

ÉRICA FERNANDA PATRICIO DA SILVA

**Análise da expressão gênica do FOXP3, MIP-3 α e Interleucinas 2, 10 e 35 em
pacientes com ulceração aftosa recorrente**

São Paulo

2015

ÉRICA FERNANDA PATRICIO DA SILVA

**Análise da expressão gênica do FOXP3, MIP-3 α e Interleucinas 2, 10 e 35 em
pacientes com ulceração aftosa recorrente**

Versão Corrigida

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 - Estomatologia

Orientador: Prof. Dr. Norberto Nobuo Sugaya

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Patricio EF. Análise da expressão gênica do FOXP3, MIP-3 α e Interleucinas 2, 10 e 35 em pacientes com ulceração aftosa recorrente. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe Elisa, por tudo que fez e ainda faz por mim todos os dias, por ter estado sempre ao meu lado me apoiando, incentivando e sendo acima de tudo um exemplo a ser seguido. Tudo aquilo que sou, ou pretendo ser, devo a um anjo, minha mãe” (Abraham Lincoln).

À minha tia, Toninha, por sempre acreditar que eu poderia ser melhor e fazer melhor, e ao seu modo me estimular e incentivar a melhorar sempre em todos os campos da minha vida e ser minha segunda mãe.

Ao meu irmão, Elder, por sempre estar ao meu lado nos momentos que eu mais preciso, me alegrando, me defendendo, me apoiando, me acobertando e se mostrando totalmente confiante. “O irmão que é ajudado por seu irmão é como uma cidade forte” (Provérbio latino – Vulgata).

Ao Norberto, por ser essa pessoa que inspira, incentiva e acredita. Por ter me dado asas pra voar e estado sempre presente pra me amparar e me incentivar, me mostrando que as dificuldades sempre existirão mas que sempre podem ser vencidas. Por ter ultrapassado a sua função de orientador e me ensinado sobre a vida me tornado uma pessoa mais política e paciente com todos que me cercam. Obrigada por estar sempre ao meu lado com seu sorriso amigo, suas palavras de calma e seus ouvidos abertos para todos os momentos
“Professores brilhantes ensinam para uma profissão. Professores fascinantes ensinam para a vida” (Augusto Cury).

À professora Camila, que me orientou com muito empenho nessa caminhada da biologia molecular, que confiou a mim um pouco do seu projeto e seus conhecimentos. Esse trabalho só foi possível graças à sua paciência e dedicação em me ensinar um mundo novo e repleto de possibilidades e desafios. “Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina” (Cora Coralina).

À minha amiga irmã, Ingrid, que sempre esteve do meu lado nos momentos bons e ruins, me incentivando, ouvindo, estimulando e acima de tudo me aceitando e me

tornando uma pessoa melhor. Obrigada por sempre estar ao meu lado e ser minha amiga eterna. “A gente não faz amigos, reconhece-os” (Garth Henrichs).

Aos meus queridos amigos de pós-graduação que se tornaram meus amigos da vida, que me inspiraram, ensinaram, compartilharam felicidades, viagens, dificuldades e foram verdadeiros exemplos a serem seguidos, Anna Torrezani, Ana Paula, Bianca Fréo, Carla Siqueira, Gustavo Rabelo, Ligia Gonzaga e Ricardo Vecchiatti, obrigada pela amizade e parceria “A melhor parte da vida de uma pessoa está nas suas amizades” (Abraham Lincoln).

À Vivian Pelegrini, por ter acreditado em mim e me deixado fazer parte da sua pesquisa e despertado o Amor pela Estomatologia “Toda despedida é dor...tão doce todavia, que eu te diria boa noite até que amanhecesse o dia” (William Shakespeare).

Aos amigos que adquiri durante essa longa caminhada e que compartilharam dos mesmos desafios, alegrias e vida durante todo o meu mestrado, a todos os colegas da pós-graduação. “A amizade é uma predisposição recíproca que torna dois seres igualmente ciosos da felicidade um do outro” (Platão).

Aos meus amigos, que apesar de não estarem no meu dia a dia, apesar da distância, da ausência e das crises de mau humor se mostraram sempre ao meu lado, Aline, Clara, Gustavo Ferraz, Ilka, Maria Angela, Nathalia, Raquel, Thatiana e Valdirene. “A amizade é o conforto indescritível de nos sentirmos seguros com uma pessoa, sem ser preciso pensar o que se pensa, nem medir o que se diz” (George Eliot).

Às secretárias, Nina e Cecília por terem ultrapassado todas as barreiras de suas funções e me acolherem como uma filha sempre me apoiando, me acalentando e tornando tudo mais fácil, mesmo nos meus momentos de maior desespero, foram minha mãe e madrinha aqui dentro.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém” (*Dalai Lama*).

AGRADECIMENTOS

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

À professora, **Camila de Barros Gallo**, por me iniciar no laboratório, me ensinar e me encantar com a biologia molecular.

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

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

Aos demais **Professores da Disciplina de Estomatologia Clínica, Celso Lemos, Andrea Lusvarghi e Fabio Alves** da FOU SP, pela amizade, ensinamentos e confiança depositada em mim durante todo esse período vocês transmitiram conhecimentos e me tornaram sem dúvidas uma profissional melhor. Obrigada pela convivência compartilhada.

Aos **alunos e ex-alunos da pós-graduação, estagiários e monitores da Disciplina de Estomatologia Clínica: Ana Paula, Ana Hoyos, Anna Torrezani, Bianca, Durval, Ligia, Gustavo Rodrigues, Sabrina, Ricardo Vecchiatti, Valdirene** e todos os outros colegas que em algum momento passaram pelo meu caminho. Agradeço pelo carinho, amizade e os momentos agradáveis de convivência.

Às **secretárias** (Cecília, Nina, Vera e Marilía) e **técnico** (Laerte) do Departamento de Estomatologia da FOUSP, pela convivência e colaboração.

À Glauci, pela compreensão, ajuda e disponibilidade na formatação e finalização deste trabalho.

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

“É muito melhor lançar-se em busca
de conquistas grandiosas,
mesmo expondo-se ao fracasso,
do que alinhar-se com os pobres de espírito,
que nem gozam muito nem sofrem muito,
porque vivem numa penumbra cinzenta,
onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”
(Theodore Roosevelt)

RESUMO

Patricio EF. Análise da expressão gênica do FOXP3, MIP-3 α e Interleucinas 2, 10 e 35 em pacientes com ulceração aftosa recorrente. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Original

A ulceração aftosa recorrente (UAR) é considerada a doença ulcerativa mais frequente da cavidade bucal. Sua etiopatogenia ainda não está plenamente esclarecida, embora inúmeros fatores locais e sistêmicos já tenham sido a ela associados. Recentemente, a resposta imune anormal do tipo celular tem sido considerada a responsável pela lesão bucal na UAR, favorecendo uma resposta imunológica pró-inflamatória do tipo Th1, em conjunto com alterações em linfócitos T regulatórios. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi realizar análise da expressão gênica da FOXP3, MIP-3 α e Interleucinas 2, 10 e 35 em pacientes com ulceração aftosa recorrente, por meio de estudo caso-controle. Os pacientes do grupo caso apresentavam quadros frequentes de UAR com pelo menos um ano de manifestação de surtos ulcerativos e história negativa de condições sistêmicas ou locais interferentes com a expressão das UAR. Estes foram submetidos a biópsia de lesão ulcerativa recente para a análise molecular. Os pacientes do grupo controle apresentavam história negativa de UAR, mucosa clinicamente saudável, e doaram voluntariamente fragmento de mucosa saudável para análise molecular, quando submetidos a procedimentos cirúrgicos como exodontia de terceiros molares ou biópsias ósseas. Todos os pacientes foram incluídos no grupo de pesquisa apenas após anuência com termo de consentimento livre e esclarecido. Submeteram-se a exame clínico, realizaram exames complementares para controle da saúde geral e suporte diagnóstico. Onze pacientes UAR e três controles voluntários compuseram a casuística estudada, sendo submetidos a biópsia de lesões de UAR ou de mucosa de revestimento sadia. As amostras de tecido bucal foram submetidas aos procedimentos laboratoriais de extração do RNA e análise da expressão gênica da FOXP3, MIP-3 α e Interleucinas 2, 10 e 35 por meio da técnica de RT-PCR em tempo real. Não houve diferença significativa na expressão dos genes estudados entre as amostras de portadores de UAR e controles sadios. Concluímos que os genes aqui avaliados não parecem desempenhar papel distintivo na fase ulcerativa inicial das

UAR, entretanto estudos adicionais são recomendados a fim de se verificar a real participação desses agentes da inflamação na expressão da doença.

Palavras-chave: estomatite aftosa, citocinas, quimiocinas, interleucinas, IL-2, IL-10, e PCR em tempo real.

ABSTRACT

Patricio EF. Analysis of gene expression of FOXP3, MIP-3 α and interleukins 2, 10 and 35 in patients with recurrent aphthous ulcers [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Original.

Recurrent aphthous ulcers (RAU) is the most common ulcerative disease of the oral cavity. Its pathogenesis is poorly understood yet, although numerous local and systemic factors have been associated with it. Recently, abnormal immune response of cellular type has been considered responsible for the RAU oral lesions, promoting a pro-inflammatory immune response Th1-type, in conjunction with changes in regulatory T cells. Thus, the aim of this study was to analyze the gene expression of FOXP3, MIP-3 α and interleukins 2, 10 and 35 in patients with recurrent aphthous ulceration through a case-control study. The case group of patients presented frequent RAU bouts with at least one year of manifestation of ulcerative outbreaks and negative history of local or systemic conditions interfering with the RAU expression. These patients were submitted to a biopsy procedure of a recent ulcerative lesion for molecular analysis. Patients in the control group presented no history of RAU, and agreed with a donation of a healthy mucosa fragment for molecular analysis when undergoing surgical procedures such as extraction of third molars or bone biopsies. All patients were included in the research group only after agreement with an informed consent. All subjects underwent clinical examination and were submitted to additional lab tests to check overall health and support diagnosis.

Eleven RAU patients and three control volunteers composed the sample size and undergone biopsy of RAU lesions or healthy mucosal lining. The oral tissue samples were submitted to the laboratory procedures of RNA extraction and analysis of gene expression of FOXP3, MIP-3 α and interleukins 2, 10, 35 by real time RT-PCR. There was no significant difference in gene expression between the studied samples of patients with RAU and healthy controls. It was concluded that the genes evaluated do not seem to play distinctive role in the initial ulcerative phase of RAU, however further studies are recommended in order to verify the actual participation of these inflammation agents in RAU expression.

Keywords: aphthous stomatitis, cytokines, chemokines, interleukins, IL-2, IL-10, and real time PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 -	Esquema da localização da biópsia na lesão ulcerada com <i>punch</i> de 5 mm (Gallo, 2011)	35
Figura 4.2 -	Extração de RNA de amostras de tecido com o método fenol-clorofórmio: A - maceração em nitrogênio líquido do fragmento de tecido, B - aspecto após maceração e adição do reagente Trizol (Gallo, 2011)	36
Figura 5.1 -	Consort 2010 Flow Diagram dos pacientes participantes do estudo.....	42
Figura 5.2-	Gel de integridade do RNA de amostras incluídas no estudo: gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo em que se pode observar a presença das bandas 28s e 18s, correspondentes ao RNA ribossômico, numa relação 2:1, conferindo integridade do material extraído	44
Quadro 5.1-	Características gerais da casuística.....	44
Quadro 5.2-	Tipo e gravidades das UAR por paciente.....	45
Figura 5.3-	Corte histológico da UAR (10x), evidenciando processo inflamatório crônico inespecífico com ulceração	46
Figura 5.4 -	A: Curva de amplificação considerada adequada, evidenciando amplificação exponencial do produto de PCR e a delimitação automática do limiar de amplificação exponencial pelo equipamento de PCR em tempo real (Threshold). B: Curva de dissociação dos iniciadores conferindo especificidade da reação de PCR.....	47
Figura 5.5 -	Diferença na expressão gênica entre grupo UAR e controle: embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa na expressão gênica ($P>0,05$), observa-se tendência de aumento da expressão gênica do FOXP3 (11,06-fold change), IL10 (4,37-fold change), IL35 (IL12A: 21,65-fold change e EBI3: 5,12- fold change) e de diminuição do MIP-3 α (0,25-fold change) e IL-2 (0,74-fold change).....	48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1 - Iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real40
- Tabela 5.1 - Resultados da análise espectrofotométrica das amostras de RNA extraídas analisadas no Nanodrop pré- e pós-purificação das mesmas. As amostras foram consideradas adequadas para serem submetidas à reação de RT-PCR em tempo real quando as relações A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} eram superiores a 1,843
- Tabela 5.2 - Características clínicas dos pacientes com UAR incluídos neste estudo45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
CCL	chemokine (C-C motif) ligand
CCR	C-C chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CDO-FOUSP	Centro de Diagnóstico Oral da Disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
DNA	ácido desoxirribonucleico
EBI3	Epstein-Barr virus induced gene 3
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPLOT	enzyme-linked immunospot assay
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	fluorescein isothiocyanate
FOXP3	forkhead box P3
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
IFN- γ	interferon gamma
IFN- α	interferon alfa
IL	interleucina
IL-2R	receptor de interleucina 2
IRF1	Interferon regulatory factor 1
LES	lúpus eritematoso sistêmico
LPM	laboratório de patologia molecular
mcp-1	monocyte chemoattractant protein-1
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein
MIP-3 α	macrophage inflammatory protein3alpha
NK	natural killer
PFAPA	síndrome da febre periódica, adenite, faringite e úlceras aftosas

PCR	polymerase chain reaction
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
RT	reverse transcriptase
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction.
STAT	signal transducers and activators of transcription
TCGF	T cell growth factor
TCLE	termo de consentimento livre esclarecido
Tef	linfócitos T efetores
TGF-β	transforming growth factor beta
Th	linfócitos T helper
TLR2	Toll-like receptor 2
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
Treg	linfócitos T reguladores
UAR	ulceração aftosa recorrente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Alterações celulares observadas na UAR	21
2.2 Citocinas e quimiocinas investigadas na UAR	23
2.3 Genes selecionados para este estudo: MIP-3 α , FOXP3, IL-2, IL-10 e IL-35	27
2.3.1 MIP-3 α	27
2.3.2 FOXP3	28
2.3.3 IL-2	29
2.3.4 IL-10	29
2.3.1 IL-35	29
3 PROPOSIÇÃO	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Desenho do estudo	32
4.1.1 Critérios de inclusão do Grupo de Estudo	32
4.1.2 Critérios de inclusão do Grupo Controle	33
4.1.3 Critérios de exclusão para ambos os grupos	33
4.2 Obtenção das amostras - Biópsia incisional	34
4.2.1 Grupo caso	34
4.2.2 Grupo controle	35
4.3 Experimentos	36
4.3.2 Extração do RNA total	36
4.3.2 Quantificação do RNA e verificação de sua qualidade	37
4.3.3 Eliminação do DNA genômico e purificação do RNA	38
4.3.4 Reação de transcrição reversa – síntese do cDNA	39
4.3.5 PCR em tempo real	40
4.3.5.1 Iniciadores	40
4.3.5.2 Reação de PCR	41
4.4 Análise dos resultados	41

5 RESULTADOS	42
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICES	67
ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

O estudo das ulcerações aftosas recorrentes (UAR) é de fundamental importância na Odontologia, uma vez que é a lesão ulcerativa mais comumente encontrada na cavidade oral e ainda não se conhece o seu fator ou seus fatores causais.

Apesar da vasta quantidade de trabalhos disponível na literatura mundial, voltada à investigação dos vários aspectos locais e sistêmicos relacionados à expressão das UAR, ainda não foi esclarecida sua etiologia e, por consequência, ainda inexistente protocolo de tratamento satisfatório para controlar as manifestações dessa doença.

O envolvimento genético e imunológico é indubitável e tem sido objeto de investigação há várias décadas. Os genes relacionados e mecanismos envolvidos necessitam maiores esclarecimentos, entretanto a maior parte das terapêuticas empregadas atualmente baseia-se na utilização de imunossuppressores, locais ou sistêmicos.

Atualmente acredita-se que o surgimento da lesão de UAR está relacionado a resposta imunológica anormal do tipo celular, mediada por células T com exacerbação da resposta pró-inflamatória do tipo Th1. Essas evidências têm levado à pesquisa das diversas citocinas e quimiocinas envolvidas nos processos inflamatórios conhecidos, bem como das células inflamatórias, receptores, genes associados à síntese dessas proteínas, células secretoras dessas proteínas inflamatórias, possíveis antígenos associados ao desencadeamento dessas reações e a um sem número de interações e inter-relações entre esses elementos.

Acredita-se que investigações nesse campo do conhecimento podem proporcionar o esclarecimento etiológico necessário à elaboração de um protocolo terapêutico efetivo para esses pacientes.

No presente estudo, avaliou-se a expressão dos genes FOXP3, MIP-3 α , IL-2, IL-10 e IL-35 em pacientes com UAR. Esse grupo de genes está associado a linfócitos T reguladores (FOXP3, marcador celular) e citocinas produzidas por estes (IL-10 e IL-35); assim como a linfócitos Th1, associados à citocina IL-2 e quimiocina MIP-3 α (ou CCL20) produzidas por esses. Vias estas recentemente associadas ao desenvolvimento da UAR.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A ulceração aftosa recorrente (UAR) é considerada uma doença inflamatória crônica de distribuição mundial de alta prevalência na cavidade bucal, sendo a lesão ulcerativa mais comumente diagnosticada em boca e que compromete a qualidade de vida de seus portadores. Apresenta prevalência em torno de 25% na população em geral (Scully, Porter, 2008), independentemente de outras variáveis como sexo e etnia.

A UAR é caracterizada clinicamente pelo surgimento de lesões ulcerativas em mucosa oral, únicas ou múltiplas, apresentando formato arredondado e circundadas por halo eritematoso e recobertas por exsudato fibrinopurulento. Geralmente com história de episódios prévios, intervalo variável de recorrência e cura espontânea em 7 a 10 dias (Casiglia, 2002; Natah et al., 2004; Scully; Porter, 2008).

Estas lesões podem se expressar de três formas clínicas clássicas: a menor, a maior e a herpetiforme. A afta menor, também conhecida como afta *minor* ou de Mikulicz, é a variante mais frequente, correspondendo a 70% dos casos dos pacientes com UAR (Casiglia, 2002; Scully et al., 2003).

As outras duas variáveis da lesão são menos comuns, sendo que o tipo maior, também conhecida como afta *major*, doença de Sutton ou periadenite mucosa, tem características mais graves pelo tamanho maior que um centímetro. Sua resolução pode levar semanas e até mesmo meses, debilitando o paciente. Pode levar a formação de cicatriz e sugerem a investigação de imunossupressão do paciente. O tipo herpetiforme é caracterizado por múltiplas úlceras, de 10 a 100, com tamanho aproximado de três milímetros, que podem se coalescer manifestando com isso úlceras maiores. Frequentemente essa variante da UAR é confundida com as lesões causadas pelo vírus herpes, embora não exista esta correlação (Casiglia, 2002; Scully et al., 2003).

Com relação à gravidade da doença ela pode ser classificada em três categorias, que são definidas principalmente a partir da frequência das recorrências; sendo os quadros leves aqueles que compreendem de um a cinco episódios anuais; moderados de seis a onze episódios anuais e a manifestação severa na qual o paciente apresenta doze ou mais episódios anuais, manifestações com lesões múltiplas ou lesões tipo major e surtos sem períodos de alívio (Miller, Ship, 1997;

Ship, 1972). Embora tenha sido desenvolvida uma ferramenta de avaliação da gravidade do quadro de UAR por meio de escores numéricos baseados em diversas informações clínicas sobre a sintomatologia dos episódios de UAR apresentados pelo paciente, esta não se tornou ainda consenso universal, apesar de permitir padronização e constituir ferramenta de especial importância para as pesquisas clínicas (Tappuni et al., 2013).

O diagnóstico da lesão é baseado em critérios clínicos, desde que não existem exames laboratoriais específicos para confirmação da doença (Natah et al., 2004; Scully, Felix, 2005). 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. Alguns exames complementares, especialmente hematológicos como o hemograma completo e dosagens séricas de ferritina, folato e vitamina B12, além da investigação de doença celíaca fazem parte do processo de diagnóstico das UAR (Scully, Felix, 2005).

Certas 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).

A UAR não apresenta quadro microscópico característico. Histologicamente a UAR é representada por ulceração da mucosa oral, recoberta por exsudado fibrinopurulento rico em neutrófilos e infiltrado inflamatório crônico inespecífico confinado à lâmina própria (Savage et al., 1985; Stanley, 1972).

Apesar da etiopatogenia da UAR ainda ser desconhecida, ela é considerada doença multifatorial, onde componentes genéticos, microbiológicos e imunológicos concorrem simultaneamente ou sequencialmente para o surgimento e evolução das lesões ulcerativas (Woo, Sonis, 1996).

2.1 Alterações celulares observadas na UAR

A literatura referente às alterações imunológicas no paciente portador de UAR demonstra um envolvimento de mecanismos de mediação celular (Borra et al., 2004; Jurge et al., 2006; Lehner, 1972).

A análise imunohistoquímica do infiltrado inflamatório da UAR demonstrou que a maior parte das células presentes é CD3 positiva, indicando que é composta predominantemente por linfócitos T. Embora o predomínio seja de linfócitos T efetores, existe uma polarização do tipo de linfócito T efetores em cada estágio da UAR. Sendo que no estágio pré-ulcerativo e de reparação, as células predominantes são os linfócitos T CD4+ (auxiliar) enquanto os linfócitos T CD8+ (citotóxico) são ocasionais e isolados. E, de maneira inversa, no estágio ulcerativo há diminuição no número de linfócitos T auxiliares e predomínio de linfócitos T citotóxicos (Wray et al., 1981; Savage et al., 1985; Pedersen et al., 1992; Ship et al., 2000; Tuzun et al., 2000; Scully et al., 2003).

As alterações teciduais na UAR também são acompanhadas por mudanças sistêmicas, representadas por diferenças nas funções e proporções entre as diversas subpopulações celulares presentes no sangue. Estas, provavelmente, refletem um estado de favorecimento à precipitação da doença, mais do que representam os seus efeitos. Analisando-se o sangue periférico dos portadores de UAR, observou-se que a relação CD4+/CD8+ é menor do que a dos indivíduos controles saudáveis, independente do estágio da doença (Monsuur et al., 2008).

Foi observada a diminuição quantitativa de linfócitos T reguladores CD4+ CD25+ (FOXP3+) no sangue periférico de pacientes com UAR em relação a indivíduos saudáveis (Lewkowicz et al., 2005). Além disso, estas células também apresentam uma diminuição funcional. A modulação da resposta dos linfócitos T CD4+ auxiliares pelos linfócitos T CD4+ reguladores foi investigada em estudo com culturas celulares provenientes de um mesmo indivíduo e observou-se diminuição na atividade supressora nos pacientes com UAR em relação a indivíduos controle sadios. Embora não se tenha identificado a expressão do RNA mensageiro do FOXP3, marcador deste tipo celular, em amostras de tecido (Lewkowicz et al., 2008).

Hartigan-O'Connor et al. (2007), analisaram a expressão de 14 marcadores de superfície e intracelulares específicos para células T regulatórias, determinando que as células com fenótipo de superfície CD4⁺ CD25⁺ CD127(low) apresentavam os maiores níveis de FOXP3 intracelular, mostrando-se supressivos e hipoproliferativos. Jonuleit et al., (2001), afirmam que essas células estão envolvidas na manutenção da auto-tolerância através da supressão da ativação e expansão de linfócitos auto-reativos.

Liu et al. (2006), demonstraram que BLP – uma proteína bacteriana sintética – agonista do receptor Toll-like 2, é capaz de modular a resposta imune, induzindo a proliferação tanto de células T regulatórias CD4⁺ CD25⁺ quanto células T efetoras CD4⁺ CD25⁻, sendo que as células Tregs mostram uma perda transitória da atividade supressiva em função de aumento da secreção de IL-2, paralelamente à supressão transitória também da indução de FOXP3. As células Tregs recuperam sua atividade supressora após a regressão da infecção, limitando assim o potencial autoimune que pode resultar do excesso de efetores ativados.

Estudos têm indicado que a imunidade de células T desempenha um papel na etiologia da UAR. Reações de imunidade de células T estão descritas como reações Th1 e Th2. Acredita-se que a IL-12 inicia reações Th1, e IL-10 inicia reações Th2. À medida que a reação de Th1 é dominante em UAR, as células T são induzidas por níveis elevados de IL-12 e diminuição dos níveis de IL-10 (Ozyurt et al., 2014).

Em estudo realizado por Lewkowicz et al. (2011) demonstrou-se que genes associados a Th1 estão sobre-expressos em pacientes UAR na ausência dos genes do tipo Th3- e Th17-. O papel das células Th2 na UAR não foi totalmente esclarecido, mas o único marcador dessas células encontrado no trabalho foi o CCR3.

As células Th17 e as células Treg desempenham papéis opostos em doenças autoimunes. Ambas as subpopulações celulares expressam CCR6. O CCR6 desempenha importante papel no controle da migração das células Treg e Th17. A ausência de CCR6 em células Th17 reduz a severidade de encefalomielite autoimune experimental e o recrutamento de células Th17 e Treg para os tecidos inflamatórios (Yamazaki et al., 2008).

Sun et al. (2000), utilizaram citometria de fluxo para determinar as subpopulações linfocitárias do sangue periférico e imunoensaio enzimático para mensurar os níveis plasmáticos de IL-2 e IL-2R. Relataram aumento expressivo de

células CD4⁺ e células CD4⁺ IL-2R⁺ na fase aguda da UAR e redução nos níveis de CD4⁺, com aumento de células CD8⁺ na fase pós-aguda das UAR. Os níveis de IL-2 mostraram-se elevados na fase aguda da UAR, em relação a controles saudáveis, o que levou os autores a sugerir que essa citocina mostra-se aumentada em função do elevado número de células CD4⁺ ativadas nessa fase.

Estudos de Taylor et al. (1992), Buño et al. (1998), Natah et al. (2000) e Equia-del Valle et al. (2011), relataram níveis elevados de IL-2 na mucosa lesionada e de TNF- α no soro destes pacientes, além de diminuição dos níveis de RNAm de IL-10 na fase ativa da UAR. IL-10 estimula o processo de proliferação epitelial, de forma que baixos níveis dessa citocina na UAR sugerem um atraso na epitelização e prolongamento na duração das lesões. A diminuição de surtos de UAR com o avançar da idade é compatível com análises de sangue que revelam uma maior produção de IL-10 em idosos em comparação a controles mais jovens (Cakman et al., 1996)

2.2 Citocinas e quimiocinas investigadas na UAR

As citocinas são mediadores cruciais na reatividade imunológica, sendo foco de estudo na patogênese de diversas doenças, desde que orientam a resposta imunológica em direção à tolerância ou à autoimunidade. São produzidas por uma grande variedade de tipos de células incluindo as células T CD4⁺ auxiliares do tipo 1 e 2. Geralmente dois tipos de citocinas são produzidos pelas células T auxiliares; o tipo Th1 é representado pelas citocinas pró-inflamatórias: IL-2, IFN- γ e TNF- α ; que induzem a imunidade mediada por células e o tipo Th2 é representado pelas citocinas anti-inflamatórias: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13; que promovem a imunidade humoral e tolerância (Albadaniou-Framaki et al., 2007; Gallo et al., 2012).

É sabido que o desequilíbrio entre Th1 e Th2 pode promover doenças imunomediadas. Aumento da resposta Th2 está envolvido em doenças atópicas, como asma, enquanto na resposta Th1 há uma implicação em doenças crônicas autoimunes, como diabetes tipo 1 e artrite reumatoide (Langrish et al., 2005; Lewkowicz et al., 2011).

Atualmente, sabe-se que os fatores que influenciam positivamente o aparecimento da UAR estão relacionados com o desequilíbrio de ativação imunológica Th1/Th2. Por exemplo, estresse, medicamentos (anti-inflamatórios, beta-bloqueadores, terapia com IFN- γ e IFN- α), contato com bromelina do abacaxi, alteração hormonal, doenças sistêmicas (doença de Behçet, doença celíaca e doença de Crohn) já foram relacionados com mudanças no padrão de resposta imunológica para o tipo Th1, enquanto os que influenciaram negativamente tais como: gravidez, tabagismo, e alguns medicamentos (tetraciclina, dexametasona, pentoxifilina, dapsona, colchicina e talidomida) foram relacionados com o padrão Th2 (Rogers, 1997; Tuzun et al., 2000; Barros et al., 2010).

O envolvimento das citocinas Th1 (pró-inflamatórias) é bastante evidente na patogênese da UAR, tendo sido observada em diversos estudos (Borra et al., 2004). Lewkowicz et al. (2005) verificaram, através de citometria de fluxo e ELISA, a produção de citocinas em culturas de células mononucleares do sangue periférico 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 anti-inflamatórias, promotoras da imunidade humoral e tolerância (IL-4, IL-10, TGF- β), em culturas estimuladas ou não (Fox et al., 2011).

No tecido verificou-se, por imunohistoquímica, que portadores de UAR apresentam alta marcação para as citocinas IL-12, IFN- γ e TNF- α (Dalghous et al., 2006), correspondente ao quadro sistêmico anteriormente citado. Além destas alterações locais, outro estudo identificou a presença de níveis elevados de IL-2 e níveis diminuídos de IL-10 (Buño et al., 1998).

Pekiner et al. (2012) avaliaram a produção de IL-2 e IL-6 em nível sérico em três grupos: pacientes com UAR, pacientes com Síndrome de Behçet (BD) e controles. Não observaram diferenças estatísticas entre os grupos para os níveis séricos de IL-2 e IL-6, apenas um aumento discreto nos níveis de IL-6 nos grupos UAR e BD. Sugeriram, os autores, que estas citocinas atuem como fatores precipitantes na etiopatogenia da UAR e BD.

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).

Natah et al. (2000), compararam a imunorreatividade do TNF- α em dois grupos de pacientes, um grupo UAR e o outro composto por pacientes nos quais foram induzidas cirurgicamente úlceras traumáticas. Não se observou imunorreatividade nas células epiteliais, sugerindo que o epitélio pode agir como um alvo para TNF- α que foi produzido pelo infiltrado de células inflamatórias presentes na região. Foi também observado positividade em algumas células endoteliais e em zonas profundas do tecido conjuntivo, sugerindo que uma auto-produção de TNF- α pelo endotélio vascular na UAR é mínima e que o TNF- α que age sobre o endotélio na UAR é liberado principalmente por células inflamatórias adjacentes.

Em estudo com células T provenientes de pacientes com UAR, foi observado, que estas seriam capazes de secretar maiores quantidade de IL-2, IL-12, IL-10, e IFN- γ em relação ao grupo controle, não havendo diferenças significativas para as citocinas TNF- α , IL-5, IL-6. Enquanto que os níveis de IL-4 encontrados eram menores nos pacientes com UAR (Albanidou-Farmaki et al., 2007). A comparação por imunohistoquímica da expressão de IL-10 mostrou diminuição nessa citocina nas lesões ulceradas de pacientes portadores de UAR em relação a outras doenças inflamatórias crônicas (Miyamoto et al., 2008).

Em estudo mais recente também foi observado por meio de técnica PCR-array que células presentes na UAR expressavam características Th-1, sendo que a maioria dos genes que apresentaram expressão elevada nas lesões aftosas eram IFN- γ , TNF- α , IL-5, IRF1, STAT-1 e STAT-4, enquanto os genes Th2 não apresentavam aumento na expressão e os genes associados a Th3 e Th17 não foram encontrados na UAR (Lewkowicz et al., 2011).

Estudo realizado por Fox et al. (2011) demonstrou que pacientes UAR apresentam atividade anômala da via TLR2 que provavelmente influencia a estimulação de uma resposta imune anormal Th1 (Borra et al., 2009), e modulam receptores de quimiocinas, em particular CCR1 e CCR5, influenciando migração de monócitos após o reconhecimento do patógeno pelo TLR.

Uma possível explicação para o aumento da expressão dos genes relacionados com a resposta Th1 é a presença de polimorfismos em genes responsáveis pelo controle da polarização imunológica, tais como IL-10 e IL-12. Provavelmente as células T envolvidas no aparecimento e desenvolvimento da UAR tenham sido expostas a altos níveis IL-12 ou inversamente a níveis baixos de IL-10 (Bazrafshani et al., 2003).

Avci et al. (2014), constataram que anormalidades nas funções de citocinas (elevação de TNF- α , IL-2, IL-12, e diminuição de IL-10) podem causar aceleração da peroxidação lipídica e levar a um aumento do estresse oxidativo no soro de pacientes portadores de UAR. Com diminuição simultânea dos mecanismos antioxidantes. Devido aos baixos níveis de IL-10, a reação inflamatória não é suprimida e, por conseguinte, propiciaria o desenvolvimento das UAR.

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, retroalimentando o processo. O aumento da expressão de quimiocinas e moléculas de adesão promove o recrutamento dos linfócitos para a mucosa e acarretando a resposta contra o tecido. Existem indícios de que a expressão das quimiocinas esteja alterada na UAR, visto que alguns dos genes com a expressão aumentada em análise por *microarray*, codificam as quimiocinas: MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 (Borra et al., 2004).

Outras quimiocinas ou receptores também foram avaliados na UAR, tais como CCL3, CCR1 e CCR5, que apresentaram expressão elevada em amostra local nos pacientes com UAR em relação a controles saudáveis. Por outro lado, esses mesmos receptores, quando investigados em células do sangue periférico, não se mostraram diferencialmente expressos à exceção do CCR1 que apresentou expressão elevada (Gallo et al., 2012).

Atualmente estudos demonstraram um terceiro caminho de células T auxiliares, a célula Th17. As células pró-inflamatórias Th17 parecem estar envolvidas na destruição de tecido por mecanismos autoimunes e tem um papel dominante na indução da inflamação autoimune crônica do sistema nervoso central e das articulações, mas a expressão dos genes relativos a Th17 não foi demonstrada em pacientes com UAR (Langrish et al., 2005; Lewkowicz et al., 2011).

2.3 Genes selecionados para este estudo: MIP-3 α , FOXP3, IL-2, IL-10 e IL-35

O grupo de genes selecionados para este estudo está associado aos linfócitos T reguladores (FOXP3, IL-10 e IL-35) e aos linfócitos auxiliares Th1 (IL-2 e MIP-3 α), tendo em vista os indícios de alterações nestes apontados pela literatura. A tecnologia RT-PCR em tempo real utilizada neste estudo permite a obtenção mais rápida e precisa de resultados confiáveis, reprodutíveis e isentos de subjetividade (Bustin, 2000; Kalburgi et al., 2013). Suas funções serão abordadas nos próximos tópicos.

2.3.1 MIP-3 α

A MIP-3 α , também conhecida por CCL20, é expressa numa variedade de tecidos humanos e por uma variedade de células imunes. É uma quimiocina inflamatória e durante a inflamação pode ser secretada ou expressa pelas células endoteliais, neutrófilos, células NK, linfócitos Th17, linfócitos B e uma variedade de outras células do sistema imune relacionadas à resposta pró-inflamatória ou citotóxica. Desempenha um papel central no recrutamento precursor de células de Langerhans no epitélio durante a inflamação (Nelson et al., 2001).

A MIP-3 α tem um único receptor conhecido, o CCR6, que se encontra em um número variado de células imunitárias diferentes, incluindo células dendríticas CD34+, células T de memória e células B. Estímulos inflamatórios aumentam a expressão do RNA mensageiro do CCR6 em linfócitos T, o que sugere que este receptor deve estar envolvido tanto no papel inflamatório quanto homeostático no sistema imunológico. Várias citocinas podem induzir a expressão da MIP-3 α , como a IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ e TNF- α . Em contraste, as interleucinas IL-4, IL-22 e IL-23 têm um efeito dúbio sobre a CCL20 e a citocina anti-inflamatória IL-10 regula negativamente a expressão deste. É possível que a via CCL20 (MIP-3 α)-CCR6 esteja envolvida na imunidade da mucosa, porém é necessário investigar sua atividade específica em cada caso (Schutyser et al., 2000).

Kwon et al. (2002), encontraram que a produção de MIP-3alfa em células intestinais é dose dependente de IL-1beta e TNF-alfa; e que MIP-3alfa se encontra significativamente elevada na Doença de Crohn em comparação a controles e indivíduos com colite ulcerativa.

2.3.2 FOXP3

O FOXP3 é um fator de transcrição expresso por células T reguladoras (Treg CD4+CD25+), parece funcionar como um regulador mestre no desenvolvimento e função destas (Zhang; Zhao, 2007). É um marcador fidedigno deste subtipo celular que está relacionado com a supressão da resposta inflamatória. O gene FOXP3 humano está localizado no braço curto do cromossomo X, consiste de 11 éxons e codifica uma proteína de 431 aminoácidos, também denominada FOXP3 (Bennett et al., 2000). Linfócitos Treg possuem capacidade de suprimir a ativação e expansão de linfócitos autorreativos, colaborando para a manutenção da tolerância.

Law et al. (2009), testaram várias estratégias para identificação fidedigna de células T regs em citometria de fluxo, determinando que a melhor técnica de distinção entre populações FOXP3+ e FOXP3- foi observada com a utilização do clone PCH101e fluorocromo Alexa647.

Alterações no número de células Treg já foram correlacionadas com diversas enfermidades. Por exemplo, pacientes com neoplasias malignas geralmente apresentam um relativo excesso local de células Treg FOXP3+ como um mecanismo de evasão da vigilância imunológica das células malignas (Beyer; Schultze, 2006). Por outro lado, pacientes com doença autoimune tal como lúpus eritematoso sistêmico (LES) apresentam aparente disfunção dos linfócitos Treg FOXP3+, levando ao acúmulo de fatores pró-inflamatórios em uma reação exacerbada contra proteínas próprias do organismo.

2.3.3 IL-2

A IL-2 induz a maturação de linfócitos B e maturação de células T. Secretada pelas células T CD4+ ativadas, induz a expansão clonal e estimula células NK, atuando em respostas imunológicas do tipo Th1. É originalmente chamada Fator de Crescimento da Célula T (TCGF) é a principal citocina responsável pela progressão dos linfócitos T da fase G1 para a fase S do ciclo celular. O principal estímulo para sua produção são as bactérias e seus produtos; além de outras citocinas como IFN- α e IL-1. A IL-2 também estimula a proliferação de linfócitos T NK e facilitam sua ação citotóxica (Pasare, Medzhitov, 2005).

2.3.4 IL-10

A IL-10 é uma citocina supressora das atividades de macrófagos, bem como de linfócitos T e células NK. Pacientes com AIDS e linfoma de Burkitt secretam grandes quantidades de IL-10. Atua inibindo a produção do IFN- γ pelas células Th1, o que possibilita mudança das respostas imunes para um tipo Th2 (anti-inflamatória) (Buño et al., 1998). Também inibe a produção de citocinas por macrófagos ativados, a expressão de moléculas MHC classe II e moléculas que estimulam macrófagos, resultando no bloqueio das respostas imunes (Miyamoto et al., 2008). Avci et al. em estudo realizado em 2014 relataram que o nível de IL-10 foi menor nos pacientes UAR em relação a controles.

2.3.5 IL-35

Em 2007, uma nova molécula efetora dos linfócitos Treg foi identificada, a IL-35. Esta citocina apresenta características imunossupressoras pertencente à família da IL-12, é uma citocina que contribui para a resposta inflamatória em numerosos processos fisiológicos e patológicos (Ning-Wei, 2010; Choi et al., 2015). A IL-12 é

composta de duas subunidades, a p35 e a p40, com características pró-inflamatórias, promotora de imunidade mediada por células do tipo Th1 (Brombacher et al. 2003).

A IL-35 é composta de duas subunidades, o gene de vírus de Epstein-Barr virus-induced 3 (Ebi3) e p35 (IL-12A), suas duas subunidades não têm capacidade de regular a imunidade e o processo de inflamação atuando independentemente (Schoenhaut et al., 1992; Collison et al., 2007).

É expressa por linfócitos Treg estimulados pela inflamação, isto significa que diferente de outras citocinas anti-inflamatórias, a IL-35 não é expressa constitutivamente em tecidos humanos, mas sim de maneira induzida e suprime a inflamação (Bardel et al., 2008).

A IL-35 demonstra ter grande importância, uma vez que poderia regular as células T, alvos terapêuticos importantes de distúrbios imunomediados. A interação entre a IL-35 e as células T reguladoras seria um processo crítico na reação imune. Porém o exato mecanismo ainda é desconhecido. IL-35 apresenta características imunossupressivas que são reguladas por células T e B regulatórias IL-10 dependentes (Choi et al., 2015).

Koseoglu et al. (2015), utilizando ELISA investigaram os níveis de IL-35 em saliva total, fluido gengival crevicular e plasma de indivíduos saudáveis, não fumantes com gengivite e indivíduos com periodontite crônica. Os níveis de IL-35 foram maiores no fluido gengival crevicular de indivíduos com periodontite crônica, sugerindo que o IL-35 pode desempenhar importante papel na supressão de inflamação periodontal e manutenção da saúde periodontal.

Ning et al. (2015), examinando pacientes com artrite reumatoide encontraram níveis séricos significativamente menores de IL-35 nos doentes, comparativamente a controles saudáveis, sugerindo que a IL-35 desempenha papel protetor na patogênese da artrite reumatoide, em consonância ao seu papel anti-inflamatório.

3 PROPOSIÇÃO

Analisar a expressão gênica local do FOXP3, MIP-3 α , IL-2, IL-10 e IL-35 em população portadora de UAR e indivíduos controles saudáveis, por meio de RT-PCR em tempo real, buscando estabelecer diferenças e/ou similaridades entre populações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídos neste estudo, consecutivamente, pacientes diagnosticados com UAR e indivíduos não portadores de UAR que seriam submetidos a procedimentos cirúrgicos para diagnóstico no Centro de Diagnóstico Oral da disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CDO-FOUSP) no período entre maio e julho de 2015, após serem devidamente informados e concordarem com a participação mediante leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE - Apêndice A), aprovado em 08/04/2015 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP, protocolo nº 1.014.994 (Anexo A).

4.1 Desenho do estudo

O desenho de estudo selecionado para esta investigação foi do tipo caso-controle. Desta forma os indivíduos incluídos foram distribuídos em dois grupos: grupo caso, indivíduos que apresentavam UAR; e grupo controle, indivíduos não portadores de UAR que apresentavam a mucosa clinicamente saudável.

4.1.1 Critérios de inclusão do grupo caso

Pacientes com história e características clínicas consistentes para o diagnóstico de quadro frequente de UAR (episódios de UAR mensais ou mais frequentes) com ao menos um ano de história de lesões e que apresentassem no momento da consulta lesão ulcerativa recente (duração inferior a três dias) e história negativa de tratamento tópico ou sistêmico para o quadro de UAR há pelo menos 15 dias.

Também foram solicitados aos pacientes do grupo caso os exames laboratoriais (de acordo com o protocolo de atendimento de pacientes com UAR do CDO-FOUSP): hemograma completo, dosagem sérica de ácido fólico, ferritina e vitamina B12, realizados sem qualquer custo para os pacientes no Sistema Único de Saúde. Estes exames tem o objetivo de avaliar possíveis deficiências nutricionais que poderiam estar envolvidas e interferir no curso e aparecimento das lesões.

Nos casos onde foram detectadas quaisquer alterações, foram encaminhados para avaliação e conduta médica.

4.1.2 Critérios de inclusão do grupo controle

Os indivíduos incluídos neste grupo apresentavam a mucosa oral clinicamente saudável (sem sinais evidentes de inflamação), eram livres de UAR e sem histórico familiar (geração paterna) de UAR. Necessitavam de outros procedimentos cirúrgicos como remoção de lesões ósseas ou terceiros molares, e concordaram em doar fragmento de mucosa normal para o estudo.

4.1.3 Critérios de exclusão para ambos os grupos

Foram excluídos deste estudo: menores de 18 anos de idade; indivíduos tabagistas e/ou etilistas crônicos; grávidas; pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna ou sob tratamento ou com história de tratamento radioterápico e/ou quimioterápico; pacientes com suspeita ou história de imunodeficiência congênita, adquirida ou AIDS; pacientes com 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 autoimunes; pacientes sob uso crônico de drogas tais como anti-inflamatórios não esteroidais, imunossupressores, ansiolíticos, antidepressivos ou nicorandil; pacientes com doenças sistêmicas tais como anemia, diabetes, insuficiência renal, insuficiência hepática, hipertireoidismo ou

hipotireoidismo.

4.2 Obtenção das amostras - Biópsia incisional

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no período matutino sob condições ideais de assepsia e biossegurança, segundo o protocolo do CDO-FOUSP. A anestesia local foi infiltrada à distância da região submetida à biópsia.

4.2.1 Grupo caso

Os pacientes do grupo caso foram submetidos à biópsia de lesão ulcerada recente, 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 área ulcerada e 50% do tecido 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.

Após uma semana foi realizado o controle pós-operatório. E os pacientes passaram a ser acompanhados e adequadamente conduzidos com os tratamentos e protocolos já estabelecidos no CDO-FOUSP.

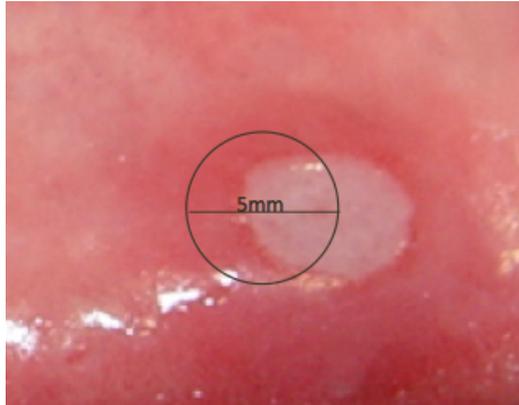


Figura 4.1 - Esquema da localização da biópsia na lesão ulcerada com *punch* de 5 mm

4.2.2 Grupo controle

Os pacientes do grupo controle foram convidados a ceder voluntariamente parte de tecido de mucosa de revestimento incisado, com mucosa clinicamente saudável, utilizando-se punch de 5 mm de diâmetro durante a realização de cirurgias para remoção de lesões ósseas ou terceiros molares inclusos. 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 a -80°C até a execução dos experimentos.

4.3 Experimentos

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

4.3.1 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído seguindo o protocolo já estabelecido de Extração de RNA pelo método do fenol-clorofórmio e precipitação alcoólica já padronizado no LPM, utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen Corporation, Life Technologies – Califórnia, EUA), uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento do RNA de células e tecidos.

Cada amostra congelada foi completamente macerada em nitrogênio líquido, até a visualização de um pó branco, sem permitir o descongelamento e a consequente degradação do RNA. Em seguida, acrescentou-se 500 µL de TRIzol ao material que foi novamente macerado até a visualização de um pó rosa (Figura 4.2).

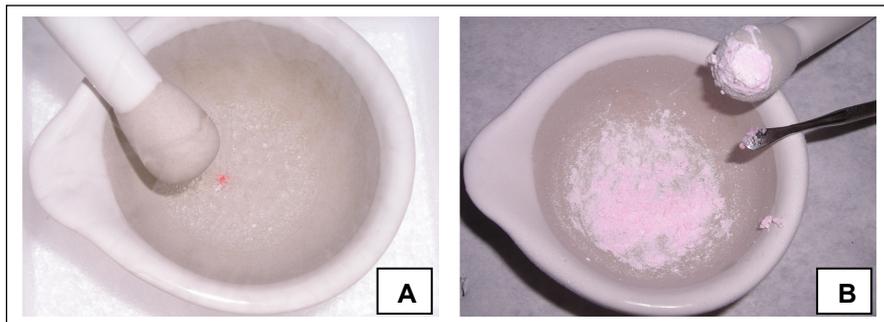


Figura 4.2 - Extração de RNA de amostras de tecido com o método fenol-clorofórmio: A - maceração em nitrogênio líquido do fragmento de tecido, B - aspecto após maceração e adição do reagente Trizol

O material macerado foi transferido para microtubos 2.0 mL contendo 500 µL de TRIzol, e as amostras foram homogenizadas e incubadas em temperatura ambiente até seu descongelamento completo. Em seguida se adicionou 200 µL de clorofórmio (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil) e o microtubo (Axygen

Scientific – Califórnia, EUA) devidamente selado foi vigorosamente agitado durante 30 s para a mistura das soluções e acondicionado a -20°C durante 5 min. Os tubos foram, então, centrifugados (centrífuga Eppendorf modelo 5810R – 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 1h.

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 por inversão com 1 mL de etanol 75% (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil) e novamente centrifugado a 10.000 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 30 µL de água ultrapura (RNase-Free water, QIAGEN – Venlo, Holanda).

4.3.2 Quantificação do RNA e verificação de sua qualidade

A pureza das amostras de RNA extraídas foi avaliada e quantificada no NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific – Massachusetts, EUA) pelas leituras das absorbâncias do ácido nucléico (RNA), e de proteínas e outros contaminantes. Foram consideradas adequadas as amostras cujo resultado da relação A₂₆₀/A₂₈₀ e A₂₆₀/A₂₃₀ fossem superiores ao valor 1,8.

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, nítidas e intensas numa relação de 2:1.

4.3.3 Eliminação do DNA genômico e purificação do RNA

Previamente à síntese do DNA complementar para a realização da RT-PCR, é indicado o tratamento da amostra de RNA total em duas etapas. A primeira etapa consiste na digestão da amostra de RNA total com a enzima DNase (RNase-Free DNase Set, QIAGEN – Venlo, Holanda), confere resultados mais confiáveis, uma vez que a amplificação pela PCR será apenas do DNA complementar sintetizado a partir do RNA, refletindo a expressão do gene (RNA mensageiro) e não do gene constitutivamente presente no DNA das células humanas (DNA genômico).

A segunda etapa corresponde à purificação do RNA (RNeasy MinElute Clean-up Kit, QIAGEN – Venlo, Holanda), elimina eficientemente os contaminantes proporcionando uma amostra de RNA de alta qualidade e concentrado, levando a resultados da PCR mais fidedignos. Os dois processamentos descritos foram realizados de acordo com as indicações do fabricante para uma quantidade máxima de 45µg de RNA total extraído.

Para a digestão com DNase (RNase-Free DNase Set, QIAGEN – Venlo, Holanda) acrescentou-se a 45 µg de RNA de cada amostra, 10 µL do tampão da reação (RDD buffer) e 2,5 µL da enzima DNase (DNase I RNase-Free) em um volume final de 100 µL. Esta mistura foi acondicionada à temperatura ambiente por 10 min para permitir a ação da enzima de degradação do DNA.

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

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

centrifugação a 10.000 rpm por 2 min à temperatura ambiente.

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

4.3.4 Reação de transcrição reversa – síntese do cDNA

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada com o conjunto de reagentes High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies – Califórnia, EUA) partindo de 1 μ g de RNA tratado com DNase e purificado.

O RNA foi combinado 1 μ L de RNase OUT (Invitrogen, Life Technologies – Califórnia, EUA), 2 μ L de 10x RT Buffer, 0.8 μ L de dNTP MIX (100mM), 2 μ L de 10x RT Random Primer, 1 μ L de Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/ μ L), num volume final de 20 μ L. Em seguida, as amostras foram acondicionadas na termocicladora (Eppendorf Mastercycler – Hamburg, Alemanha) e submetidas aos seguintes ciclos de temperaturas: 10 min a 25°C (incubação), 120 min a 37°C (reação de RT) e 5 min a 85°C (inativação da enzima de RT) para a síntese do cDNA.

4.3.5 PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real foi realizada com os iniciadores e as condições descritas nos tópicos a seguir.

4.3.5.1 Iniciadores

As sequências dos iniciadores para a reação de PCR em tempo real foram desenhadas na base de dados Primer-Blast, disponível na base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI)¹, para os genes FOXP3, MIP-3 α , IL-2, IL-10 e IL-35, sendo este último composto pelos genes IL-12A e EBI-3; e para o gene constitutivo GAPDH (Tabela 4.1). Sendo que as sequências de iniciadores deveriam englobar, em ao menos uma delas (senso ou antisenso), regiões de dois éxons diferentes, garantindo a amplificação apenas do RNA mensageiro. Além de apresentar temperatura de associação entre 58 e 62°C, porcentagem G-C de até 40%, produtos de PCR entre 100 e 200 pares de bases e baixa formação de estruturas secundárias.

Tabela 4.1 - Iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real

Gene	GeneBank	Iniciadores 5' → 3'	Tamanho do produto de PCR
FOXP3	NM_014009	Senso: CACTGCCCTAGTCATGGTG Anti-senso: CGTTGAGAGCTGGTGCATGA	107 pb
MIP3 α	NM_004591	Senso: CGAATCAGAAGCAGCAAGCA Anti-senso: TTGGATTTGCGCACACAGAC	167 pb
IL-2	NM_000586	Senso: AGAACTCAAACCTCTGGAGGAAG Anti-senso: GCTGTCTCATCAGCATATTCACAC	153 pb
IL-10	NM_000572	Senso: AGGACTTTAAGGGTTACCTGGG Anti-senso: TCACATGCGCCTTGATGTCT	114 pb
IL-12A	NM_000882	Senso: CTCCAGAAGGCCAGACAAACT Anti-senso: TGGTAAACAGGCCTCCACTG	108 pb
EBI-3	NM_005755	Senso: CTGGATCCGTTACAAGCGTCAG Anti-senso: CACTTGGACGTAGTACCTGGCT	115 pb
GAPDH	NM_002046	Senso: GCATCCTGGGCTACACTGA Anti-senso: CCACCACCCTGTTGCTGTA	162 pb

*pb: pares de base

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

4.3.5.2 Reação de PCR

As reações foram realizadas em duplicata 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 a cada 0,5 µL de cDNA, 5 µL de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies – Califórnia, EUA) e 0,4 µL de cada iniciador (400nM), num volume final de 10 µL.

A amplificação em tempo real foi realizada através do aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies – 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 (desnaturação) e 60 s a 60° C (hibridização/extensão-detecção).

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 (GAPDH).

4.4 Análise dos resultados

A expressividade dos genes analisados foi avaliada nos indivíduos portadores de UAR em relação aos controles, a partir da normalização dos dados da quantificação, com base na expressão do gene constitutivo, pelo método de CT comparativo conforme a quantificação relativa ou $2^{-\Delta\Delta CT}$. Neste método são comparados os valores de CT (*Threshold cycle*), ou seja, do número do ciclo em que a fluorescência gerada na reação atinge o limiar de amplificação exponencial (*threshold*). E comparada estatisticamente, através do teste estatístico Mann-Whitney (programa BioEstat 5.0, Manuel Ayres, 2007 – Pará, Brasil).

5 RESULTADOS

Foram coletadas no Ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOUSP, 12 amostras de pacientes no grupo caso (UAR) e 12 amostras no grupo controle. Realizou-se a extração e purificação do RNA de 11 amostras de UAR e 8 controles. As 14 amostras de RNA com maior concentração, qualidade e pureza, de acordo com a avaliação espectrofotométrica (Tabela 5.1) e gel de integridade do RNA (Figura 5.2) foram submetidas à reação de RT-PCR em tempo real. Em relação aos parâmetros de sexo e idade entre os grupos analisados, foi observado que não houve diferença significativa ($P > 0,05$), sendo então estatisticamente semelhantes.

O diagrama a seguir demonstra o fluxo dos pacientes admitidos ao estudo e as razões de perda de controles e amostras (Fig 5.1, consort flow diagram).

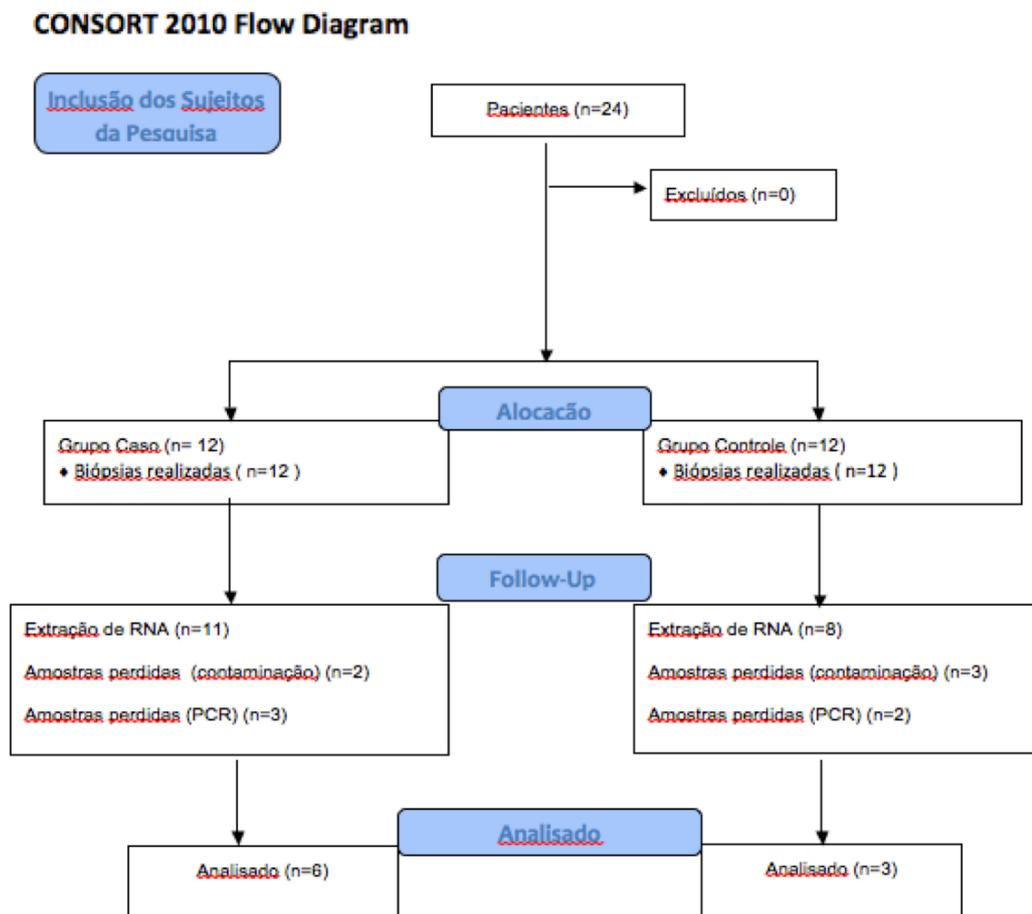


Tabela 5.1 - Resultados da análise espectrofotométrica das amostras de RNA extraídas analisadas no Nanodrop pré- e pós-purificação das mesmas. As amostras foram consideradas adequadas para serem submetidas à reação de RT-PCR em tempo real quando as relações A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} eram superiores a 1,8

Amostra	Pré-purificação			Pós-purificação		
	[C]µg/µL	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	[C]µg/µL	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
A1	915,1	1,97	1,58	1247,7	2,21	4,02
A2	1343,2	1,99	0,83	1922,3	2,13	3,17
A3	743,1	1,97	1,69	1015,5	2,23	4,77
A4	877,0	1,88	0,80	998,1	2,27	5,97
A5	822,7	1,70	0,57	1010,4	2,24	4,97
A6	1013,0	1,93	1,09	1583,2	2,18	3,63
A7	1106,5	1,91	1,14	1050,3	2,24	5,29
A8	910,5	1,81	0,58	447,9	2,02	2,34
A9	1842,0	1,87	0,77	338,1	2,06	1,23
A10	1298,1	1,90	1,07	822,3	2,06	1,49
A11	907,3	1,50	0,79	203,3	2,04	1,69
E1	1171,0	1,81	0,58	269,0	2,07	3,26
E2	876,4	1,68	1,18	417,4	1,98	2,30
E3	1379,0	1,73	1,04	61,7	2,03	1,32
E4	2312,2	1,85	1,24	141,9	1,93	1,48
E5	697,1	1,64	0,35	73,9	2,02	1,37
E6*	1512,0	1,79	1,11	51,2	2,04	0,22
E7*	533,6	1,50	0,70	104,5	2,07	0,62
E8*	408,8	1,73	0,53	6,9	1,83	0,55

A: paciente do grupo caso (UAR); E: paciente do grupo controle; *Amostras com contaminação por reagentes de experimentos anteriores alta; as amostras A8, A10, E6, E7, E8 não foram submetidas à reação de RT-PCR em tempo real.

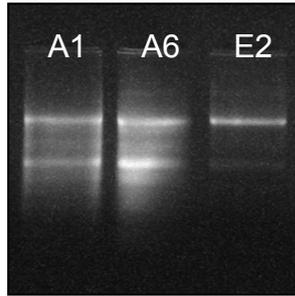


Figura 5.2 - Gel de integridade do RNA de amostras incluídas no estudo: gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo em que se pode observar a presença das bandas 28s e 18s, correspondentes ao RNA ribossômico, numa relação 2:1, conferindo integridade do material extraído

As características gerais da casuística avaliada encontram-se discriminadas no Quadro 5.1. A população de pacientes com UAR compôs-se de 9 mulheres e 2 homens, com média de idade de 40.7 anos. As características destes pacientes estão sumarizadas na tabela 5.2. O tipo e gravidade das UAR apresentadas pelos pacientes encontram-se descritas no quadro 5.2.

Quadro 5.1 – Características gerais da casuística.

Casuística				
	M - Caso	H - Caso	M - Controle	H - Controle
Faixa Etária (media)	19/56 (38,9)	49 (49)	23/67 (45,6)	31/51 (41)
UAR menor	6	2	-	-
UAR maior	3	0	-	-
Leve/Moderado	1	2	-	-
Grave	8	0	-	-
Ex - Tabagista	2	0	3	1
Não Tabagista	7	2	7	1
História Familiar +	2	0	0	0
História Familiar -	7	2	10	2

Tabela 5.2 - Características clínicas dos pacientes com UAR incluídos no estudo

Características	Pacientes UAR N (%)
Gravidade*	
Leve/Moderado	3 (27,3)
Grave	8 (72,7)
Tipo de UAR	
Menor	8 (72,7)
Maior	3 (27,3)
Herpetiforme	0 (0)
Tabagistas/Ex-Tabagistas	2 (18,2)
História familiar	2 (18,2)
Fatores desencadeantes ou agravantes	
Estresse	3 (27,3)
Alimentos	1 (9,1)
Trauma	0 (0)
Ciclo menstrual	1 (9,1)
Creme dental	0 (0)
Sem associação	6 (54,5)
Satisfação com a terapêutica	
Sim	6 (54,5)
Não	5 (45,5)

*classificação de acordo com SHIP, 1972 e MILLER; SHIP; RAM, 1977.

Quadro 5.2 – Tipo e gravidade das UAR por paciente.

Características do Quadro Ulcerativo		
Amostra	Gravidade	Tipo de UAR
A1	leve/moderado	maior
A2	severo	menor
A3	severo	menor
A4	severo	maior
A5	severo	menor
A6	leve/moderado	menor
A7	leve/moderado	menor
A8	severo	menor
A9	severo	maior
A10	severo	menor
A11	severo	menor

Nenhum dos pacientes com UAR incluído no estudo apresentou o quadro de aftas associado a discrasias sanguíneas ou deficiências nutricionais, visto que os exames solicitados se apresentavam dentro da faixa de normalidade (hemograma completo, dosagens séricas de vitamina B12, ácido fólico, ferro e ferritina).

Dentre estes pacientes, 3 relataram tratamento rotineiro da UAR com corticosteroides tópicos (triancinolona – Omcilon[®] A em orabase e Mud Oral[®] e betametasona – Celestone elixir) e os outros negaram qualquer tipo de tratamento frequente anterior à consulta, embora já tivessem experimentado uma variedade de produtos.

Previamente à coleta da amostra de UAR, os pacientes que faziam uso de qualquer terapêutica foram orientados a interromperem o uso por um período mínimo de 15 dias. E após a consulta e coleta de amostra por biópsia da lesão, foi prescrito Prednisona (40mg/dia por 7 dias) para 5 pacientes que apresentavam quadro severo de UAR com múltiplas lesões e grande sintomatologia. Para os demais pacientes a medicação inicial proposta foi corticoterapia tópica, com propionato de clobetasol 0,05% (solução ou gel) ou dexametasona elixir. Sendo esta última disponível nas farmácias da rede pública de saúde.

Histologicamente observou-se, no fragmento enviado ao Laboratório de Patologia Cirúrgica da FOUSP, revestimento por epitélio pavimentoso estratificado com exocitose e área de solução de continuidade, com exposição do tecido conjuntivo subjacente recoberta por exsudato composto por material necrótico e infiltrado polimorfonuclear. A lâmina própria é constituída por tecido conjuntivo denso com intenso infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 5.2).

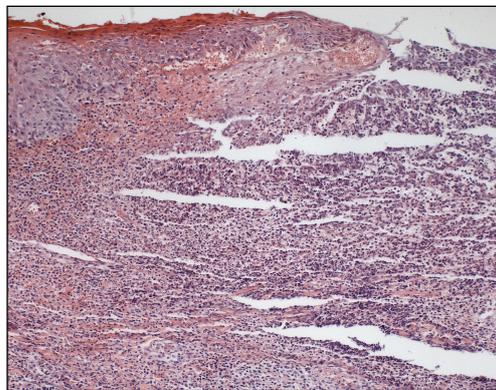


Figura 5.2 - Corte histológico da UAR (10x), evidenciando processo inflamatório crônico inespecífico com ulceração

Analisando os resultados obtidos pela amplificação em tempo real, foram consideradas para a análise de expressão dos genes FOXP3, MIP-3 α , IL-2, IL-10 e IL-35, 6 amostras do grupo caso e 3 do grupo controle², em que as curvas de amplificação (Figura 5.3A) e de dissociação dos iniciadores (Figura 5.3B) foram consideradas representativas. Os demais resultados foram descartados desta análise³.

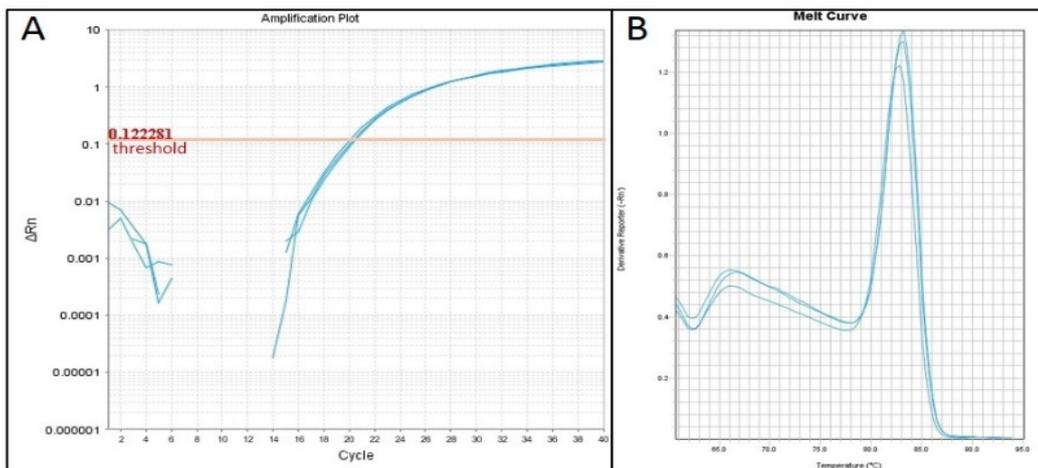


Figura 5.3 - A: Curva de amplificação considerada adequada, evidenciando amplificação exponencial do produto de PCR e a delimitação automática do limiar de amplificação exponencial pelo equipamento de PCR em tempo real (Threshold). B: Curva de dissociação dos iniciadores conferindo especificidade da reação de PCR

Na análise dos dados obtidos pela quantificação relativa avaliados pelo método CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão dos genes avaliados ($P > 0,05$)⁴, porém observa-se a tendência de aumento da expressão gênica do FOXP3 (11,06-fold change), IL10 (4,37-fold change), IL35 (IL12A: 21,65-fold change e EBI3: 5,12-fold change) e de diminuição do MIP3 α (0,25-fold change) e IL-2 (0,74-fold change) nos pacientes com UAR em relação ao grupo controle (Figura 5.4).

² Foram consideradas para a análise de expressão gênica as amostras A1, A2, A3, A4, A5, A6, E1, E2 e E3 baseado nos resultados da reação de PCR em tempo real.

³ Foram descartadas desta análise as amostras A7, A9, A11, E4, E5 por não apresentarem amplificação em tempo real adequada.

⁴ Tamanho de amostra considerado pequeno para avaliação por testes estatísticos não-paramétricos.

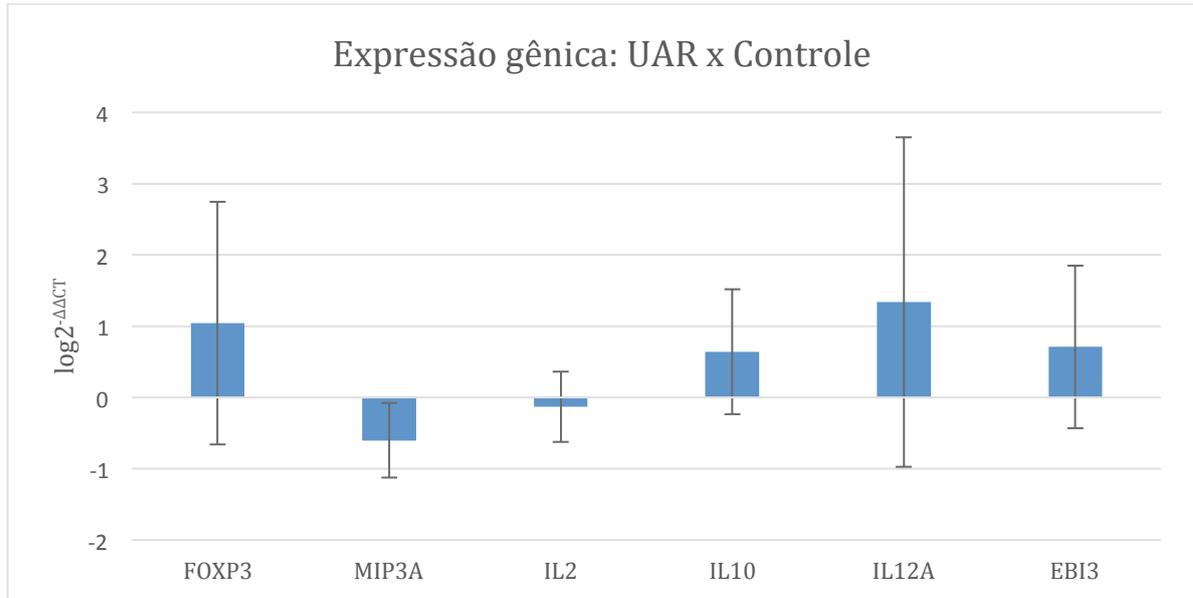


Figura 5.4 - Diferença na expressão gênica entre grupo UAR e controle: embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa na expressão gênica ($P > 0,05$), observa-se tendência de aumento da expressão gênica do FOXP3 (11,06-fold change), IL10 (4,37-fold change), IL35 (IL12A: 21,65-fold change e EBI3: 5,12-fold change) e de diminuição do MIP3 α (0,25-fold change) e IL-2 (0,74-fold change).

6 DISCUSSÃO

O grande investimento até hoje aplicado às pesquisas voltadas ao esclarecimento da etiopatogenia e desenvolvimento de terapêuticas mais efetivas para o controle da UAR ainda não produziu resultados totalmente satisfatórios. A biologia molecular parece oferecer um campo de investigação promissor para a definitiva compreensão dos complexos mecanismos imunológicos e inflamatórios que envolvem as condições de instalação e desenvolvimento das UAR.

Estes estudos genéticos e imunológicos muito avançaram nos últimos dez a quinze anos no campo da investigação dos vários componentes da resposta imune, embora, ao que parece, ainda reste um longo caminho a percorrer. A descoberta e demonstração das múltiplas capacidades dos linfócitos T, receptores *Toll-like*, quimiocinas e seus receptores, além de novas citocinas na UAR; somada à compreensão das propriedades redundantes, adaptativas e diversificadas desses componentes da resposta imune trazem de um lado, grandes desafios a cientistas e pesquisadores e, de outro, certa euforia e energia com a possibilidade do desvendamento das diretrizes que governam a resposta imune (Pasare, Medzhitov, 2005; Borra et al., 2009; Fox et al., 2011). Essa possibilidade é extremamente auspiciosa, comparável às grandes descobertas científicas da humanidade.

Apesar de sua etiologia ainda ser classificada como desconhecida, é inegável a participação essencial do sistema imune em sua evolução e comportamento (Lehner 1972; Savage et al., 1985; Pedersen et al., 1992; Rogers, 1997; Buno et al., 1998; Borra et al. 2004; Lewkowicz et al., 2005). O novo conhecimento que a biologia molecular tem trazido a este campo vem também nos ajudando a compreender os vários fatores modificadores do comportamento das UAR que foram sendo observados pelos clínicos ao longo da história das UAR (Ship, 1972; Stanley, 1972; Miller; Ship, 1977; Wray et al., 1978; Wray et al., 1981; Woo, Sonis, 1996; Shotts et al., 1999; Tuzun et al., 2000; Boulinguez et al., 2000; Casiglia, 2002; Scully et al., 2003; Natah et al., 2004; Scully, Felix, 2005; Scully, Porter, 2008; Tappuni et al., 2013). Barros et al. (2010) propuseram um modelo para a explicação dos eventos imunológicos que culminam na lesão de UAR, este está baseado no desequilíbrio das respostas Th1/Th2, a disfunção da barreira epitelial causada por alterações na função da via do receptor TLR2 em conjunto com uma redução da

tolerância imunológica. Vários estudos têm demonstrado aumento da expressão de genes relacionados com a reação Th1 (Borra et al., 2004; Dalghous et al., 2006; Barros et al., 2010; Lewkowicz et al., 2011), em conjunto com alterações em linfócitos T reguladores (Lewkowicz et al., 2005; Lewkowicz et al., 2008; Pekiner et al., 2012).

Desta forma, foram selecionadas para o estudo no presente trabalho, citocinas que estivessem relacionadas a esses diferentes aspectos apontados pela literatura (Borra et al., 2004; Barros et al., 2010; Gallo et al., 2012).

A análise da expressão gênica, por meio do RT-PCR em tempo real realizada mostrou, embora sem diferença estatisticamente significativa, tendência de aumento da expressão gênica do FOXP3, IL-10 e IL-35; e de diminuição na expressão gênica da MIP3- α e IL-2 em amostras de UAR recentes em relação à mucosa clinicamente saudável.

O FOXP3 tem sido considerado um marcador específico de linfócitos T reguladores CD4+CD25^{high} (Bennett et al., 2000; Beyer; Schultze, 2006; Zhang, Zhao, 2007; Lewkowicz et al., 2008), e seu RNA mensageiro apresentou-se 11.06 vezes mais expresso (*fold-change*) nas amostras de UAR em relação à mucosa clinicamente saudável neste estudo. Considerando-se que os Treg apresentam papel importante na função de modulação da inflamação, contribuindo para a manutenção da tolerância oral (Barros et al., 2010), este aumento de expressão do gene que codifica o FOXP3 pode representar uma tentativa do organismo de acumular este tipo de células, os Treg, possivelmente para a supressão da inflamação exacerbada presente na lesão.

Alguma alteração funcional pode estar presente impedindo que estas Treg desempenhem suas funções adequadamente. Porém, até o ponto em que se foi possível investigar, não existem estudos sobre a expressão proteica ou funcionalidade deste fator de transcrição que confere ao linfócito T CD4+ CD25^{high} a característica de supressão de resposta inflamatória na lesão de UAR.

Poucos estudos avaliaram a expressão deste gene na UAR e basicamente avaliaram a expressão sistêmica deste (sangue periférico). Em 2008, Lewkowicz et al. observaram diminuição de linfócitos T CD4+ CD25+ FOXP3+ no sangue periférico em pacientes UAR comparado a controles por meio de análise FACS, um tipo de citometria de fluxo baseado em anticorpos associados a marcadores fluorescentes. Neste mesmo estudo, também foi observado que os Treg de

pacientes com UAR eram menos eficientes na supressão da produção de citocinas produzidas pelos Tef, em ensaios de estimulação e proliferação celular, em relação aos indivíduos controle. Além disso, apenas observaram a expressão do FOXP3 em uma das 11 amostras de UAR coletadas por biópsia, com até 3 dias de duração, assim como as amostras coletadas em nosso estudo, e em nenhuma amostra do grupo controle. Desta forma os autores reportaram que falharam nesta investigação do FOXP3 em amostras de tecido.

O estudo de Pekiner et al., 2012, em contrapartida ao anteriormente citado, observaram níveis elevados de Treg CD4+ CD25^{high} tanto em pacientes com UAR como naqueles com Doença de Behçet em relação a controles saudáveis, analisando amostras de sangue periférico por citometria de fluxo. Porém, não observou diferenças estatisticamente significativas em relação aos Treg CD4+ CD25+ FOXP3+. Contudo, estes autores não referem no trabalho se a coleta do sangue foi realizada durante um surto de UAR. Apenas especificam que estes pacientes não estavam fazendo uso de medicamentos sistêmicos e não apresentavam quadro infeccioso no momento da coleta do sangue. Apesar desta fragilidade, estes autores referem que pela avaliação realizada não se pode identificar se estes linfócitos T CD4+ CD25^{high} são realmente supressores ou efetores.

Contraditoriamente, Lewkowicz et al., 2005 detectaram uma diminuição dos linfócitos T CD4+ CD25^{high} no sangue periférico de pacientes com UAR, apresentando lesões ativas ou não, em relação a controles saudáveis. Esta alteração foi confirmada por um estudo realizado pelo mesmo grupo em 2008 e anteriormente citado.

Alguns estudos específicos de biomarcadores de Treg (Liu et al., 2006; Hartigan-O'Connor et al., 2007) salientam a dificuldade da análise quantitativa e isolamento de Treg viáveis em amostras humanas. Isto porque o marcador de superfície mais comumente conhecido e estudado, o CD25^{high}, é altamente expresso no Treg, porém também é expresso por outros tipos de linfócitos T além dos Treg, o que pode comprometer a análise. Embora o FOXP3 seja um marcador mais específico, é uma molécula intracelular, não representando um bom marcador para estudos de FACS e citometria de fluxo, que se baseiam em marcadores de superfície para a separação das células.

Alguns pesquisadores se dedicaram à elaboração de melhores métodos para a detecção, por meio de citometria de fluxo, do FOXP3+, especificamente em Treg (Law et al., 2009) Essa metodologia explica a ausência de resultados discrepantes nas populações FOXP3+ entre as amostras com UAR e controles no estudo de Pekiner et al., 2012. Isto porque além do fato de ser um marcador intracelular que dificulta a avaliação por citometria de fluxo (Liu et al., 2006; Hartigan-O'Connor et al., 2007), Pekiner et al., 2012 utilizaram o fluorocromo FITC associado ao anticorpo anti-FOXP3. Este, em conjunto com o Alexa-488, apresenta especificidade inferior aos fluorocromos PE e Alexa-647 na detecção de Treg FOXP3+ (Law et al., 2009) por métodos de separação celular. Mais ainda, a baixa contagem observada por Lewkowicz et al., 2008 pode estar relacionada ao tipo de fluorocromo utilizado, o Alexa-488, mencionado como menos específico anteriormente.

Embora tenha sido utilizado o mesmo tipo de reagente e metodologia nos grupos caso e controle, observando-se diminuição significativa de Treg FOXP3+ no sangue periférico de pacientes com UAR (Lewkowicz et al., 2008) e este achado ser compatível com a teoria de disfunção dos mecanismos de supressão envolvidos com a tolerância oral (Barros et al., 2010), são necessários mais estudos para esclarecimentos destas contradições entre o resultado no presente estudo, em tecido, e os citados anteriormente, em amostras de sangue.

Atualmente relata-se que os Treg humanos se distinguem dos outros tipos e linfócitos por um baixo nível expressão do marcador de superfície CD127, em conjunto com uma alta expressão do CD25. Linfócitos CD4+ CD25^{high} CD127^{low} correspondem a 5-12% dos linfócitos T CD3+ CD4+ em indivíduos normais e apresentam funções supressoras da resposta imunológica. Sem estimulação estas células apresentam baixos níveis de FOXP3, sendo que este é rapidamente expressado quando estas células são estimuladas (Liu et al., 2006; Hartigan-O'Connor et al., 2007). O CD127 ainda não foi avaliado na UAR e esta linha de investigação em Treg constitui um vasto campo para pesquisa.

Diversas citocinas e quimiocinas foram objeto de estudo em pacientes com UAR (Taylor et al., 1992; Buño et al., 1998; Natah et al., 2000; Sun et al., 2000; Sun et al., 2004; Borra et al., 2004; Lewkowicz et al., 2005; Boras et al., 2006; Dalghous et al., 2006; Albanidou-Farmaki et al., 2007; Miyamoto et al., 2008; Eguia-del Valle et al., 2011; Gallo et al., 2012; Pekiner et al., 2012; Avci et al., 2014; Ozyurt et al., 2014), o que vem permitindo esclarecimento progressivo dos mecanismos

envolvidos na progressão dos eventos inflamatórios nas UAR.

A IL-10 e IL-35, são citocinas anti-inflamatórias produzidas pelos Treg (Cakman et al., 1996; Bazrafshani et al., 2003; Liu et al., 2006; Bardel et al., 2008; Choi et al., 2015) e também apresentam expressão gênica aumentada nas amostras de UAR no presente estudo em relação à mucosa oral sadia. Esta associação é positivamente correlacionada ao achado anterior de aumento da expressão gênica do FOXP3, numa provável tentativa de conter o processo inflamatório exacerbado.

Outros estudos que investigaram a IL-10 na UAR observaram a diminuição no nível desta (Buno et al., 1998; Lewkowicz et al., 2005; Miyamoto et al., 2008; Avci et al., 2014). Em contradição ao presente achado, Buno et al. 1998 encontraram diminuição na expressão gênica da IL-10 em amostras de tecido de UAR em relação a controles saudáveis. Entretanto, a expressão gênica no estudo anteriormente citado foi analisada por PCR convencional com a realização do gel de agarose 2% para verificação da diferença de expressão de acordo com a intensidade das bandas do produto da PCR observado após a eletroforese do mesmo em gel de agarose, que possibilita grande variedade de interpretação. Hoje se sabe que este tipo de avaliação apresenta resultados pouco sensíveis, por analisar a fase final da reação, conhecida como platô. Além da dependência interpretativa da eletroforese em gel de agarose em relação aos métodos mais utilizados recentemente como o RT-PCR em tempo real (Bustin, 2000).

Miyamoto et al., 2008 observaram diminuição estatisticamente significativa na expressão proteica da IL-10, avaliada por imunohistoquímica, em amostras de UAR em relação a controles saudáveis e amostras de outras doenças inflamatórias como colite ulcerativa, doença de Crohn e hiperplasia fibrosa inflamatória. Avci et al., 2014 também detectaram diminuição estatisticamente significativa nos níveis séricos de IL-10 em pacientes com UAR e lesões ativas no momento da coleta do sangue periférico em relação a indivíduos saudáveis, avaliando-se o soro destes pacientes por ELISA.

Analisando as células mononucleares do sangue periférico de pacientes com UAR, quanto a produção da IL-10, Lewkowicz et al., 2005 demonstraram diminuição no nível da IL-10 produzida em culturas de células, não estimuladas e estimuladas, avaliando-se o sobrenadante por ELISA em relação a indivíduos saudáveis. Porém outro estudo observou que um maior número de células Th2 secreta a IL-10 em

pacientes com UAR em relação aos controles em culturas de células não estimuladas avaliadas por ELISPOT (Albanidou-Farmaki et al., 2007).

É possível que o RNA mensageiro da IL-10 que está sendo transcrito, embora produzido em grande quantidade, como observamos na variação de 4.37 vezes no paciente com UAR em relação aos controles em nosso estudo, não esteja sendo traduzido na proteína efetora na mucosa do paciente com UAR, corroborando com o resultado observado no estudo de Miyamoto et al 2008 e que isso reflita na menor quantidade desta proteína circulante (Lewkowicz et al., 2005; Avci et al., 2014) apesar dos linfócitos T imunossupressores terem capacidade, até aumentada, de produzir esta citocina em condições *in vitro* (Albanidou-Farmaki et al., 2007).

A IL-35 foi primeiramente descrita em 2007 e pode constituir importante alvo para compreensão da etiologia e conseqüentemente para tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias em geral (Collison et al., 2007). É uma citocina heterodimérica formada por duas subunidades que se expressam independentemente, a IL12A (cadeia α : subunidade p35) e EBI3. Embora pertencente à família IL-12 (pró-inflamatória Th1), a IL-35 parece desempenhar importante papel imunossupressor e imunoregulador inibindo células Tef CD4+ Th1 e Th17, aumentando a população de Treg e a produção de IL-10 (Schoenhaut et al., 1992; Choi et al., 2015).

Por ser uma citocina recentemente descrita, poucos estudos se dedicaram à investigação desta, sendo o presente estudo pioneiro na investigação da IL-35 em UAR. Em relação a outras com perfil etiológico inflamatório, a IL-35 foi encontrada com expressão gênica elevada em amostras gengivais de pacientes com periodontite crônica seguidos por aqueles que apresentavam periodontite agressiva em relação aos controles saudáveis em estudo de RT-PCR convencional (Kalburgi et al., 2013). Outro estudo em doença periodontal confirmou este resultado, observando maior expressão proteica da IL-35, avaliada por ELISA, em amostras de fluido gengival crevicular de pacientes com periodontite crônica em relação a pacientes com gengivite e controles saudáveis. Esta associação não foi observada em outras amostras destes mesmos pacientes, como plasma sanguíneo e saliva (Koseoglu et al., 2015), sugerindo que os níveis de IL-35 parecem estar elevados em locais de inflamação.

Apesar de constituírem processos de etiologia diversa; periodontite e UAR; também foi verificado no estudo uma expressão aumentada do RNA mensageiro das

duas subunidades formadoras da IL-35, a IL12A (p35) foi observado 21.65 vezes mais expresso nas amostras de UAR em relação aos controles e da subunidade EBI3, por sua vez, 5.12 vezes mais expresso. Embora o aumento da expressão da subunidade da IL-12A deva ser analisado com cautela, pois corresponde à cadeia α da citocina heterodimérica IL-12 em conjunto com a subunidade p40 e trata-se de uma citocina pró-inflamatória Th1 (Brombacher et al., 2003), a IL-35 parece estar mais expressada em sítios de inflamação.

Por sua vez, estudo em doenças francamente autoimunes aponta a IL-35 em baixos níveis, como demonstram os resultados de Ning et al. 2015, que observaram uma diminuição na expressão proteica da IL-35 no soro de pacientes com artrite reumatoide em relação aos controles saudáveis. Além disso, também observaram uma correlação negativa entre a expressão da IL-35 e parâmetros clínicos da doença, tais como: idade, erosão óssea e fator reumatoide, indicando a participação desta citocina nos processos inflamatórios relacionados ao desenvolvimento da artrite reumatoide.

A aparente relação de cooperação entre a IL-35 e a IL-10 (Ning-Wei, 2010; Choi et al., 2015) talvez explicasse a tendência de alta da IL-10 também observada em nossa investigação. Uma ação efetiva desses mecanismos imunossupressores levaria a uma redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias provavelmente em tempo posterior à fase aguda inicial do rompimento da mucosa oral. Esta situação explicaria os achados deste estudo em respeito à expressão de moléculas pró-inflamatórias como a IL-2 e MIP-3 α , que parecem estar menos expressas na UAR em relação aos controles em 0.74 e 0.25 vezes, respectivamente. (Schutyser et al., 2000; Nelson et al., 2001).

Paradoxalmente, vários trabalhos detectaram elevados níveis de IL-2 em pacientes UAR em relação a pacientes controles (Buño et al., 1998; Sun et al., 2000; Lewkowicz et al., 2005; Albanidou-Farmaki et al., 2007; Avci et al., 2014), entretanto apenas Buño et al., 1998 avaliaram, de maneira semelhante ao presente estudo, a expressão gênica da IL-2 em amostras de tecido proveniente de biópsias com a metodologia de RT-PCR convencional, que apresenta a desvantagem já abordada anteriormente.

De maneira geral, a maioria das investigações se utilizou de células do sangue periférico, avaliando a produção de IL-2 *in vitro* em culturas estimuladas (Lewkowicz et al., 2005; Albanidou-Farmaki et al., 2007) ou os níveis séricos da

mesma (Pekiner et al., 2012; Avci et al., 2014). Num destes últimos estudos, não foram observadas diferenças nos níveis séricos de IL-2 entre pacientes UAR, doença de Behçet e controles saudáveis (Pekiner et al., 2012).

A MIP-3 α , ou CCL20, é uma quimiocina pró-inflamatória secretada por linfócitos Th17, e por meio de sua interação com o receptor CCR6 destas células, são desencadeadas ativações de vias pró-inflamatórias com a produção de diversas citocinas. No caso de linhagens celulares intestinais humanas, a expressão da MIP-3 α é regulada pela estimulação por citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α em um mecanismo dose-dependente (Kwon et al., 2002).

Apesar da falta de outros estudos desta quimiocina na UAR, esta correlação também pode ser inferida para esta doença, visto que o TNF- α parece representar um mediador fundamental na UAR (Boras et al., 2006; Jurge et al., 2006). Porém em oposição ao nosso resultado, Kwon et al. 2002 observaram aumento na expressão gênica e proteica da MIP-3 α em amostras de cólon de pacientes com Doença de Crohn ativa, embora não tenham observado isso em colite ulcerativa. Ambas fazem parte do grupo de doenças inflamatórias intestinais que provavelmente compartilham com a UAR alguns mecanismos etiológicos, visto que lesões ulceradas bucais fazem parte da manifestação clínica oral destas doenças.

Mais recentemente observou-se que as células Th17, presentes em processos inflamatórios, expressam a CCL20 que exerce quimioatração, via CCR6, de outros tipos celulares além de novos linfócitos Th17 que retroalimentariam o processo pró-inflamatório. E, justamente, foi observado por Yamazaki et al., 2008 que o outro subtipo celular que expressa o CCR6 são os linfócitos Treg. Desta forma a interação CCL20-CCR6, coordena a migração de células pró-inflamatórias e reguladoras em doenças inflamatórias e auto-imunes. Esta relação pode explicar o acúmulo de Treg e de seus subprodutos observados neste estudo em amostras de UAR.

Embora se observem alguns conflitos entre os diversos trabalhos consultados quanto à maior ou menor expressão de várias das citocinas que foram objeto de investigação em nosso trabalho, há muitas variáveis a se considerar. Desde o substrato utilizado para as investigações (células do sangue periférico, células em cultura, tecido afetado pela UAR), metodologia da investigação, pacientes em surto ativo ou não da doença, tempo decorrido desde o início dos surtos e assim por diante (Monsuur et al., 2008). Quando a expressão foi direcionada à investigação do

RNA mensageiro, em amostras de tecido, grande parte dos estudos avaliados utilizaram metodologias menos fidedignas, como o RT-PCR convencional, tornando frágil a comparação da expressão entre os estudos; ou avaliaram a expressão proteica, que pode diferir da gênica por mudanças nos processos pós-transcricionais e de tradução na proteína efetora.

Os resultados obtidos neste trabalho parecem sugerir que há um aumento na estimulação dos mecanismos supressores da inflamação, pelo aumento na expressão de genes relacionados aos linfócitos Treg (FOXP3, IL-10 e IL-35) na tentativa de controlar o processo inflamatório em resposta a algum estímulo inicial, possivelmente predominantemente Th1 (pró-inflamatório), que culminou no surgimento da úlcera, mesmo nas fases iniciais da lesão. Tendo em vista que as amostras foram coletadas de ulcerações presentes na cavidade oral com até três dias de duração, no entanto essa informação foi prestada pelo próprio paciente e pode ser imprecisa.

A sequência de eventos parece ser bastante célere e efêmera e pode ser crítico o momento em que se procede à coleta do material de estudo ou investigação. Os trabalhos que estudaram pacientes portadores de UAR em fases não ativas puderam determinar diferenças nas expressões genéticas associadas a reações inflamatórias do tipo Th1. Acreditamos que o estudo dos eventos prévios à ulceração clínica pode ser mais esclarecedor do que a análise do quadro quando a ulceração já se encontra presente. Logicamente há dificuldades bastante óbvias impedindo esse tipo de abordagem de forma eficiente.

Se considerarmos que a sequência de eventos imunes associados à ação de quimiocinas e citocinas é bastante rápida, é difícil considerar que a amostra foi de fato homogênea, além das próprias características individuais variáveis. Nesse aspecto o pequeno tamanho da amostra analisada constitui uma fragilidade do trabalho, inclusive na comparação estatística dos resultados obtidos. O prosseguimento nesta linha de investigação, ampliando a amostra analisada e com a inclusão de novas moléculas como o CD127 e o CCR6 parecem promissores no aprofundamento do conhecimento da etiologia da UAR.

7 CONCLUSÃO

A tendência de expressão diferenciada dos elementos investigados no estudo sugere o envolvimento destes na expressão das UAR.

As relações entre os elementos investigados são coerentes com uma fase pós-secreção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias.

Os resultados obtidos abrem novas perspectivas de investigação nas UAR no campo da biologia molecular.

REFERÊNCIAS¹

Albanidou-Farmaki E, Markopoulos AK, Kalogerakou F, Antoniadou 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 Jun;212(2):101-5.

Avci E, Akarslan ZZ, Erten H, Coskun-Cevher S. Oxidative stress and cellular immunity in patients with recurrent aphthous ulcers. *Braz J Med Biol Res.* 2014 May;47(5):355-60. Epub 2014 May 2.

Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, Coulomb-L'Herminé A, Devergne O. Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol.* 2008 Nov 15;181(10):6898-905.

Barros, FM, Lotufo MA, Andrade PM, França, CM, Borra RC. Possible association between TH1 immune polarization and epithelial permeability with toll-like receptors 2 Dysfunction in the pathogenesis of the recurrent aphthous ulceration. *Ulcers.* 2010, Article ID 163804, 11 pages. doi:10.1155/2010/163804.

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 Nov;9(6):287-91.

Bennett CL, Yoshioka R, Kiyosawa H, Barker DF, Fain PR, Shigeoka AO, Chance PF. X-Linked syndrome of polyendocrinopathy, immune dysfunction, and diarrhea maps to Xp11.23-Xq13.3. *Am J Hum Genet.* 2000 Feb;66(2):461-8.

Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood.* 2006 Aug 1;108(3):804-11.

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

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

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Borra RC, de Mesquita Barros F, de Andrade Lotufo M, Villanova FE, Andrade PM. Toll-like receptor activity in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 2009;38:289-98.

Boulinguez S, Reix S, Bedane C, Debrock C, Bouyssou-Gauthier ML, Sparsa A, Le Brun V, De Vencay P, Bernard P, Bonnetblanc JM. Role of drug exposure in aphthous ulcers: a case-control study. *Br J Dermatol*. 2000 Dec;143(6):1261-5.

Brombacher F, Kastelein RA, Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol*. 2003 Apr;24(4):207-12.

Buño 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 Jul;134(7):827-31.

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

Cakman I, Rohwer J, Schutz RM, Kirchner H, Rink L. Dysregulation between TH1 and TH2 T cell subpopulations in the elderly. *Mech Ageing Dev* 1996; 87: 197-209, doi: 10.1016/0047-6374(96)01708-3.

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

Choi J, Leung PS, Bowlus C, Gershwin ME. IL-35 and Autoimmunity: a Comprehensive Perspective. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2015 Jan 27.

Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007 Nov 22;450(7169):566-9.

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 Nov-Dec;35(6):472-5.

Eguia-del Valle A, Martinez-Conde-Llamosas R, Lopez- Vicente J, Uribarri-Etxebarria A, Aguirre-Urizar JM. Salivary levels of tumour necrosis factor-alpha in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16: e33-e36.

Fox JM, Letellier E, Oliphant CJ, Signoret N. TLR2-dependent pathway of heterologous down-modulation for the CC chemokine receptors 1, 2, and 5 in human blood monocytes. *Blood*. 2011 Feb 10;117(6):1851-60. doi: 10.1182/blood-2010-05-287474

Gallo CB, Borra RC, Rodini CO, Nunes FD, Sugaya NN. CC chemokine ligand 3 and receptors 1 and 5 gene expression in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 Jul;114(1):93-8. doi: 10.1016/j.oooo.2012.02.031.

Hartigan-O'Connor DJ, Abel K, McCune JM. Suppression of SIV-specific CD4+ T cells by infant but not adult macaque regulatory T cells: implications for SIV disease progression. *J Exp Med*. 2007 Oct 29;204(11):2679-92.

Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterizaion of human CD4+CD25+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001;193:1285–94.

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

Kalburgi NB, Muley A, Shivaprasad BM, Koregol AC. Expression profile of IL-35 mRNA in gingiva of chronic periodontitis and aggressive periodontitis patients: a semiquantitative RT-PCR study. *Dis Markers*. 2013;35(6):819-23. doi: 10.1155/2013/489648.

Köseoğlu S, Sağlam M, Pekbağrıyanık T, Savran L, Sütçü R. Level of Interleukin-35 in Gingival Crevicular Fluid, Saliva, and Plasma in Periodontal Disease and Health. *J Periodontol*. 2015 Aug;86(8):964-71. doi: 10.1902/jop.2015.140666.

Kwon JH, Keates S, Bassani L, Mayer LF, Keates AC. Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut*. 2002 Dec;51(6):818-26.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD,

McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005 Jan 17;201(2):233-40.

Law JP, Hirschhorn DF, Owen RE, Biswas HH, Norris PJ, Lanteri MC. The importance of Foxp3 antibody and fixation/permeabilization buffer combinations in identifying CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Cytometry A*. 2009 Dec;75(12):1040-50. doi: 10.1002/cyto.a.20815. Erratum in: *Cytometry A*. 2010 Feb;77(2):203.

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

Lewkowicz N, Lewkowicz P, Banasik M, Kurnatowska A, Tchórzewski 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 Jun 15;99(1):57-62.

Lewkowicz N, Lewkowicz P, Dzitko K, Kur B, Tarkowski M, Kurnatowska A, Tchórzewski H. Dysfunction of CD4+CD25high T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 2008 Sep;37(8):454-61. doi:10.1111/j.1600-0714.2008.00661.x.

Lewkowicz N, Kur B, Kurnatowska A, Tchórzewski H, Lewkowicz P. Expression of Th1/Th2/Th3/Th17-related genes in recurrent aphthous ulcers. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2011 Oct;59(5):399-406. doi: 10.1007/s00005-011-0134-1.

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 U S A*. 2006 May2; 103(18):7048-53.

Liu JQ, Liu Z, Zhang X, Shi Y, Talebian F, Carl JW Jr, Yu C, Shi FD, Whitacre CC, Trgovcich J, Bai XF. Increased Th17 and regulatory T cell responses in EBV-induced gene 3-deficient mice lead to marginally enhanced development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2012 Apr 1;188(7):3099-106. doi:10.4049/jimmunol.1100106.

Miller MF, Ship II. 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 Apr;43(4):532-7.

Miyamoto NT Jr, Borra RC, Abreu M, Weckx LL, Franco M. Immune-expression of HSP27 and IL-10 in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med*. 2008

Sep;37(8):462-7. doi: 10.1111/j.1600-0714.2008.00665.x.

Monsuur AJ, de Bakker PI, Zhernakova A, Pinto D, Verduijn W, Romanos J, Auricchio R, Lopez A, van Heel DA, Crusius JB, Wijmenga C. Effective detection of human leukocyte antigen risk alleles in celiac disease using tag single nucleotide polymorphisms. *PLoS One*. 2008 May 28;3(5):e2270. doi: 10.1371/journal.pone.0002270. Erratum in: *PLoS One*. 2009;4(5) doi:10.1371/annotation/53480f56-4ef7-4877-ace7-e5892d392cce.

Natah SS, Häyrynen-Immonen R, Hietanen J, Malmström M, Konttinen YT. Immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha expressing cells in recurrent aphthous ulcer lesions (RAU). *J Oral Pathol Med*. 2000 Jan;29(1):19-25.

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

Nelson RT, Boyd J, Gladue RP, Paradis T, Thomas R, Cunningham AC, Lira P, Brissette WH, Hayes L, Hames LM, Neote KS, McColl SR. Genomic organization of the CC chemokine mip-3alpha/CCL20/larc/exodus/SCYA20, showing gene structure, splice variants, and chromosome localization. *Genomics*. 2001 Apr 1;73(1):28-37.

Ning-Wei Z. Interleukin (IL)-35 is raising our expectations. *Rev Med Chil*. 2010 Jun;138(6):758-66.

Ning X, Jian Z, Wang W. Low Serum Levels of Interleukin 35 in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Tohoku J Exp Med*. 2015;237(2):77-82. doi: 10.1620/tjem.237.77.

Ozyurt K, Celik A, Sayarlioglu M, Colgecen E, Inci R, Karakas T, Kelles M, Cetin GY. Serum Th1, Th2 and Th17 cytokine profiles and alpha-enolase levels in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 2014 Oct;43(9):691-5. doi: 10.1111/jop.12182.

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

Pedersen A, Hougen HP, Kenrad B. T-lymphocyte subsets in oral mucosa of patients with recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med*. 1992 Apr;21(4):176-80.

Pekiner FN, Aytugur E, Demirel GY, Borahan MO. Interleukin-2, interleukin-6 and T regulatory cells in peripheral blood of patients with Behçet's disease and recurrent aphthous ulcerations. *J Oral Pathol Med*. 2012 Jan;41(1):73-9. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01061.x.

Rogers RS 3rd. Recurrent aphthous stomatitis: clinical characteristics and associated systemic disorders. *Semin Cutan Med Surg*. 1997 Dec;16(4):278-83.

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

Savage NW, Seymour GJ. Specific lymphocytotoxic destruction of autologous epithelial cell targets in recurrent aphthous stomatitis. *Aust Dent J*. 1994 Apr;39(2):98-104.

Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, Familletti PC, Gately MK, Gubler U. Cloning and expression of murine IL-12. *J Immunol*. 1992 Jun 1;148(11):3433-40.

Schutysse E, Struyf S, Menten P, Lenaerts JP, Conings R, Put W, Wuyts A, Proost P, Van Damme J. Regulated production and molecular diversity of human liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3 alpha from normal and transformed cells. *J Immunol*. 2000 Oct 15;165(8):4470-7.

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

Scully C. Mucosal diseases series. *Oral Dis*. 2005 Mar;11(2):57.

Scully C, Felix DH. Oral medicine--update for the dental practitioner. Aphthous and other common ulcers. *Br Dent J*. 2005 Sep 10;199(5):259-64.

Scully C, Porter S. Oral mucosal disease: recurrent aphthous stomatitis. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Apr;46(3):198-206. Epub 2007 Sep 11.

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

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

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 Jun;87(6):706-7.

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

Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD, Pan YC, Quinn PM, Wolitzky AG, Familletti PC, Stremlo DL, Truitt T, Chizzonite R, et al. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Sep;87(17):6808-12.

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: 116-22.

Sun A, Chang YF, Chia JS, Chiang CP. Serum interleukin-8 level is a more sensitive marker than serum interleukin-6 level in monitoring the disease activity of recurrent aphthous ulcerations. *J Oral Pathol Med.* 2004 Mar;33(3):133-9.

Tappuni AR, Kovacevic T, Shirlaw PJ, Challacombe SJ. Clinical assessment of disease severity in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 2013 Sep;42(8):635-41. doi: 10.1111/jop.12059.

Taylor LJ, Bagg J, Walker DM, Peters TJ. Increased production of tumour necrosis factor by peripheral blood leukocytes in patients with recurrent oral aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 21-25, doi: 10.1111/j. 1600-0714.1992.tb00963.x.

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

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

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 (Clin Res Ed).* 1981 Dec 12;283(6306):1569-70.

Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, Fukunaga A, Nurieva R, Pappu B, Martin-Orozco N, Kang HS, Ma L, Panopoulos AD, Craig S, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol.* 2008 Dec 15;181(12):8391-401.

Zhang L, Zhao Y. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: multiple pathways on the road. *J Cell Physiol.* 2007 Jun;211(3):590-7.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Meios de contato e denúncias éticas ao comitê de ética da FOUSP: (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo, telefone 3091 7960 ou pelo e-mail cepfo@usp.br)

- a. *Pesquisadores Responsáveis:* CD Érica F. Patricio da Silva – Prof Dr Norberto N Sugaya
- b. *Instituição e departamento:*
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
Departamento de Estomatologia – Disciplina de Estomatologia Clínica
- c. *Telefone pra contato:* (11) 3091-7883
- d. *Título do Projeto:* Análise da expressão gênica e proteica da FOX P3, MIP3 α e Interleucinas 2, 10 e 35 em pacientes com 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 na manifestação das 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. Esses exames fazem parte da conduta normal adotada para a caracterização e diagnóstico dos quadros de afta e podem ser realizados gratuitamente, mediante nossa solicitação, no sistema único de saúde.; 3. Caso o Sr (a) seja portador de aftas, realizaremos uma biópsia da lesão. Este procedimento cirúrgico é desenvolvido sob anestesia local e aplicação de suturas (pontos cirúrgicos) que são removidas após uma semana. Essa intervenção cirúrgica não é rotineiramente aplicada para o diagnóstico, entretanto é essencial para o desenvolvimento da pesquisa. O procedimento remove cirurgicamente a lesão aftosa presente e a substitui por uma ferida cirúrgica cujo reparo é mais previsível Caso o Sr (a) não seja portador de aftas, porém necessite realizar biópsia em região de mucosa não queratinizada (qualquer área da mucosa bucal à exceção do palato/ céu da boca e gengivas) para outra finalidade e concorde em ceder parte do tecido removido, separaremos um fragmento para a pesquisa, respeitando todos os conceitos éticos adequados.
- g. *Riscos:* Os riscos dessa pesquisa são mínimos, podendo ocorrer desconforto, dor de leve a moderada, inchaço e hematoma na região, consequentes ao procedimento de biópsia. O procedimento cirúrgico será realizado por profissional habilitado, sob condições adequadas de esterilização, limpeza e anestesia local. O material doado para esta investigação, não produz qualquer prejuízo ou defeito significativo em seu organismo.
- h. *Benefícios:* Como benefício o Sr (a) terá toda informação, orientação e o tratamento necessário, sem qualquer custo. Além disso o Sr (a) receberá o resultado do exame anátomo-patológico e estará colaborando com a evolução do conhecimento científico nesta área, possibilitando a melhoria

dos protocolos de tratamento para esta doença, ainda tão comum e 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 esclarecimento a qualquer momento durante o andamento da pesquisa e o participante pode retirar o consentimento sem ter qualquer prejuízo ao seu 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. _____

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



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da expressão gênica do FOXP3, MIP-3 α e Interleucinas 2, 10 e 35 em pacientes com ulceração aftosa recorrente.

Pesquisador: NORBERTO NOBUO SUGAYA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 40682314.7.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.014.994

Data da Relatoria: 08/04/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto intitulado: "Análise da expressão gênica do FOXP3, MIP-3 e Interleucinas 2, 10 e 35 em pacientes com ulceração aftosa recorrente (UAR)", é um estudo de natureza clínica-laboratorial e pretende testar a hipótese de que a resposta imune anormal do tipo celular possa ser considerada a responsável pela lesão bucal na UAR

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a expressão gênica local do FOXP3, MIP-3, IL-2, IL-10 e IL-35 em população portadora de UAR e indivíduos controles saudáveis, por meio de RT-PCR em tempo real, buscando estabelecer diferenças e/ou similaridades entre populações e substratos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Este item está bem esclarecido no corpo do projeto e no TCLE e as alterações solicitadas foram

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.014.994

contempladas, no que diz respeito aos riscos e benefícios da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esta é uma pesquisa importante para área, que pode contribuir para a compreensão dos fenômenos relacionados à etiologia e comportamento biológico das UARs.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os itens estão em conformidade com as normas

O cronograma apresentado no corpo do projeto foi adequado e está em conformidade com o cronograma descrito no documento "informações básicas do projeto,

Recomendações:

Após todas as respostas e esclarecimentos fornecidos pelo pesquisador, assim como a resolução de todas as pendências, recomendo aprovação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.014.994

SAO PAULO, 08 de Abril de 2015

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br