poder estatístico adequado para demonstrar benefício em desfechos clínicos relevantes, em conjunto com as revisões sistemáticas constituem a melhor fonte de evidência científica e têm fornecido resultados confiáveis e robustos para modificação da prática clínica, visando o tratamento apropriado para os pacientes (SACKETT et al., 1996).

Os poucos estudos clínicos randomizados, em relação a tratamentos tópicos para a UAR, analisados na revisão sistemática de Porter e Scully (2007) sugerem que bochechos com clorexedina e a aplicação de corticosteróide tópico podem reduzir a severidade e duração das úlceras da UAR, mas não influenciam significativamente a frequência dos episódios. Não se pode concluir, nessa revisão, sobre a eficácia de bochechos com tetraciclina, aplicação de carbenoxolona (agente derivado do alcaçuz, utilizado no tratamento de úlceras do trato digestório) e anestésico tópico, pois os poucos estudos existentes apresentam problemas no delineamento e no tamanho da amostra.

O debridamento da lesão, através da aplicação de anestésico tópico e remoção da porção necrótica central da úlcera, promove redução acentuada na sintomatologia das lesões (HARTSFIELD, 1990).

A eficácia do sucralfato no tratamento da UAR, mucoprotetor usado no tratamento de úlceras pépticas, foi avaliada em 14 pacientes com lesões ativas de UAR. Sete pacientes fizeram bochechos com suspensão de sucralfato 20% e os outros 7 pacientes mascaram tabletes de 1 grama de sucralfato. Houve melhora na sintomatologia em 71,4% (bochecho) e 42,8% (tablete) dos pacientes. Os autores sugerem que além do mecanismo mucoprotetor, a substância inibe a colonização de microrganismos patogênicos na mucosa (CAMPISI; SPADARI; SALVATO, 1997).

A tetraciclina, além das propriedades antimicrobianas, inibe a produção de prostaglandina, suprime a atividade leucocitária, capta radicais livres, inibe a ação da collagenase e de outras metaloproteinases (estas últimas envolvidas no processo de destruição tecidual). Entretanto, em estudo utilizando enxaguatório contendo tetraciclina, apesar da redução do desconforto causado pela ulceração, não houve diminuição significativa no nível de collagenase salivar (Häyrinen-immonen et al., 1994). A minociclina, uma tetraciclina semi-sintética utilizada como bochecho a 0,2%, em solução aquosa, reduz a dor significativamente, como observado em estudo randomizado e controlado (GORSKY et al., 2008).

O tratamento com laser de CO₂ com baixos níveis de intensidade (1-1,5 watts), utilizado desfocado, proporcionou efetivo alívio da dor e a cicatrização pôde ser observada de 3 a 7 dias após a terapia. Este alívio da dor é instantâneo e duradouro e a taxa de recorrência no mesmo sítio da aplicação do laser é baixa (SHARON-BULLER; SELA, 2004).

A utilização tópica da própolis, que apresenta propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias, anti-sépticas, antioxidante, cicatrizante, estimulante imunológico e reparador tecidual; numa formulação a 5% em propilenoglicol, proporciona redução no tempo de duração e aumento do intervalo das recorrências da UAR, de forma inócua e de fácil aplicação (LOTUFO et al., 2005), assim como a utilização sistêmica de 500 mg de própolis, verificado em estudo controlado randomizado (SAMET et al., 2007).

Os resultados obtidos com a utilização de suspensão oral de BCG sugerem que este deva ser mais aprofundadamente investigado, desde que se observaram resultados positivos no tratamento dos quadros severos de UAR, especialmente em mulheres, sem relatos de efeitos adversos (SUGAYA et al., 1993).

A utilização de 220 mg de sulfato de zinco durante um mês evitou o surgimento de lesões durante os três meses subseqüentes, num estudo envolvendo 40 pacientes UAR (ORBAK et al., 2003). Em outro estudo, duplo-cego e controlado, a utilização de sulfato de zinco mostrou-se tão eficaz quanto a dapsona no controle da UAR (SHARQUIE et al., 2008).

Atualmente não existe revisão sistemática a respeito da efetividade e segurança dos diversos tipos de intervenções já empregadas para tratamento das UAR, exceto para o uso tópico de clorexedina, corticóide e tetraciclina. A Colaboração Cochrane desenvolve revisão sobre o tratamento de UAR, em fase de protocolo, com aproximadamente 40 estudos clínicos randomizados e controlados, que, quando publicada, será fonte de evidência confiável para o tratamento de pacientes e para a realização de novos estudos (PROLO et al., 2005).

2.7 Metodologia utilizada no estudo da expressão dos receptores Toll-Like

2.7.1 Aspectos do processamento das amostras de sangue periférico

A análise da expressão gênica através da avaliação dos diversos componentes da resposta imunológica e do metabolismo presentes no sangue periférico vem sendo cada vez mais utilizada, principalmente pela facilidade de obtenção da amostra, buscando-se o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico não somente para doenças hematológicas.

Os métodos de extração de RNA devem ser extremamente fidedignos, considerando-se a possível influência dos procedimentos de coleta, do tipo de anticoagulante utilizado, do armazenamento e processamento do sangue, que podem possibilitar mudanças *ex vivo* na expressão de alguns componentes, principalmente em relação ao perfil de expressão de citocinas, proporcionando resultados não compatíveis com os processos reais no organismo (HÄRTEL et al., 2001; KVARNSTRÖM; JENMALM; EKERFELT, 2004; RICHES et al., 1992; RODENBURG et al., 1998; SCHITTEK et al., 1999; THAVASU et al. 1992).

As PBMC (linfócitos e monócitos) são as células com maior atividade de transcrição do DNA no sangue, de forma que é importante o isolamento destas células para a avaliação do transcrito de interesse, descartando a influência dos eritrócitos e granulócitos (eosinófilos, basófilos e neutrófilos). Este procedimento geralmente baseia-se na centrifugação do sangue num gradiente de densidade específica e processamento imediato do sangue, evitando-se desta forma mudanças na expressão de certos transcritos (AFFYMETRIX INC, 2003).

A empresa Affymetrix realizou um estudo onde se avaliou a influência da temperatura de centrifugação (temperatura ambiente e 8°C) e do tempo decorrido entre a coleta do sangue e o processamento da amostra (imediato e após 20 horas), na separação das PBMC através do Ficoll. Verificou-se alta qualidade do RNA total extraído através do reagente TRIzol em todas as condições (temperatura e tempo), através da análise do gel de integridade e a quantificação por espectrofotômetro com relação superior a 1,8. O perfil de expressão dos genes – obtido através da hibridização das membranas de microarray Affymetrixcs – foi semelhante para as amostras submetidas a centrifugação com Ficoll em diferentes temperaturas (temperatura ambiente e 4°C). Entretanto, apesar da boa qualidade do RNA total

extraído, muitas mudanças no padrão de expressão foram observadas quando a amostra era processada após 20 horas devido à escassez de material extraído das células isoladas, desde que o atraso proporciona morte celular e a possível indução da expressão de alguns genes (AFFYMETRIX INC, 2003).

Os kits PAXgene Blood kit (Qiagen) e Tempus Blood RNA kit (Applied Biosystems) são utilizados para a extração de RNA de amostras de sangue total. Ambos os kits apresentam um agente estabilizador do RNA que evita sua degradação, permitindo um maior período de armazenamento até o processamento da extração. No estudo da Europe Against Cancer (EAC) para estabelecimento de protocolo para detecção de doença residual mínima em leucemias, através do acompanhamento molecular (detecção de transcritos relacionados à doença no sangue) comparou-se, através de RT-PCR em tempo real, a expressão destes transcritos em amostras de sangue coletado em tubos de EDTA não estabilizados pelo protocolo Ficoll-Trizol e pelos dois kits citados anteriormente, não se verificando diferenças significativas entre os processos. A técnica de extração do RNA com a utilização de tais kits é mais simples, porém de alto custo e exige equipamentos específicos (PREZEAU et al., 2006).

2.7.2 RT-PCR em tempo real

A possibilidade de quantificar os níveis de transcritos de genes específicos possibilita o entendimento da função do gene em questão. A atual medicina molecular utiliza estas técnicas para procedimentos clínicos diversos, tais como

diagnóstico, prognóstico, avaliação de terapias. Os métodos mais utilizados para a quantificação de transcritos são: northern blotting, hibridização in situ, ensaios de proteção da RNase, RT-PCR convencional, RT-PCR em tempo real e microarray. A RT-PCR é o método mais sensível para a detecção de RNA mensageiro em pequenas quantidades, obtidas de amostras limitadas de tecido, apesar de constituir técnica complexa por apresentar diversas fases interdependentes (CUI et al., 2006).

Ao contrário de uma reação de PCR convencional, a reação de PCR em tempo real faz a análise da amplificação durante toda a reação e não somente no final, permitindo mensuração mais precisa da quantidade de DNA/RNA inicial. Esta se baseia no chamado Ct (Threshold cycle), que é o número de ciclos exigidos para que a fluorescência captada ativesse o limiar (ruído de fundo). Os valores de Ct são inversamente proporcionais à quantidade de um determinado alvo na amostra (seja ele um gene, uma bactéria ou um vírus). Isto é, quanto menor o valor do Ct, maior é a quantidade de ácido nucléico. A fluorescência é determinada quando o SYBR Green intercala-se com a dupla fita de DNA produzida durante os ciclos da PCR, captada e transformada em um valor numérico para a análise da expressão de um gene, por exemplo (BUSTIN, 2000).

Este método pode ser utilizado para a quantificação precisa de um alvo, seja pela quantificação absoluta (determinar o número de cópias virais em uma amostra, por exemplo) ou pela quantificação relativa (determinar expressão de um gene alvo de amostras afetadas em relação às amostras não afetadas, por exemplo) (TELLMANN, 2003).

3 PROPOSIÇÃO

Estudar a expressão dos receptores TLR-2, TLR-4 e TLR-7 em população portadora de UAR e indivíduos controles sadios, localmente (células da mucosa bucal) e sistemicamente (sangue periférico), por meio de RT-PCR em tempo real, buscando estabelecer diferenças e/ou similaridades entre populações e substratos.

4 CASUÍSTICA – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Os indivíduos foram selecionados entre os que buscaram tratamento ou se encontravam em acompanhamento no Ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) – entre agosto de 2007 e março de 2008 – e entre voluntários integrantes da Disciplina. Os indivíduos incluídos no estudo concordaram com sua participação mediante leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A), aprovado em 01/09/2006 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP, protocolo nº 122/06 (Anexo A e B).

Os indivíduos foram divididos em dois grupos: grupo de estudo, indivíduos que apresentaram UAR; e grupo controle, pareado por sexo e idade, composto de indivíduos saudáveis não portadores de UAR. Foi realizada a caracterização dos pacientes do grupo estudo em relação à UAR (Apêndice B). Bem como a avaliação, em ambos os grupos, do estado de saúde geral (Apêndice C) e da qualidade de vida relacionada à saúde bucal, por meio da aplicação da versão validada em português do OHIP-14 (Anexo C – OLIVEIRA; NADANOVISKY, 2005).

4.1.1 Critérios de inclusão do Grupo de Estudo

Pacientes com quadro clínico consistente para o diagnóstico da UAR, e história de manifestação destes quadros ulcerativos com ao menos um ano de duração. Com história negativa de tratamento tópico ou sistêmico para o quadro de UAR há pelo menos 15 dias.

4.1.2 Critérios de inclusão do Grupo Controle

Os indivíduos incluídos neste grupo eram saudáveis, livres de UAR e sem histórico familiar (geração paterna) de UAR.

4.1.3 Critérios de exclusão para ambos os grupos

- Menor de 18 anos de idade;
- Tabagista e/ou etilista crônico;
- Gravidez;
- Portador de neoplasia maligna ou sob tratamento ou com história de tratamento radioterápico e/ou quimioterápico;
- Suspeita ou história de imunodeficiência congênita, adquirida ou AIDS;

- Suspeita ou história de colite ulcerativa, doença celíaca, doença de Crohn, doença de Behçet, Síndrome de Reiter, Síndrome de febre periódica, associada à estomatite aftosa, faringite e adenite cervical (PFAPA), neutropenia cíclica, doenças auto-imunes;
- Sob uso crônico de drogas tais como antiinflamatórios não esteroidais, imunossupressores, ansiolíticos, antidepressivos ou nicorandil;
- Portadores de doenças sistêmicas tais como anemia, diabetes, insuficiência renal, insuficiência hepática, hipertireoidismo ou hipotireoidismo e etc.

4.2 Obtenção das amostras

4.2.1 Biópsia incisional

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no período matutino sob condições ideais de assepsia e biossegurança, segundo o protocolo do Ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOUSP. A anestesia local foi infiltrada a distância da região submetida à biópsia (ao menos 1 cm).

4.2.1.1 grupo de estudo

Os pacientes do grupo A foram submetidos à biópsia de lesão ulcerada recente (duração de até três dias), utilizando-se *punch* (Kolplast CI LTDA – Brasil) de 5 mm de diâmetro e profundidade de 2 a 3 mm, com a incisão englobando 50% da úlcera e 50% do epitélio adjacente (Figura 4.1).

As amostras de tecido foram acondicionadas em criotubos (Cryovial® – Axygen Scientific – Califórnia, USA), imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em *freezer* a -80°C até a execução dos experimentos. Após a obtenção do material com *punch*, o remanescente da lesão de UAR foi removido, fixado em formol (10%) e encaminhado ao Serviço de Patologia Bucal da FOUSP para análise histopatológica.

Figura 4.1 - Esquema da localização da biópsia na lesão ulcerada com *punch* de 5 mm

4.2.1.2 grupo controle

Remoção de fragmento de mucosa clinicamente saudável, utilizando-se punch de 5 mm de diâmetro em voluntários que se candidataram à participação no estudo. A coleta de tecido foi realizada em mucosa bucal de revestimento (não queratinizada) sem sinais clínicos de inflamação.

Previamente à biópsia os pacientes foram clinicamente avaliados em relação ao estado de saúde geral, evitando-se a realização de coleta das amostras em período de reação alérgica ou infecção transitória, como gripes, resfriados ou dermatites de contato.

Da mesma maneira, as amostras de tecido foram acondicionadas em criotubo, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer à -80°C até a execução dos experimentos.

4.2.2 Coleta de sangue periférico

Foi realizada a coleta de 8 mL de sangue periférico dos participantes do estudo através de venopunção, por profissional habilitado (enfermeira), em 2 tubos de 4 mL contendo o anticoagulante EDTA (BD Vacutainer, BD Biosciences – Nova Jérsei, EUA), sob condições ideais de assepsia e biossegurança.

Esta coleta foi realizada imediatamente após o procedimento cirúrgico e este volume foi utilizado exclusivamente para a realização dos experimentos.

Os indivíduos incluídos no estudo também foram submetidos à coleta de sangue periférico para realização de exames laboratoriais (hemograma completo, dosagem sérica de ferritina, folato e vitamina B12). Procedimentos estes executados por profissionais do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (LAC – FCF/USP).

4.3 Experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia Molecular da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP (Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes) e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP (Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar).

4.3.1 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

As PBMC foram isoladas por centrifugação em gradiente de Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare – Uppsala, Suécia) de densidade de 1,077 g/ml. Para tal, o sangue de cada tubo de 4 mL foi diluído em solução tampão PBS 1x (LGC Biotecnologia – São Paulo, Brasil) na proporção 1:1 e este foi, cuidadosamente, transferido para novos tubos de fundo cônico de 15 mL (TPP Techno Plastic Products AG modelo 91015 – Trasadingen, Suíça) contendo 3 mL de Ficoll-Paque

Premium. Os tubos foram centrifugados a 1250 rpm por 30 minutos a 10°C (centrífuga Beckman J2-MC, rotor JS-7,5 – Califórnia, USA).

Sem perturbação das outras camadas, as células mononucleares eram coletadas da interfase do gradiente (Figura 4.2) e transferidas para novos tubos contendo 3 mL de solução PBS 1x. Após centrifugação por 10 minutos a 1250 rpm e 10°C, o sobrenadante era descartado e o precipitado celular novamente lavado com 1 mL de solução de PBS 1x e centrifugação a 1500 rpm por 7 minutos a 4°C.

Figura 4.2 - Esquema ilustrativo das etapas do processamento do sangue com Ficoll-Paque

4.3.2 Extração do RNA total

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.

4.3.2.1 tecido biopsiado

Cada amostra congelada foi completamente macerada em nitrogênio líquido, até a visualização de um pó branco, sem permitir o descongelamento e a conseqüente degradação do RNA (Figura 4.3).

Figura 4.3 - A: maceração em nitrogênio líquido do fragmento de tecido, B: aspecto após maceração e adição do reagente Trizol

Em seguida, acrescentou-se 1 mL de Trizol ao material macerado e após seu descongelamento, foi homogeneizado até a completa dissolução do material. Para cada mL de Trizol foram utilizados 200 µL de clorofórmio (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil), e o microtubo (Axygen Scientific – Califórnia, USA) devidamente selado foi vigorosamente agitado durante 30 s para a mistura das soluções e acondicionada a -20°C durante 15 min. Os tubos foram centrifugados (centrífuga Eppendorf AG modelo 5415R – Hamburg, Alemanha) a 10.000 rpm durante 15 min 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 500 µL de álcool isopropílico (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil); após homogeneização foi armazenada a -20°C durante 30 min. Em seguida os tubos foram submetidos a nova centrifugação a 10.000 rpm durante 10 min 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 5.000 rpm durante 5 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido a secagem, deixando-se os microtubos abertos por no máximo 10 min. Em seguida, acrescentou-se 25 µL de água tratada com DEPC (Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA) para a dissolução do precipitado de RNA total.

4.3.2.2 células sangüíneas isoladas

O RNA total das PBMC isoladas anteriormente, através da centrifugação com o gradiente Ficoll-Paque Premium, foi extraído utilizando-se o método do TRIzol da mesma maneira utilizada para a extração do RNA do tecido biopsiado e macerado.

4.3.2.3 quantificação do RNA e verificação de sua qualidade

Para a confirmação da pureza da amostra de RNA extraída foi utilizada a relação entre as leituras das absorbâncias de RNA e proteína (A_{260}/A_{280}) determinada por espectrofotômetro (Beckman DU640 – Califórnia, EUA). Foram consideradas adequadas as amostras cujo resultado desta relação fosse superior ao valor 1,6 (Tabela 4.1). 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 4.4).

As amostras foram quantificadas, para a execução das etapas subseqüentes, através do seguinte cálculo:

$$[C] = A_{260} \times \text{coeficiente de extinção do RNA} \times \text{fator de diluição} / 1000$$

Sendo [C] a concentração da amostra, expressa em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; A_{260} , o valor da absorbância a 260 nm detectada pelo espectrofotômetro; coeficiente de extinção do

RNA, uma constante que representa o valor da concentração de RNA quando a absorbância a 260 nm é igual a um, que corresponde a 40; e fator de diluição, a razão entre o volume total da cuveta (1000) e o volume da amostra (5). Divide-se por 1000 para que a concentração seja expressa em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e não em $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabela 4.1 - Valores obtidos a partir da leitura por espectrofotômetro e do cálculo da quantificação do RNA das amostras processadas

amostra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	C ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Total (μg)
A1.1	0,0475	0,0264	1,80	0,38	9,50
A1.2	0,0484	0,0295	1,64	0,39	9,68
A2.1	0,0256	0,0145	1,77	0,20	6,14
A2.2	0,0740	0,0471	1,60	0,59	17,76
A3.1	0,0797	0,0430	1,85	0,64	19,13
A3.2	0,0841	0,0481	1,74	0,67	20,18
A4.1	0,0454	0,0281	1,62	0,36	10,90
A4.2	0,0951	0,0503	1,89	0,73	21,79
A5.1	0,0365	0,0222	1,64	0,29	8,76
A5.2	0,0674	0,0392	1,72	0,54	16,18
C1.1	0,0716	0,0380	1,88	0,57	17,18
C1.2	0,0467	0,0265	1,76	0,37	11,21
C2.1	0,0412	0,0207	1,99	0,33	9,89
C2.2	0,0388	0,0221	1,76	0,31	9,31
C3.1	0,0679	0,0382	1,82	0,54	16,30
C3.2	0,0334	0,0203	1,64	0,027	8,02
C5.1	0,0693	0,0399	1,74	0,55	16,63
C5.2	0,0586	0,0344	1,70	0,47	14,06

*A: paciente UAR, C: paciente Controle, 1.1: número do paciente + RNA da amostra de sangue, 1.2: número do paciente + RNA da amostra de tecido

Figura 4.4 - Gel de integridade do RNA

4.3.3 RT-PCR em tempo real

4.3.3.1 iniciadores

As seqüências dos iniciadores para a reação de PCR foram baseadas nos genes dos receptores TLR2, TLR4 e TLR7 e o gene constitutivo β -actina, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Ricardo C. Borra (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real

Gene	Iniciadores 5' → 3'	Tamanho do produto de PCR	Referência bibliográfica
TLR2	Senso: GCCTCTCCAAGGAAGAATCC Anti-senso: TCCTGTTGTTGGACAGGTCA	144 pb	HOLMLUND et al., 2002
TLR4	Senso: AAGCCGAAAGGTGATTGTTG Anti-senso: CTGAGCAGGGTCTTCTCCAC	153 pb	HOLMLUND et al., 2002
TLR7	Senso: TTACCTGGATGGAAACCAGCTACT Anti-senso: TCAAGGCTGAGAAGCTGTAAGCTA	72 pb	KADOWAKI et al., 2001
B-actina	Senso: ACTCTTCCAGCCTTCCTTC Anti-senso: ATCTCCTTCTGCATCCTGTC	171 pb	LAMBA et al., 2006

*pb: pares de base

4.3.3.2 tratamento das amostras de RNA com DNase

As amostras foram previamente tratadas com DNase (DNase I Amp Grade, Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA) para a eliminação do DNA genômico que eventualmente estivesse presente na amostra. Esta etapa confere resultados mais confiáveis, uma vez que a amplificação pelo RT-PCR será apenas do cDNA, refletindo a expressão do gene (RNA mensageiro).

Para tal, acrescentou-se a 1 µg de RNA de cada amostra, 1 µL do tampão da reação (10X DNaseI reaction buffer, Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA), 1 µL da enzima DNase e completou-se o volume para 10 µL com água tratada com DEPC, num microtubo de 0,5 mL. A mistura foi acondicionada à temperatura ambiente por 15 min para permitir a ação da enzima de degradação do DNA.

A enzima foi inativada acrescentando-se 1 µL de EDTA 25mM (Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA) à mistura, levada à termocicladora (Eppendorf Mastercycler – Hamburg, Alemanha) a 65°C por 10 min, resultando numa amostra de RNA pronta para a reação de transcrição reversa.

4.3.3.3 reação de transcrição reversa – síntese do cDNA

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada combinando-se 1 µg do RNA total, obtido após tratamento com a DNase, a 2 µL de Oligo(dt)₂₀ primer (Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA) e 8 µL de água ultrapura livre de RNase e

DNase (Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA). Esta mistura foi aquecida em termociclador a 70°C por 10 min e em seguida resfriada em gelo por 5 min.

Acrescentou-se a cada amostra 7 µL de um mix composto por 4 µL de tampão apropriado (5X First-Strand Buffer, Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA), 2 µL de DTT (0,1M Dithiothreitol, Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA) e 1 µL de dNTP (dNTP Mix, Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA), acondicionando-se os tubos a 25°C por 10 min.

Em seguida acrescentou-se a cada tubo 1 µL da enzima transcriptase reversa – SuperScript III (Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA) e estes foram submetidos a um ciclo de 55 min a 42°C, para a reação de RT e a outro de 10 min a 70°C, para inativação da reação.

4.3.3.4 reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real

As reações foram realizadas em triplicatas visando a minimização dos erros de pipetagem, críticos neste tipo de experimento. Desta forma, para cada tubo óptico de 0,2 mL, específico para PCR em tempo real, acrescentou-se 4 µL de cDNA na concentração 1:40, 0,5 µL de cada iniciador (1mM) e 5 µL do reagente SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems – Califórnia, EUA) num volume final de 10 µL.

A amplificação por PCR em tempo real foi realizada através do aparelho 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems – Califórnia, EUA). As condições de ciclagem consistiram em ciclos de: 2 min a 50°C (incubação), 10 min a 95°C

(ativação da enzima *Taq* polimerase), seguidos de 40 ciclos, cada um com duas fases: 15 s a 95° C (denaturação) e 60 s a 60° C (associação/extensão-deteção).

Além das curvas de amplificação, foram realizadas as curvas de dissociação para verificar a especificidade da amplificação, confirmando a ausência da formação de dímeros de primer ou qualquer outro produto inespecífico, garantindo a confiabilidade dos resultados. Os dados foram normalizados com base na expressão do gene constitutivo e analisados levando-se em consideração a eficiência da reação em cada uma das triplicatas, pela determinação da inclinação da reta obtida pelo gráfico de amplificação.

4.4 Avaliação dos resultados e análise estatística

A expressividade dos receptores analisados foi avaliada nos indivíduos portadores de UAR em relação aos controles e comparada estatisticamente, considerando-se também as células avaliadas (tecido da mucosa bucal ou sangue periférico), através do teste estatístico T-Student (programa BioEstat 5.0, Manuel Ayres, 2007 – Pará, Brasil).

5 RESULTADOS

5.1 Características gerais dos pacientes

Foram avaliados 42 pacientes portadores de UAR, 27 mulheres e 15 homens, com média de idade de $36,3 \pm 11,4$, em relação à história de sua doença, tratamentos anteriores (Apêndice B). As características destes pacientes estão sumarizadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Caracterização dos portadores de UAR em acompanhamento no Ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOUSP

Características	Pacientes UAR N (%)
História familiar positiva	25 (59,5)
Severidade	
Leve	6 (14,3)
Moderado	13 (30,9)
Severo	23 (54,8)
Tipo de UAR	
Menor	38 (90,5)
Maior	4 (9,5)
Herpetiforme	0 (0)
Fatores desencadeantes ou agravantes	
Estresse	31 (74)
Alimentos	26 (70)
Trauma	24 (57,1)
Ciclo menstrual	4 (9,5)
Creme dental	1 (2,4)
Satisfação com a terapêutica	
Sim	8 (19)
Não	34 (81)

A pontuação obtida pelo questionário OHIP-14 foi significativamente pior nos indivíduos portadores de UAR ($27,6 \pm 10,4$) em relação ao grupo controle, pareado por sexo, idade e estado de saúde bucal. ($4,2 \pm 5,4$, $P < 0,000$). Entretanto, não foi observada diferença significativa entre os portadores de quadros severos de UAR ($31,6 \pm 9,2$) e aqueles com quadros de leve a moderado ($22,5 \pm 10,1$; $P = 0,063$).

Nenhum dos pacientes portadores de UAR apresentou qualquer valor fora da faixa considerada de normalidade para os exames laboratoriais realizados (hemograma, dosagens séricas de ferritina, folato e vitamina B12).

Histologicamente observou-se, no fragmento enviado ao Laboratório de Patologia Cirúrgica da FOUSP, revestimento por epitélio pavimentoso estratificado hiperparaqueratinizado, que exibia exocitose e degeneração hidrópica e área de solução de continuidade, com exposição do tecido conjuntivo subjacente. A lâmina própria é constituída por tecido conjuntivo denso com intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (Figura 5.1).

Figura 5.1 - Corte histológico da UAR (10x), evidenciando processo inflamatório crônico inespecífico com ulceração

5.2 Avaliação da expressão dos receptores Toll-Like

Foram coletadas amostras de cinco indivíduos portadores de UAR, três mulheres e dois homens, com média de idade de 44,2 ($\pm 14,3$), que apresentavam quadro severo da doença, com lesão recente e sem uso de medicação para o tratamento destas no momento da coleta.

E de quatro indivíduos, duas mulheres e dois homens, com média de idade de 41 anos ($\pm 15,68$). Indivíduos voluntários que não apresentavam características clínicas de inflamação na mucosa bucal.

A reação de PCR em tempo real foi considerada adequada quando se observava na curva de dissociação um pico único, correspondente a temperatura de dissociação do produto de PCR específica para cada iniciador (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Exemplo de curva de dissociação adequada (extraída do programa do 7300 Real-Time PCR System – Applied Biosystems)

Para o cálculo dos níveis de expressão foram considerados os valores associados à real eficiência da reação. Para tanto, se delimitou a faixa em que as curvas logarítmicas de amplificação (Figura 5.3) de todas as amostras se apresentavam lineares (Figura 5.4) e por meio da determinação da inclinação de cada um desses segmentos de reta, calculou-se a eficiência da reação (E) de acordo com a seguinte fórmula:

$$E=10^{-1/\text{inclinação}}$$

O Ct equivalente de cada amostra foi determinado por meio do cálculo da equação da reta delimitada anteriormente.

Figura 5.3 - Exemplo de curvas logarítmicas de amplificação: log da fluorescência X números de ciclos (amostras: A3.1, A3.2, C2.1, C2.2; iniciador: β -actina)

Figura 5.4 - Delimitação da faixa em que as curvas de amplificação das amostras analisadas se apresentam lineares

O nível de expressão dos diferentes TLR em cada amostra, normalizado pela expressão do gene constitutivo (controle interno), foi obtido utilizando-se o seguinte cálculo, para cada amostra:

$$R = \frac{E_{\text{TLR-2}}^{-\text{Ct TLR-2}}}{E_{\beta\text{-actina}}^{\text{Ct } \beta\text{-actina}}}$$

Os dados obtidos foram utilizados para o desenho de um gráfico sumarizando a diferença de expressão entre UAR e controles nas amostras de sangue e nas amostras de tecido (Figura 5.5), bem como para a análise estatística.

Figura 5.5 - Gráfico da análise da expressão dos TLR, normalizada pelo gene constitutivo β -actina, nas amostras de sangue e de tecido do grupo UAR em relação ao grupo controle

Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre a expressão dos TLR analisados entre os grupos UAR e controle tanto nas amostras de sangue quanto nas amostras de tecido.

6 DISCUSSÃO

As aftas recebem atenção das ciências da saúde desde Hipócrates e, apesar de sua distribuição mundial e do imenso esforço já aplicado por cientistas de todo o planeta em busca do esclarecimento dessa doença, que tanto incomoda seu portador, ainda se navega em um mar de suposições e poucas rotas estabelecidas. A etiologia ainda é desconhecida, o diagnóstico é baseado em expressão clínica e o tratamento sintomático.

Até mesmo a sua denominação é discutida. Apesar da utilização da nomenclatura ulceração aftosa recorrente para esta doença, este termo é redundante, uma vez que aphthae (origem grega) significa úlcera. Seria, então, mais apropriada a denominação estomatite aftosa visto que estas úlceras afetam especificamente a mucosa bucal (CASIGLIA, 2002). O termo estomatite aftosa recorrente é amplamente utilizado na literatura inglesa e consta como a principal denominação no DeCS (Descritores em Ciências da Saúde – Biblioteca Virtual da Saúde).

6.1 Características gerais da população portadora de UAR

Em relação aos pacientes portadores de UAR acompanhados no Ambulatório de Estomatologia Clínica da FOUSP não observamos predileção por raça e status socioeconômico, assim como foi observado no estudo de Casiglia (2002), mas

contrapondo-se a outros estudos que verificaram predominância em classes socioeconômicas mais elevadas (SHIP, 1972) e em indivíduos da raça branca (RIVERA-HIDALGO; SHULMAN; BEACH, 2004).

A faixa etária foi semelhante para ambos os sexos, com média de idade de 36.3 (± 11.4) anos, mas o número de mulheres afetadas foi aproximadamente o dobro do número de homens. Apesar deste número de pacientes corresponder à demanda espontânea e não a um estudo epidemiológico, a predominância no sexo feminino também foi observada em outros estudos (FAHMY, 1976; MILLER; SHIP; RAM, 1977).

Os resultados conflitantes dos estudos epidemiológicos se devem às dificuldades e limitações em sua execução, relacionados à seleção do grupo estudado, por exemplo, grupos de estudantes de medicina tendem a pertencerem a uma classe social mais elevada, e pacientes de clínicas estomatológicas ou hospitais se apresentam em maior número devido aos encaminhamentos para diagnóstico e tratamento. Bem como em relação ao comportamento da doença, em que o indivíduo pode experimentar períodos indeterminados sem recorrência, e a inexistência de exame laboratorial capaz de distinguir os indivíduos susceptíveis dos não susceptíveis (SHIP, 1972).

Tendo em vista que o atendimento dos pacientes acompanhados nesta pesquisa aconteceu em ambulatório especializado, estes apresentavam, em sua maioria, quadro severo de UAR (54,8%) e buscavam novas terapias, visto que as já experimentadas por conta própria e prescritas por outros profissionais não surtiram resultados satisfatórios (81%).

A presença das lesões provoca impacto negativo na qualidade de vida, em relação à saúde bucal, quando comparada a indivíduos controle que apresentavam

a mesma condição de saúde bucal (elementos dentais e reabilitação). Observou-se também que o nível de impacto na qualidade de vida independe da severidade do quadro, desde que não houve diferença significativa entre aqueles com quadro leve a moderado em relação àqueles com quadro severo. Mas, no geral, o prejuízo é maior para indivíduos que apresentam as lesões com maior frequência (MUMCU et al., 2007).

O tipo de UAR mais freqüentemente observado foi o tipo menor (90,5%), seguido do tipo maior (9,5%), não tendo sido observado o quadro herpetiforme em nenhum dos pacientes acompanhados, mantendo-se correspondência com dados da literatura, que descreve freqüência do tipo menor acima dos 80% e a forma herpetiforme como a mais rara entre as UAR (SCULLY; GORSKY; LOZADA-NUR, 2003; WOO; SONIS, 1996).

Os relatos de história familiar foram freqüentes na casuística (59,5%), assim como observado na literatura (JABER et al. 2001; KOYBASI et al., 2006; MCCULLOUGH; ABDEL-HAFETH; SCULLY, 2007; SCULLY; GORSKY; LOZADA-NUR, 2003; SHIP, 1965; SHIP, 1996; SHOHAT-ZABARSKI et al., 1992), evidenciando o envolvimento genético na UAR - ainda não esclarecido. Desta forma as diferenças nos resultados observados nos estudos de polimorfismos para os genes das citocinas TNF- α e IL-6 (BAZRAFSANI et al., 2002a, 2002b; GUIMARÃES et al., 2007) podem estar relacionadas a diferenças entre as populações estudadas e outros fatores genéticos ainda não identificados, concorrentes à predisposição à UAR.

Não foram observadas quaisquer alterações no hemograma e nas dosagens séricas de ferritina, vitamina B12 e folato nos portadores de UAR acompanhados neste trabalho, resultado semelhante ao obtido no estudo de Olson et al. (1982).

Diversas investigações europeias detectaram uma ou mais alterações (CHALLACOMBE; BARKHAN; LEHNER, 1977; KOYBASI et al., 2006; PORTER; SCULLY; FLINT, 1988; WRAY et al., 1978), mas pouco se estudou sobre essas relações na população brasileira. As diferenças entre os resultados dos estudos das alterações hematológicas em pacientes UAR podem estar relacionadas à população estudada e à localização geográfica. Sugere-se um estudo prospectivo para elucidação da questão e o conseqüente estabelecimento de protocolo de manejo baseado em evidências.

Os fatores desencadeantes mais relatados pelos pacientes neste estudo foram: estresse (74%), alimentos (70%) e trauma (57%). Embora estes fatores tenham sido exaustivamente estudados, parecem não representar papel central na etiopatogenia da UAR. É conhecida a relação positiva entre o estresse e o desenvolvimento da UAR em indivíduos predispostos (CHIAPPELLI; CAJULIS, 2004; KAUFMAN, 1976; LARATO, 1972; SOTO-ARAYA; ALCAYAGA; ESGUEP, 2004; SUGAYA et al., 2006), mas se desconhece o mecanismo desta interação. Sabe-se que a indução mecânica de lesões leva ao desenvolvimento de UAR (WRAY, GRAYKOWSKI; NOTKINS, 1981).

Mas relatos de desenvolvimento de UAR relacionado à hipersensibilidade (medicações ou alimentos) são contraditórios, os estudos analisados apresentam metodologias diversas e deficientes (MCCULLOUGH; ABDEL-HAFETH; SCULLY, 2007). A queixa mais freqüente está relacionada à utilização de alimentos ácidos, porém são necessários outros estudos a fim de confirmar esta correlação e qual o exato mecanismo de ação envolvido. Tratar-se-ia de reação de hipersensibilidade clássica ou apenas uma ação local, com redução ou enfraquecimento da barreira mucosa, permitindo a penetração de antígenos responsáveis pelo desencadeamento

de outros mecanismos de reação imunitária, mais diretamente relacionados à gênese da expressão clínica das UAR?

A relação com ciclo menstrual (9,5%) e com o uso de creme dental (2,4%) foi bastante discreta em nossa casuística. Apesar de ter sido relatado como fator desencadeante por alguns pacientes, estudos já realizados não estabeleceram associação entre UAR e o período menstrual (MCCARTAN; SULIVAN, 1992).

Para o tratamento da UAR, se recomenda afastar os fatores predisponentes e tratar doenças de base eventualmente relacionadas às ulcerações, como as deficiências nutricionais (CHALLACOMBE; BARKHAN; LEHNER, 1977; KOYBASI et al., 2006; NOLAN et al., 1991a; PORTER; SCULLY; FLINT, 1988; WRAY et al., 1978), antes de se introduzir uma terapia mais específica. Mudanças na dieta e de produtos utilizados para higiene oral são alternativas que devem ser consideradas (CASIGLIA, 2002; HERLOFSON; BARKVOLL, 1994; NOLAN et al., 1991b).

6.2 Metodologia utilizada

Optou-se pelo estudo da expressão de receptores toll-like nas células mononucleares do sangue, em virtude de que estas expressam os receptores estudados e estão intimamente relacionadas às alterações inflamatórias presentes na UAR (PEDERSEN et al., 1989; PEDERSEN et al., 1991; SISTIG et al., 2001).

O isolamento das células sanguíneas se processou por centrifugação em reagente Ficoll. Apesar de alguns trabalhos apontarem desvantagens no uso deste reagente, como a indução da expressão ex vivo de certas citocinas (KVARNSTRÖM;

JENMALM; EKERFELT, 2004), demonstrou-se que o RNA proveniente dos eritrócitos imaturos (reticulócitos) pode corresponder a 70% do RNA extraído do sangue total, uma vez que o número de eritrócitos é muito superior ao dos leucócitos. Desta forma, este tipo celular “contaminante” influencia negativamente a sensibilidade e especificidade dos experimentos subseqüentes, tais como PCR e microarray (AFFIMETRIX INC, 2003).

Cabe ainda ressaltar a influência do anticoagulante utilizado. Neste estudo optou-se pela utilização do EDTA, pois é compatível com o processamento utilizando-se Ficoll, não estimula mudanças *ex vivo* na expressão de citocinas, por exemplo (RICHES et al., 1992), e não interfere nas atividades das enzimas de transcrição reversa e Taq polimerase (SCHITTEK et al., 1999).

De qualquer maneira, a escolha de um único método de coleta e processamento para todas as amostras, minimiza a influência destas variáveis nos resultados (HÄRTEL et al., 2001).

Em relação ao PCR, apesar do método convencional (qualitativo) apresentar menor custo, o PCR em tempo real (quantitativo) faz a análise do produto da reação desde a fase exponencial do ensaio e fornece resultados mais acurados quanto a quantificação, visto que não analisa apenas o final da reação (platô) e dispensa a eletroforese (BUSTIN, 2000).

A forma de analisar os dados obtidos após a reação de PCR é bastante importante. Neste estudo, optou-se pela avaliação da eficiência real da reação em relação ao método do $\Delta\Delta C_t$, em que se assume que a eficiência da reação é igual a 2, ou seja, que cada ciclo da reação dobrou o número de moléculas. Desta forma se admite eficiência máxima e igual para a amplificação do gene alvo e do gene controle. Mas sabe-se que a eficiência do PCR pode ser influenciada por diversas

variáveis relacionadas ao preparo da reação, bem como, à purificação dos ácidos nucleicos. De forma que a eficiência dificilmente será a mesma entre amostras processadas em momentos diferentes, ou até mesmo na triplicata de uma mesma amostra (TELLMANN, 2003). A avaliação com base na eficiência real proporciona resultados precisos, compatíveis com a qualidade dos dados gerados por este tipo de experimento.

6.3 Expressão dos receptores Toll-Like

Os receptores Toll-Like são responsáveis pelo reconhecimento de diversos tipos de componentes e produtos de microrganismos e, conseqüentemente, pelo desencadeamento da resposta inflamatória. O reconhecimento de imunocomplexos próprios do organismo pelos TLR já foi descrito e está relacionado à predisposição às doenças auto-imunes. Bastante evidente no caso do TLR-9, em que o agonista CpG (fragmento de DNA não metilado), produzido por bactérias e vírus, também está presente no genoma humano. A não remoção de células apoptóticas do organismo proporciona derramamento de cromatina que, livre, pode ativar o TLR-9 e desencadear doença auto-imune (PASARE; MEDZHITOV, 2005).

A ativação dos TLR por meio de elementos endógenos também foi relatada em modelos de inflamação estéril, sugerindo-se que os TLR podem não discriminar adequadamente os ácidos nucleicos humanos dos de origem microbiana (BARRAT et al., 2005).

As diferentes respostas dos TLR que resultam em susceptibilidade a infecções ou a doenças inflamatórias podem estar relacionadas à herança de diferentes polimorfismos, mas a determinação destes ainda necessita maiores investigações. Por exemplo, o polimorfismo Arg753Gln do TLR-2 está relacionado ao desenvolvimento de tuberculose e diabetes, mas não foi demonstrado em Doença de Behçet. Apesar disso, não se descarta a participação do TLR-2 nesta doença, visto que se observou, por citometria de fluxo, maior expressão do TLR-2 em granulócitos que em monócitos dos portadores de Behçet. Assim sendo os diferentes tipos celulares envolvidos podem apresentar diferentes vias de ativação no processo de desenvolvimento da doença (BACANLI et al., 2006).

A expressão diferencial dos TLR na mucosa intestinal, em conjunto com outros mecanismos da tolerância oral, colabora com a inibição da resposta inflamatória aos microrganismos comensais. Por exemplo, o TLR-4 – que tem como agonista o LPS produzido por diversas bactérias habitantes do trato digestório – é pouco expresso e o TLR-5 – que reconhece bactérias patogênicas – apresenta maior expressão (SHIH; TARGAN, 2008). O aumento da expressão do TLR-4 proporcionaria, pela interação do receptor com produtos das bactérias comensais, o desencadeamento de resposta inflamatória em condições não patológicas.

Proteínas do choque térmico (HSP), já observadas na UAR (HASAN et al., 1995, 2002), também induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias pela interação com os TLR. A ativação dos TLR-2 e TLR-4 por HSP60 e HSP70 proporciona a ativação de uma cascata de eventos, entre eles a produção de TNF- α (OSTERLOH; BRELOER, 2008), citocina esta exaustivamente estudada na UAR (ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2007; BAZRAFSHANI et al., 2002a; BORAS et al.,

2006; DALGHOUS; FREYSDOTTIR; FORTUNE, 2006; GUIMARÃES et al., 2007; LEWKOWICZ et al., 2005).

A estimulação dos TLR proporciona aumento na produção de citocinas inflamatórias e supressão dos linfócitos regulatórios (LIU et al., 2006), alterações estas já determinadas na UAR (LEWKOWICZ et al., 2005, 2008).

Infecções crônicas ou o aumento quantitativo do número de receptores Toll-Like podem levar à indução contínua de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e às conseqüências correspondentes (PASARE; MEDZHITOV, 2005).

Estas observações levaram ao estudo da expressão dos TLR na UAR, especificamente os TLR-2, TLR-4 e TLR-7, pois as alterações quantitativas de citocinas pró-inflamatórias poderiam estar relacionadas à maior expressão destes receptores na UAR, ainda não determinada por estudos prévios.

Optou-se pela avaliação desses em amostras de sangue e tecido, visto que existe um envolvimento sistêmico na UAR (PEDERSEN et al., 1989; PEDERSEN et al., 1991; SISTIG et al., 2001), e o acesso à coleta de amostras de sangue periférico é simples, em relação à biópsia, principalmente no que diz respeito ao grupo controle, importante nestes estudos.

Pouco se sabe sobre a expressão dos TLR na UAR, nestes dois tipos de substrato. Embora possa ocorrer expressão diferencial dos TLR, relacionada ao tipo celular predominante e aos mecanismos de manutenção da tolerância imunológica, a importância desses receptores e a natureza inflamatória das UAR justifica investigações dessa natureza.

Alguns imunossupressores, que sabidamente exercem influência terapêutica nas aftas (SCULLY; GORSKY; LOZADA-NUR; 2003), estão relacionados aos receptores TLR. A dexametasona, um corticosteróide, diminui a expressão do TLR-4

de maneira dose-dependente (MACREDMOND et al., 2007). A cloroquina e seus derivados são antagonistas ao TLR-7 e TLR-9, e utilizados no tratamento de desordens inflamatórias mediadas imunologicamente desde a década de 50 (SUN et al., 2007), tendo sido também testados na UAR (MIMURA, 2001).

Entretanto, não foi possível observar, neste estudo, diferença na expressão dos TLR-2, TLR-4 e TLR-7 de pacientes UAR em relação aos controles, tanto nas amostras de sangue quanto nas de tecido. Esta associação pode ter sido subestimada, devido ao tamanho reduzido da amostra deste estudo, de forma que seria desejável a ampliação do número de indivíduos analisados para conferir consistência a este resultado. Assim como a avaliação dos outros receptores deste grupo.

Além disso, a sinalização conferida pelos TLR é mantida sob controle por seus inibidores. Por exemplo, a exposição prolongada da mucosa intestinal ao LPS produzido pelas bactérias comensais produziria uma resposta contínua, pela interação com o TLR-4, se o mecanismo fisiológico de tolerância não compensasse esta ativação. Mas esta situação induz o aumento da expressão da proteína inibitória de receptores Toll-Like (Tollip) que diminui a resposta do epitélio aos estímulos dos TLR, apesar de sua ativação. Em modelos animais, a diminuição destes inibidores leva a doenças inflamatórias intestinais (SHIH; TARGAN, 2008), sugerindo que o estudo desses inibidores é também importante para a compreensão dos mecanismos envolvidos na UAR.

É possível que esta não seja a principal alteração da reação imunológica no desenvolvimento da UAR, pois se os TLR são o início da seqüência de eventos inflamatórios seria pouco provável que eles fossem os responsáveis diretos pela expressão das UAR, visto que se trata aparentemente de uma reação inflamatória

localizada e superficial. Do ponto de vista das catástrofes, seria mais lógico supor que um evento como as aftas que afetam a superfície de revestimento mucoso deve ser desencadeado por um processo mais terminal e específico no conjunto de fenômenos inflamatórios que acontecem no organismo humano. Esta última conjectura não passa de mera suposição, mas nos abre uma perspectiva bastante ampla e complexa, sugerindo que não apenas o estudo acerca dos receptores e inibidores dos TLR deve ser bastante estendido, como também o entendimento das inter-relações entre os subprodutos da atividade dos TLR e seus sítios de atuação merecerá ainda muito esforço e dedicação por parte da comunidade científica mundial.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste estudo não foi possível verificar diferença na expressão dos receptores Toll-Like – TLR-2, TLR-4 e TLR-7 – de pacientes portadores de UAR em relação a indivíduos controles, assim como entre amostras de tecido e sangue. Sugere-se aprofundamento do estudo, com o aumento da amostra avaliada e envolvimento de outros receptores desta família.

REFERÊNCIAS¹

Affymetrix Inc. An Analysis of blood processing methods to prepare samples for GeneChip® expression profiling (Technical Note), 2003. Disponível em: URL: http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/blood_technote.pdf [2008 June 3].

Albanidou-Farmaki E, Giannoulis L, Markopoulos A, Fotiades S, Aggouridaki X, Farmakis K, et al. Outcome following treatment for *Helicobacter pylori* in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis* 2005;11(1):22-6.

Albanidou-Farmaki E, Markopoulos AK, Kalogerakou F, Antoniadis DZ. Detection, enumeration and characterization of T helper cells secreting type 1 and type 2 cytokines in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Tohoku J Exp Med* 2007;212(2):101-5.

Albanidou-Farmaki E, Pouloupoulos AK, Epivatianos A, Farmakis K, Karamouzis M, Antoniadis D. Increased anxiety level and high salivary and serum cortisol concentrations in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Tohoku J Exp Med* 2008;214(4):291-6.

Alidaee MR, Taheri A, Mansoori P, Ghodsi SZ. Silver nitrate cautery in aphthous stomatitis: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol* 2005;153(3):521-5.

Andrews VH, Hall HR. The effects of relaxation/imagery training on recurrent aphthous stomatitis: a preliminary study. *Psychosom Med* 1990;52(5):526-35.

Arber N, Klein T, Meiner Z, Pras E, Weinberger A. Close association of HLA-B51 and B52 in Israeli patients with Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1991;50(6):351-3.

Atkin PA, Xu X, Thornhill MH. Minor recurrent aphthous stomatitis and smoking: an epidemiological study measuring plasma cotinine. *Oral Dis* 2002;8(3):173-6.

Bacanli A, Sallakci N, Yavuzer U, Alpsoy E, Yegin O. Toll-like receptor 2 Arg753Gln gene polymorphism in Turkish patients with Behçet's disease. *Clin Exp Dermatol* 2006;31(5):699-701.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Barrat FJ, Meeker T, Gregório J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 2005; 202(8):1131–9.

Bazrafshani MR, Hajeer AH, Ollier WE, Thornhill MH. Recurrent aphthous stomatitis and gene polymorphisms for the inflammatory markers TNF-alpha, TNF-beta and the vitamin D receptor: no association detected. *Oral Dis* 2002a;8(6):303-7.

Bazrafshani MR, Hajeer AH, Ollier WE, Thornhill MH. IL-1B and IL-6 gene polymorphisms encode significant risk for the development of recurrent aphthous stomatitis. *Genes Immun* 2002b;3(5):302-5.

Bazrafshani MR, Hajeer AH, Ollier WE, Thornhill MH. Polymorphisms in the IL-10 and IL-12 gene cluster and risk of developing recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis* 2003;9(6):287-91.

Ben Ahmed M, Houman H, Miled M, Dellagi K, Louzir H. Involvement of chemokines and Th1 cytokines in the pathogenesis of mucocutaneous lesions of Behçet's disease. *Arthritis Rheum* 2004;50(7):2291-5.

Ben-Aryeh H, Malberger E, Gutman D, Szargel R, Anavi Y. Salivary IgA and serum IgG and IgA in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976;42(6):746-52.

Bittoun R. Recurrent aphthous ulcers and nicotine. *Med J Aust* 1991;154(7):471-2.

Blanco P, Paluckad K, Pascuald V, Banchereaud J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19(1): 41–52.

Boras VV, Lukac J, Brailo V, Picek P, Kordic D, Zilic IA. Salivary interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in patients with recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 2006;35(4):241-3.

Borra RC, Andrade PM, Silva ID, Morgun A, Weckx LL, Smirnova AS, et al. The Th1 /Th2 immune-type response of the recurrent aphthous ulceration analyzed by cDNA microarray. *J Oral Pathol Med* 2004; 33(3):140-6.

Boulinguez S, Reix S, Bedane C, Debrock C, Bouyssou-Gauthier ML, Sparsa A, et al. Role of drug exposure in aphthous ulcers: a case-control study. *Br J Dermatol* 2000;143(6):1261-5.

Brice SL, Cook D, Leahy M, Huff JC, Weston WL. Examination of the oral mucosa and peripheral blood cells of patients with recurrent aphthous ulceration for human herpesvirus DNA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89(2):193-8.

Bubirova A. Is B12 vitamin deficiency really the cause of recurrent aphthous stomatitis? [letter] *Am J Otolaryngol* 2007;28(4):288.

Buno IJ, Huff JC, Weston WL, Cook DT, Brice SL. Elevated levels of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha, interleukins 2, 4, and 5, but not interleukin 10, are present in recurrent aphthous stomatitis. *Arch Dermatol* 1998;134(7):827-31.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25(2):169-93.

Campisi G, Spadari F, Salvato A. il sucralfato in odontostomatologia: nostra esperienza clinica. *Minerva Stomatol* 1997;46:297-305.

Carpenter WM, Silverman S Jr. Over-the-counter products for oral ulcerations. *J Calif Dent Assoc* 1998;26(3):199-201.

Casiglia JM. Recurrent aphthous stomatitis: etiology, diagnosis, and treatment. *Gen Dent* 2002; 50(2):157-66.

Challacombe SJ, Barkhan P, Lehner T. Haematological features and differentiation of recurrent oral ulceration. *Br J Oral Surg* 1977;15(1):37-48.

Chiappelli F, Cajulis OS. Psychobiologic views on stress-related oral ulcers. *Quintessence Int* 2004; 35(3):223-7.

Cimen MY, Kaya TI, Eskandari G, Tursen U, Ikizoglu G, Atik U. Oxidant/antioxidant status in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Clin Exp Dermatol* 2003;28(6):647-50.

Cui G, Olsen T, Christiansen I, Vonen B, Florholmen J, Goll R. Improvement of real-time polymerase chain reaction for quantifying TNF-alpha mRNA expression in inflamed colorectal mucosa: an approach to optimize procedures for clinical use. *Scand J Clin Lab Invest* 2006;66(3):249-59.

Dagalis P, Bagg J, Walker DM. Spontaneous migration and chemotactic activity of neutrophil polymorphonuclear leukocytes in recurrent aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987;64(3):298-301.

Dalghous AM, Freysdottir J, Fortune F. Expression of cytokines, chemokines, and chemokine receptors in oral ulcers of patients with Behcet's disease (BD) and recurrent aphthous stomatitis is Th1-associated, although Th2-association is also observed in patients with BD. *Scand J Rheumatol* 2006;35(6):472-5.

Eversole LR, Shopper TP, Chambers DW. Effects of suspected foodstuff challenging agents in the etiology of recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982;54(1):33-8.

Fahmy MS. Recurrent aphthous ulcerations in a mixed Arab community. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1976 Jul;4(4):160-4.

Ferguson MM, Carter J, Boyle P. An epidemiological study of factors associated with recurrent aphthae in women. *J Oral Med* 1984;39(4):212-7.

Field EA, Brookes V, Tyldesley WR. Recurrent aphthous ulceration in children--a review. *Int J Paediatr Dent* 1992;2(1):1-10.

Fritscher AM, Cherubini K, Chies J, Dias AC. Association between *Helicobacter pylori* and recurrent aphthous stomatitis in children and adolescents. *J Oral Pathol Med* 2004;33(3):129-32.

Gorsky M, Epstein J, Raviv A, Yaniv R, Truelove E. Topical minocycline for managing symptoms of recurrent aphthous stomatitis. *Spec Care Dentist* 2008;28(1):27-31.

Grady D, Ernster VL, Stillman L, Greenspan J. Smokeless tobacco use prevents aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;74(4):463-5.

Greenspan JS, Gadol N, Olson JA, Talal N. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in recurrent aphthous ulceration. *Clin Exp Immunol* 1981;44(3):603-10.

Gribar SC, Anand RJ, Sodhi CP, Hackam DJ. The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. *J Leukoc Biol* 2008;83(3):493-8.

Guimarães AL, Sá AR, Victória JM, Correia-Silva JF, Pessoa PS, Diniz MG, et al. Association of interleukin-1beta polymorphism with recurrent aphthous stomatitis in Brazilian individuals. *Oral Dis* 2006;12(6):580-3.

Guimarães AL, Correia-Silva JF, Sá AR, Victória JM, Diniz MG, Costa FO, et al. Investigation of functional gene polymorphisms IL-1beta, IL-6, IL-10 and TNF-alpha in individuals with recurrent aphthous stomatitis. *Arch Oral Biol* 2007;52(3):268-72.

Gurel A, Altinyazar HC, Unalacak M, Armutcu F, Koca R. Purine catabolic enzymes and nitric oxide in patients with recurrent aphthous ulceration. *Oral Dis* 2007;13(6):570-4.

Hasan A, Childerstone A, Pervin K, Shinnick T, Mizushima Y, Van der Zee R, et al. Recognition of a unique peptide epitope of the mycobacterial and human heat shock protein 65-60 antigen by T cells of patients with recurrent oral ulcers. *Clin Exp Immunol* 1995;99(3):392-7.

Hasan A, Shinnick T, Mizushima Y, van der Zee R, Lehner T. Defining a T-cell epitope within HSP 65 in recurrent aphthous stomatitis. *Clin Exp Immunol* 2002;128(2):318-25.

Härtel C, Bein G, Müller-Steinhardt M, Klüter H. Ex vivo induction of cytokine mRNA expression in human blood samples. *J Immunol Methods* 2001;249(1-2):63-71.

Hartsfield CE. Recurrent aphthous ulcer: an effective method of self-treatment. *Gen Dent* 1990;38(3):194-5.

Häyrinen-Immonen R, Nordström D, Malmström M, Hietanen J, Konttinen YT. Immune-inflammatory cells in recurrent oral ulcers (ROU). *Scand J Dent Res* 1991;99(6):510-8.

Häyrinen-immonen R, Sorsa T, Pettilä J, Konttinen YT, Teronen O, Malmström M. Effect of tetracyclines on collagenase activity in patients with recurrent aphthous ulcers. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 269-72.

Herlofson BB, Barkvoll P. Sodium lauryl sulfate and recurrent aphthous ulcers. A preliminary study. *Acta Odontol Scand* 1994;52(5):257-9.

Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR, Sandstedt B, Bremme K, Ekström ES, et al. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. *Immunology* 2002;107(1):145-51.

Jaber L, Weinberger A, Klein T, Yaniv I, Mukamel M. Close association of HLA-B52 and HLA-B44 antigens in Israeli Arab adolescents with recurrent aphthous stomatitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127(2):184-7.

Jurge S, Kuffer R, Scully C, Porter SR. Mucosal disease series. Number VI. Recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis* 2006;12(1):1-21.

Kaburaki T, Fujino Y, Kawashima H, Merino G, Numaga J, Chen J, et al. Plasma and whole-blood chemokine levels in patients with Behçet's disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241:353-8.

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001;194(6):863-9.

Kajita K, Honda T, Amanuma R, Domon H, Okui T, Ito H, et al. Quantitative messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon-alpha1 in gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(6):398-402.

Karaca S, Seyhan M, Senol M, Harputluoglu MM, Ozcan A. The effect of gastric *Helicobacter pylori* eradication on recurrent aphthous stomatitis. *Int J Dermatol* 2008;47(6):615-7.

Karincaoglu Y, Batcioglu K, Erdem T, Esrefoglu M, Genc M. The levels of plasma and salivary antioxidants in the patient with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2005;34(1):7-12.

Kaufman AY. Aphthous stomatitis as a featuring syndrome of emotional stress in dental treatment. *Quintessence Int Dent Dig* 1976;7(9):75-8.

Koybasi S, Parlak AH, Serin E, Yilmaz F, Serin D. Recurrent aphthous stomatitis: investigation of possible etiologic factors. *Am J Otolaryngol* 2006;27(4):229-32.

Kvarnström M, Jenmalm MC, Ekerfelt C. Effect of cryopreservation on expression of Th1 and Th2 cytokines in blood mononuclear cells from patients with different cytokine profiles, analysed with three common assays: an overall decrease of interleukin-4. *Cryobiology* 2004;49(2):157-68.

Lake RI, Thomas SJ, Martin NG. Genetic factors in the aetiology of mouth ulcers. *Genet Epidemiol* 1997;14(1):17-33.

Lamba DA, Karl MO, Ware CB, Reh TA. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(34):12769-74.

Landesberg R, Fallon M, Insel R. Alterations of T helper/inducer and T suppressor/inducer cells in patients with recurrent aphthous ulcers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990;69(2):205-8.

Larato DC. Stress and aphthous ulcers. *J Acad Gen Dent* 1972;20(5):25-6.

Lang KS, Recher M, Junt T, Navarini AA, Harris NL, Freigang S, et al. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat Med* 2005;11(2):138-45.

Lehner T. Immunologic aspects of recurrent oral ulcers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972;33(1):80-5.

Lewkowicz N, Lewkowicz P, Kurnatowska A, Banasik M, Glowacka E, Cedzynski M, et al. Innate immune system is implicated in recurrent aphthous ulcer pathogenesis. *J Oral Pathol Med* 2003;32(8):475-81.

Lewkowicz N, Lewkowicz P, Banasik M, Kurnatowska A, Tchorzewski H. Predominance of Type 1 cytokines and decreased number of CD4(+)CD25(+high) T regulatory cells in peripheral blood of patients with recurrent aphthous ulcerations. *Immunol Lett* 2005;99(1):57-62.

Lewkowicz N, Lewkowicz P, Dzitko K, Kur B, Tarkowski M, Kurnatowska A, et al. Dysfunction of CD4(+)CD25(high) T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2008 [Epub ahead of print]

Liu H, Komai-Koma M, Xu D, Liew FY. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(18):7048-53.

Lotufo MA, Lemos Júnior CA, Shimizu MT, Cabral R, Birman EG. Clinical evaluation of the topical use of propolis in recurrent minor aphthous ulceration. *Ciênc Odontol Bras* 2005;8(3):6-9.

MacRedmond RE, Greene CM, Dorscheid DR, McElvaney NG, O'Neill SJ. Epithelial expression of TLR4 is modulated in COPD and by steroids, salmeterol and cigarette smoke. *Respir Res* 2007;8:84.

Marakoglu K, Sezer RE, Toker HC, Marakoglu I. The recurrent aphthous stomatitis frequency in the smoking cessation people. *Clin Oral Investig* 2007;11(2):149-53.

Marchini L, Campos MS, Silva AM, Paulino LC, Nobrega FG. Bacterial diversity in aphthous ulcers. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(4):225-31.

McCartan BE, Sullivan A. The association of menstrual cycle, pregnancy, and menopause with recurrent oral aphthous stomatitis: a review and critique. *Obstet Gynecol* 1992;80(3 Pt 1):455-8.

McCartan BE, Lamey PJ, Wallace AM. Salivary cortisol and anxiety in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 1996;25(7):357-9.

McCullough MJ, Abdel-Hafeth S, Scully C. Recurrent aphthous stomatitis revisited; clinical features, associations, and new association with infant feeding practices? *J Oral Pathol Med* 2007;36(10):615-20.

Miller MF, Ship II, Ram C. A retrospective study of the prevalence and incidence of recurrent aphthous ulcers in a professional population, 1958-1971. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977;43(4):532-7.

Mimura MAM. Avaliação clínica do tratamento medicamentoso sistêmico das ulcerações aftosas recorrentes bucais [Tese de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2001.

Monsuur AJ, Bakker PI, Zhernakova A, Pinto D, Verduijn W, Romanos J, et al. Effective detection of human leukocyte antigen risk alleles in celiac disease using tag single nucleotide polymorphisms. *PLoS ONE* 2008;3(5):e2270.

Mumcu G, Hayran O, Ozalp DO, Inanc N, Yavuz S, Ergun T, et al. The assessment of oral health-related quality of life by factor analysis in patients with Behcet's disease and recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2007;36(3):147-52.

Natah SS, Hayrinen-Immonen R, Hietanen J, Patinen P, Malmstrom M, Savilahti E, et al. Increased density of lymphocytes bearing gamma/delta T-cell receptors in recurrent aphthous ulceration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000;29(5):375-80.

Natah SS, Konttinen YT, Enattah NS, Ashammakhi N, Sharkey KA, Hayrinen-Immonen R. Recurrent aphthous ulcers today: a review of the growing knowledge. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33(3):221-34.

Nolan A, McIntosh WB, Allam BF, Lamey PJ. Recurrent aphthous ulceration: vitamin B1, B2 and B6 status and response to replacement therapy. *J Oral Pathol Med* 1991a;20(8):389-91.

Nolan A, Lamey PJ, Milligan KA, Forsyth A. Recurrent aphthous ulceration and food sensitivity. *J Oral Pathol Med* 1991b;20(10):473-5.

Oliveira BH, Nadanovsky P. Psychometric properties of the Brazilian version of the Oral Health Impact Profile-short form. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33(4):307-14.

Olson JA, Feinberg I, Silverman S Jr, Abrams D, Greenspan JS. Serum vitamin B12, folate, and iron levels in recurrent aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982;54(5):517-20.

Orbak R, Cicek Y, Tezel A, Dogru Y. Effects of zinc treatment in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Dent Mater J* 2003;22(1):21-9.

Osterloh A, Breloer M. Heat shock proteins: linking danger and pathogen recognition. *Med Microbiol Immunol* 2008;197(1):1-8.

Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 2005;560:11-8.

Pedersen A. Psychologic stress and recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 1989;18(2):119-22.

Pedersen A, Klausen B, Hougen HP, Stenvang JP. T-lymphocyte subsets in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 1989;18(1):59-60.

Pedersen A, Klausen B, Hougen HP, Ryder LP. Peripheral lymphocyte subpopulations in recurrent aphthous ulceration. *Acta Odontol Scand* 1991;49(4):203-6.

Pedersen A, Pedersen BK. Natural killer cell function and number of peripheral blood are not altered in recurrent aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;76(5):616-9.

Pedersen A, Ryder LP. Gamma delta T-cell fraction of peripheral blood is increased in recurrent aphthous ulceration. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72(1):98-104.

Porter SR, Scully C, Flint S. Hematologic status in recurrent aphthous stomatitis compared with other oral disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988;66(1):41-4.

Porter SR, Scully C. Aphthous ulcer (recurrent). *BMJ Clin Evid* 2007;12:1303.

Prezeau N, Silvy M, Gabert J, Picard C. Assessment of a new RNA stabilizing reagent (Tempus Blood RNA) for minimal residual disease in onco-hematology using the EAC protocol. *Leuk Res* 2006;30(5):569-74.

Prolo P, Domingo DL, Fedorowicz Z, Outhouse TL. Interventions for recurrent aphthous stomatitis (mouth ulcers). (Protocol) *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2005, Issue 3.

Redwine L, Snow S, Mills P, Irwin M. Acute psychological stress: effects on chemotaxis and cellular adhesion molecule expression. *Psychosom Med* 2003;65(4):598-603.

Rhodus NL, Bereuter J. An evaluation of a chemical cautery agent and an anti-inflammatory ointment for the treatment of recurrent aphthous stomatitis: a pilot study. *Quintessence Int* 1998;29(12):769-73.

Riches P, Gooding R, Millar BC, Rowbottom AW. Influence of collection and separation of blood samples on plasma IL-1, IL-6 and TNF-alpha concentrations. *J Immunol Methods* 1992;153(1-2):125-31.

Riggio MP, Lennon A, Ghodrathnama F, Wray D. Lack of association between *Streptococcus oralis* and recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2000a;29(1):26-32.

Riggio MP, Lennon A, Wray D. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in recurrent aphthous stomatitis tissue by PCR. *J Oral Pathol Med* 2000b;29(10):507-13.

Rioboo-Crespo Mdel R, Planells-del Pozo P, Rioboo-García R. Epidemiology of the most common oral mucosal diseases in children. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10(5):376-87

Rivera-Hidalgo F, Shulman JD, Beach MM. The association of tobacco and other factors with recurrent aphthous stomatitis in an US adult population. *Oral Dis* 2004;10(6):335-45.

Rodenburg RJ, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Peripheral blood monocytes of rheumatoid arthritis patients do not express elevated TNF alpha, IL-1beta, and IL-8 mRNA levels. A comparison of monocyte isolation procedures. *J Immunol Methods* 1998;221(1-2):169-75.

Sackett DL, Rosenberg WM, Gray JA, Haynes RB, Richardson WS. Evidence based medicine: what it is and what it isn't [editorial]. *BMJ* 1996;312:71-72.

Samet N, Laurent C, Susarla SM, Samet-Rubinstein N. The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: a pilot study. *Clin Oral Investig* 2007;11(2):143-7.

Savage NW, Seymour GJ, Kruger BJ. T-lymphocyte subset changes in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;60(2):175-81.

Scheid P, Bohadana A, Martinet Y. Nicotine patches for aphthous ulcers due to Behçet's syndrome. *N Engl J Med* 2000;343(24):1816-7.

Schittek B, Blaheta HJ, Flörchinger G, Sauer B, Garbe C. Increased sensitivity for the detection of malignant melanoma cells in peripheral blood using an improved protocol for reverse transcription-polymerase chain reaction. *Br J Dermatol* 1999;141(1):37-43.

Scully C, Gorsky M, Lozada-Nur F. The diagnosis and management of recurrent aphthous stomatitis: a consensus approach. *J Am Dent Assoc* 2003;134(2):200-7.

Scully C, Felix DH. Oral medicine--update for the dental practitioner. Aphthous and other common ulcers. *Br Dent J* 2005;199(5):259-64.

Shapiro S, Olson DL, Chellemi SJ. The association between smoking and aphthous ulcers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1970;30(5):624-30.

Sharon-Buller A, Sela M. CO₂-laser treatment of ulcerative lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 332-4.

Sharquie KE, Najim RA, Al-Hayani RK, Al-Nuaimy AA, Maroof DM. The therapeutic and prophylactic role of oral zinc sulfate in management of recurrent aphthous stomatitis in comparison with dapsone. *Saudi Med J* 2008;29(5):734-8.

Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14(3):390-400.

Ship II. Inheritance of aphthous ulcers of the mouth. *J Dent Res* 1965; 44(5):837-44.

Ship II. Epidemiologic aspects of recurrent aphthous ulcerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972;33(3):400-6.

Ship JA. Recurrent aphthous stomatitis. An update. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;81(2):141-7.

Ship JA, Chavez EM, Doerr PA, Henson BS, Sarmadi M. Recurrent aphthous stomatitis. *Quintessence Int* 2000;31(2):95-112.

Shohat-Zabarski R, Kalderon S, Klein T, Weinberger A. Close association of HLA-B51 in persons with recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;74(4):455-8.

Shotts RH, Scully C, Avery CM, Porter SR. Nicorandil-induced severe oral ulceration: a newly recognized drug reaction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;87(6):706-7.

Sistig S, Cekic-Arambasin A, Rabatic S, Vucicevic-Boras V, Kleinheinz J, Piffko J. Natural immunity in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 2001;30(5):275-80.

Soto Araya M, Rojas Alcayaga G, Esguep A. Association between psychological disorders and the presence of Oral lichen planus, Burning mouth syndrome and Recurrent aphthous stomatitis. *Med Oral* 2004; 9(1):1-7.

Stanley HR. Aphthous lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972;33(3):407-16.

Sugaya NN, Migliari DA, Marcucci G, Birman EG. Recurrent aphthous stomatitis: a placebo-controlled clinical trial employing BCG. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1993;7(4):293-6.

Sugaya NN, Birman EG, Costa CR. Enterobacteria and oral ulceration in HIV+ and RAU populations. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1995;9(4):255-8.

Sugaya NN, Gallo CB, Mimura MAM, Vasconcellos EG. Psychological stress on recurrent aphthous stomatitis [abstract P6]. *Oral Diseases* 2006;12(Suppl1):14.

Sun A, Chu CT, Wu YC, Yuan JH. Mechanisms of depressed natural killer cell activity in recurrent aphthous ulcers. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;60(1):83-92.

Sun A, Chang JG, Kao CL, Liu BY, Wang JT, Chu CT, et al. Human cytomegalovirus as a potential etiologic agent in recurrent aphthous ulcers and Behçet's disease. *J Oral Pathol Med* 1996;25(5):212-8.

Sun A, Chang JG, Chu CT, Liu BY, Yuan JH, Chiang CP. Preliminary evidence for an association of Epstein-Barr virus with pre-ulcerative oral lesions in patients with recurrent aphthous ulcers or Behçet's disease. *J Oral Pathol Med* 1998;27(4):168-75.

Sun A, Chu CT, Liu BY, Wang JT, Leu JS, Chiang CP. Expression of interleukin-2 receptor by activated peripheral blood lymphocytes upregulated by the plasma level of interleukin-2 in patients with recurrent aphthous ulcers. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 2000;24(3):116-22.

Sun S, Rao NL, Venable J, Thurmond R, Karlsson L. TLR7/9 antagonists as therapeutics for immune-mediated inflammatory disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2007;6(4):223-35.

Tellmann G. The E-Method: a highly accurate technique for gene-expression analysis [application note]. *Nature Methods* 2003; 3:i-ii.

Thavasus PW, Longhurst S, Joel SP, Slevin ML, Balkwill FR. Measuring cytokine levels in blood. Importance of anticoagulants, processing, and storage conditions. *J Immunol Methods* 1992;153(1-2):115-24.

Tuzun B, Wolf R, Tuzun Y, Serdaroglu S. Recurrent aphthous stomatitis and smoking. *Int J Dermatol* 2000;39(5):358-60.

Victória JM, Kalapothakis E, Silva JF, Gomez RS. *Helicobacter pylori* DNA in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2003;32(4):219-23.

Victória JM, Correia-Silva JF, Pimenta FJ, Kalapothakis E, Gomez RS. Serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2005;34(8):494-7.

Vincent SD, Lilly GE. Clinical, historic, and therapeutic features of aphthous stomatitis. Literature review and open clinical trial employing steroids. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;74(1):79-86.

Wray D, Ferguson MM, Hutcheon WA, Dagg JH. Nutritional deficiencies in recurrent aphthae. *J Oral Pathol* 1978;7(6):418-23.

Wray D, Graykowski EA, Notkins AL. Role of mucosal injury in initiating recurrent aphthous stomatitis. *Br Med J* 1981;283(6306):1569-70.

Woo SB, Sonis ST. Recurrent aphthous ulcers: a review of diagnosis and treatment. *J Am Dent Assoc* 1996;127(8):1202-13.

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

- a. *Pesquisadores responsáveis:* CD Camila de Barros Gallo - Prof Dr Norberto N. Sugaya
- b. *Instituição e departamento:*
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
Departamento de Estomatologia – Disciplina de Semiologia
- c. *Telefone para contato:* (11) 3091-7883
- d. *Título do projeto:* Expressão de receptores Toll-Like (2, 4 e 7) em células do sangue e da mucosa oral de pacientes portadores de ulceração aftosa recorrente
- e. *Objetivos:* As informações abaixo se destinam a esclarecer e pedir a sua participação voluntária neste estudo, que tem por finalidade identificar e evidenciar a participação destes receptores nas aftas bucais.
- f. *Procedimentos a que o Sr (a) será submetido:* 1. Exame clínico padrão desta Instituição, que consiste de entrevista e exame objetivo das estruturas da boca; 2. Solicitação de exames de sangue para pesquisa de deficiências nutricionais, que podem agravar ou desencadear as aftas bucais. Especialmente para este estudo, utilizaremos uma parte do volume de sangue coletado para estudo das proteínas citadas anteriormente, não havendo necessidade de coletas adicionais de sangue. 3. Caso o Sr (a) seja portador de aftas, realizaremos uma biópsia da lesão. Este procedimento não é rotineiramente aplicado, entretanto, a remoção cirúrgica da lesão aftosa abrevia sua duração e, por consequência, o desconforto por ela produzido, além de permitir diagnóstico mais preciso. Caso o Sr (a) não seja portador de aftas, gostaríamos que concordasse em ceder parte do tecido (cerca de 5 milímetros) que será removido no procedimento cirúrgico programado para o tratamento que o Sr (a) necessita, especialmente para esta pesquisa.
- g. *Riscos:* Não há previsão de riscos para este estudo. O procedimento cirúrgico será realizado por profissional habilitado, sob condições adequadas de esterilização, limpeza e anestesia local. A coleta de sangue será realizada por profissional habilitado e seguindo procedimentos rigorosos de limpeza e segurança para o paciente, em laboratório credenciado desta Universidade (Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímica). O material doado para esta investigação, tanto a porção de sangue quanto o tecido, não produz qualquer prejuízo ou defeito em seu organismo.
- h. *Benefícios:* Não haverá benefício direto, mas o Sr (a) receberá toda informação, orientação e o tratamento necessário, sem qualquer custo. Além disso o Sr (a) receberá o resultado dos exames laboratoriais e análises hematológicas para o seu controle. O Sr (a) estará colaborando com a evolução do conhecimento científico nesta área e possibilitando a melhoria dos protocolos de tratamento para esta doença, ainda tão comum quanto desconhecida.
- i. *Sigilo:* As informações obtidas não serão utilizadas para divulgar a sua identidade, nem o material utilizado para outras investigações não relacionadas às aftas bucais. Os pesquisadores responsáveis prestarão esclarecimentos a qualquer momento durante o andamento da pesquisa e o participante pode retirar o consentimento sem ter qualquer prejuízo no atendimento nesta Instituição.

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

São Paulo, ____/____/____

Nome: _____ tel. _____

RG. _____ Ass. _____

APÊNDICE B - Ficha clínica para avaliação do quadro de ulceração aftosa recorrente

AVALIAÇÃO DO QUADRO DE UAR

Nome:.....
 Idade:..... Sexo:..... Cor:..... Estado civil:.....
 Registro Semiologia:..... Data de entrada:...../...../.....
 Telefone:.....

A) Desde quando sofre com aftas?.....

B) Frequência dos surtos (mês):

() 1 () 2 () 3 () sem período de alívio () ano.....

C) Número de lesões por ciclo:

() 1 () 2 () 3 () 4 () 5 () acima de 5

D) Tempo de cicatrização (dias):

() 7-10 () 15-20 () 20-30 () acima de 30

E) Localização mais freqüente:

() assoalho () lábio () mucosa jugal () gengiva () sulco vestibular

Língua: () dorso () borda () ventre

Palato: () duro () mole () pilar

F) Evolução:

() intensidade constante

() surtos de severidade, épocas....., motivo

G) Fatores identificados como desencadeantes ou agravantes:

() estresse () trauma () alimentos () creme dental

() distúrbios gastrintestinais () ciclo menstrual () outros.....

detalhes:.....

H) Membros da família afetados (grau de parentesco):.....

Irmãos (número, afetados ou não):.....

I) Quais e quantos profissionais foram procurados para tratamento da lesão? Resultado.

.....

J) Quais foram os medicamentos ou medidas terapêuticas já utilizados?

.....
.....

L) Quais são os que surtiram efeito mais significativo? Em que época?

.....
.....

M) Que tratamento utiliza atualmente? Por que?

.....
.....

N) Exame físico – Tipo de lesão:

() Minor () Major () Herpetiforme

O) Tratamento proposto:

() tópico

() sistêmico

APÊNDICE C - Ficha clínica para avaliação da saúde geral

AVALIAÇÃO DA SAÚDE GERAL

Nome:.....

Idade:..... Sexo:..... Cor:..... Estado civil:.....

Registro Semilogia:..... Data de entrada:...../...../.....

Telefone:.....

A) Tabagismo ()sim ()não Tempo de uso?..... Tipo:..... Quantidade?..... cig/dia

B) Etilismo ()sim ()não Tempo de uso?..... Tipo:..... Quantidade?.....dose/dia

C) Medicação utilizada:.....

D) HIV / imunodeficiência congênita () sim () não

E) Gravidez () sim () não

F) Distúrbios gastrintestinais () sim () não

G) História de neoplasia maligna, quimio ou radioterapia () sim () não

H) História de insuficiência renal, hepática, hiper ou hipotireoidismo () sim () não

I) Presença destas ulcerações em outras mucosas () sim () não

J) Coleta de sangue

Data:...../...../.....

Hemograma:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ANEXO A - Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 122/06

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa **"Avaliação da expressão das quimiocinas em pacientes portadores de ulceração aftosa recorrente"**, de responsabilidade da Pesquisadora **Camila de Barros Gallo**, sob orientação do Professor Doutor **Norberto Nobuo Sugaya**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 01 de setembro de 2006

Prof. Dr. **Rogério Nogueira de Oliveira**
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO B - Aprovação do Adendo (mudança de título) pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

**DECLARAÇÃO
PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 122/06**

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente a mudança do título de **"Avaliação da expressão das quimiocinas em pacientes portadores de ulceração aftosa recorrente"** para **"Expressão de receptores Toll-Like (2, 4 e 7) em células do sangue e da mucosa oral de pacientes portadores de ulceração aftosa recorrente"** de responsabilidade da Pesquisadora **Camila de Barros Gallo**, sob orientação do Professor Doutor **Norberto Nobuo Sugaya**.

São Paulo, 03 de junho de 2008

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira".
São Paulo - SP - CEP 05508-900 - FAX (0XX11) 3091-7887.

ANEXO C - Questionário de avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde bucal (OHIP-14)

Nome: _____

Versão traduzida e validada do questionário Oral Health Impact Profile (OHIP14)

Leia cada pergunta e faça um círculo ao redor do número à direita que melhor indicar como você geralmente se sente. Não gaste muito tempo em uma única afirmação, mas tente dar a resposta que mais se aproximar de como você se sente geralmente.

AVALIAÇÃO

Nunca – 0 Raramente – 1 Às vezes – 2 Repetidamente – 3 Sempre – 4

Item	Descrição					
1	Você teve problemas para falar alguma palavra?	0	1	2	3	4
2	Você sentiu que o sabor dos alimentos tem piorado?	0	1	2	3	4
3	Você sentiu dores em sua boca ou nos seus dentes?	0	1	2	3	4
4	Você se sentiu incomodado ao comer algum alimento?	0	1	2	3	4
5	Você ficou preocupada?	0	1	2	3	4
6	Você se sentiu estressada?	0	1	2	3	4
7	Sua alimentação ficou prejudicada?	0	1	2	3	4
8	Você teve que parar suas refeições?	0	1	2	3	4
9	Você encontrou dificuldades para relaxar?	0	1	2	3	4
10	Você se sentiu envergonhada?	0	1	2	3	4
11	Você ficou irritada com outras pessoas?	0	1	2	3	4
12	Você teve dificuldade para realizar suas atividades diárias?	0	1	2	3	4
13	Você sentiu que sua vida, em geral, ficou pior?	0	1	2	3	4
14	Você ficou totalmente incapaz de fazer suas atividades diárias?	0	1	2	3	4