WELLINGTON HIDEAKI YANAGUIZAWA

Expressão gênica do receptor Toll-like 2 e pesquisa das variantes rs1898830 e rs4696480 em pacientes com líquen plano oral

São Paulo

2016

WELLINGTON HIDEAKI YANAGUIZAWA

**Expressão gênica do receptor Toll-like 2 e pesquisa das variantes rs1898830 e
rs4696480 em pacientes com líquen plano oral**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em **Odontologia (Diagnóstico Bucal)** para obter o título de Mestre em **Ciências**.

Orientador: Profa. Dra. Ana Carolina Fragoso Motta

São Paulo

2016

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

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

Yanaguizawa, Wellington Hideaki.

Expressão gênica do receptor Toll-like 2 e pesquisa das variantes rs1898830 e rs4696480 em pacientes com líquen plano oral/ Wellington Hideaki Yanaguizawa; orientador Ana Carolina Fragoso Motta -- São Paulo, 2016.

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

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Líquen plano bucal. 2. Polimorfismo de nucleotídeo único. 3. Expressão gênica. I. Motta, Ana Carolina Fragoso. II. Título.

Yanaguizawa WH. Expressão gênica do receptor Toll-like 2 e pesquisa das variantes rs1898830 e rs4696480 em pacientes com líquen plano oral. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: / /2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esse trabalho aos meus pais, Wilson Hideo Yanaguizawa e Tieco Kubota Yanaguizawa, por sempre respeitarem minhas escolhas e por acreditarem nos meus sonhos. Obrigado por todo o suporte e amor incondicional. Não há palavras que possam expressar a minha gratidão, amo vocês eternamente.

Aos meus irmãos, William, Wagner e Wânia, pelo companheirismo, incentivo e exemplos de irmãos mais velhos, profissionais e pessoas. Tenho muito orgulho do que se tornaram. Sou grato por sempre estarem comigo, não só nas minhas conquistas, mas principalmente nas minhas frustrações.

Aos meus amigos Leonil Schinovitti, Milena Cristina, Tullio Athayde, Roberto Naoe, Marcel Rigamonti, Francisco Abreu, Mariano Neto, Marcos Pedro, Luiz Pires, Rodrigo Kawamoto, Leandro Oliveira, Diego Coelho, Rafael Ferreira, Thalissa Siqueira, Izabela Rosso, Marina Págin, Isabella Tonin e Letícia Prestes, por toda a amizade e suporte oferecido para resolver e ouvir as muitas questões da minha vida. Também por me conhecerem tão bem a ponto de aprender muito sobre mim mesmo com eles.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Camila de Barros Gallo, por todo o tempo desprendido e dedicação para me passar os seus ensinamentos, tanto no ambiente clínico como laboratorial, como também pela amizade.

Aos demais professores do departamento de Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) pelos ensinamentos e amizade compartilhada na clínica.

À Profa. Dra. Janete Almeida e a Dra. Mônica Alves da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” de São José dos Campos (FO-UNESP), pela recepção e auxílios oferecidos.

À Profa. Dra. Maria Teresa de Seixas Alves da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pelo auxílio.

Aos alunos, ex-alunos, monitores e alunos da iniciação científica das disciplinas de Estomatologia Clínica: Camilla Esteves, Durval Toledo, Giovanna Florezi, Thaís Miniello, Beatriz Jesus, Rosane Gallo, Paula Ragusa, Camila Maríngoli, Keith Berardinelli, Thaís Reis, Robson Cordeiro e Jéssica Okamoto, pela amizade e por todos os momentos muito divertidos vividos nesses anos.

Aos funcionários do departamento de Estomatologia Clínica da FOUSP, especialmente ao Laerte, Nina e Cida, pela colaboração e todo o suporte fornecido.

RESUMO

Yanaguizawa WH. Expressão gênica do receptor Toll-like 2 e pesquisa das variantes rs1898830 e rs4696480 em pacientes com líquen plano oral [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

O Líquen Plano Oral (LPO) é uma doença inflamatória crônica que pode apresentar quadros sintomáticos por longos períodos, afetando a qualidade de vida dos portadores desta doença. Sua etiologia ainda é desconhecida, desse modo os tratamentos disponíveis atualmente se restringem ao controle dos períodos sintomáticos. Acredita-se que a patogênese do LPO possa estar relacionada com alterações imunológicas e genéticas que levam a uma aberrante ativação das vias de sinalização dos receptores Toll-like (TLR). O objetivo deste estudo foi verificar a expressão do TLR2 e duas variantes genéticas deste receptor (rs1898830 e rs4696480) em estudo caso-controle envolvendo 91 amostras de pacientes com LPO e 83 amostras de indivíduos controles, pareados por sexo e idade. Não foram observadas diferenças na expressão do TLR2 entre grupo caso e controle, e nenhuma das variantes avaliadas foi relacionada com relação de risco para o desenvolvimento de LPO. Poucos estudos avaliaram os TLR no LPO, e os dados da literatura sugerem que a cronicidade da lesão e alterações na tolerância oral poderiam estar associadas a resposta imunológica via TLR2, que apresenta sua expressão inalterada no LPO, de forma que estudos mais aprofundados são necessários para se confirmar a real participação deste grupo de receptores no LPO.

Palavras-chave: Líquen plano oral. Receptores Toll-like. Doenças imunomediadas. Expressão gênica. Polimorfismo de nucleotídeo único.

ABSTRACT

Yanaguizawa WH. Gene expression of Toll-like receptor 2 and search the variants rs1898830 and rs4696480 in patients with oral lichen planus [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

Oral lichen planus (OLP) is a chronic inflammatory disease, which can be symptomatic for long periods, affecting the patient quality of life. LPO etiology still unknown, thus the treatments currently available are limited to symptomatic period. Probably the pathogenesis of OLP is related to immunological and genetic changes that provide aberrant Toll-like receptors (TLR) signaling. The aim of this study was to investigate the expression of TLR2 and two genetic variants of this receptor (rs1898830 and rs4696480) in a case-control study involving 91 samples from OLP patients and 83 samples from control subjects, matched for age and sex. No differences were observed in TLR2 expression between case and control groups, and neither of the variants was associated with an increased risk ratio for LPO development. Few studies have been conducted on TLR and OLP, and the literature suggests that the chronicity of the lesion in addition to the changes in oral tolerance may be associated with immune response through TLR2 stimulation, which shows unchanged expression in LPO. Further studies are required to confirm the actual participation of this group of receptors in OLP.

Keywords: Oral lichen planus. Toll-like receptors. Single nucleotide polymorphism. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Diagrama das vias de sinalização dos TLR da membrana citoplasmática: TLR2, TLR4, TLR6, TLR5 e TLR10. O TLR2 forma heterodímero com os TLR1, TLR6 e TLR10. Após o reconhecimento de seus respectivos ligantes, os TLR recrutam moléculas adaptadoras a sua porção intracelular, como MyD88 e TRIF (TLR4), para ativar IRAK, TRAF6 e IKK. A sequência de ativação destas moléculas ativa por sua vez a via de sinalização do NF- κ B e IRF, que induz a transcrição do DNA para a produção de uma série de respostas celulares específicas relacionadas com a proliferação celular, sobrevivência e inflamação, com a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferon do tipo I (no caso das respostas antivirais) 31
- Figura 2.2 - Diagrama das vias de sinalização dos TLR intracelulares: TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9. Ao reconhecerem as PAMPs nos endossomos, os TLR intracelulares recrutam moléculas adaptadoras, como MyD88 (exceto TLR3) e TRIF (TLR3), para ativar IRAK, TRAF6 e IKK. A sequência de ativação destas moléculas ativa por sua vez a via de sinalização do NF- κ B e IRF, induzindo a transcrição do DNA para a expressão de uma série de respostas celulares 32
- Figura 4.1 - Ilustração do ensaio Taqman para genotipagem. Os ensaios Taqman utilizam dois iniciadores (forward primer e reverse primer) e sondas específicas para cada um dos alelos marcados com diferentes agentes fluoróforos (VIC e FAM), que permitem a identificação dos alelos de forma precisa (imagem à esquerda). Os resultados de genotipagem de um ensaio são representados graficamente, sendo que cada ponto representa uma amostra. As cores e posições de cada ponto no gráfico indicam o genótipo de cada amostra: os azuis são homozigotos para o alelo 1 (geralmente marcados por FAM), os verdes são heterozigóticos (marcados pelos dois fluoróforos) e os vermelhos são homozigotos para o alelo 2 (geralmente marcados por VIC) e os pontos restantes representam os controles negativos e as amostras que não foram adequadamente amplificadas. 47
- Figura 5.1 - Ilustração de exemplo de curvas de amplificação (A) e curvas de dissociação (B) consideradas adequadas extraída do programa do 7500 Real-Time PCR System – Applied Biosystems)..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabelas 2.1 - Relação dos diferentes ligantes e localização dos TLR em humanos	33
Tabelas 4.1 - Iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	43
Tabelas 4.2 - Dados dos SNP nos genes-alvo selecionados para genotipagem do grupo caso (LPO) e grupo controle, com base nos critérios de seleção dos SNP adotados para este estudo (posição do SNP, MAF e LD), a partir de SNP encontrados na revisão de literatura relacionada e na consulta de banco de dados.....	46
Tabelas 4.3 - Sequência dos iniciadores utilizados na reação de qPCR para amplificação de gene constitutivo ZNF80..	48
Tabelas 5.1 - Caracterização demográfica e de hábitos nocivos dos pacientes com LPO e dos indivíduos controle incluídos no estudo	52
Tabelas 5.2 - Distribuição dos tipos de LPO dos pacientes do grupo caso incluídos	53
Tabelas 5.3 - Distribuição das doenças sistêmicas relatadas pelos pacientes com LPO	54
Tabelas 5.4 - Distribuição dos medicamentos utilizados pelos pacientes com LPO.....	55
Tabelas 5.5 - Número de amostras utilizadas para o estudo de expressão gênica do TLR2...	57
Tabelas 5.6 - Caracterização das variáveis sexo e idade dos pacientes com LPO e indivíduos controle utilizados para avaliação da expressão gênica do TLR2.....	57
Tabelas 5.7 - Número de amostras utilizadas na genotipagem do estudo de SNP no TLR2.....	59
Tabelas 5.8 - Caracterização das variáveis sexo e idade dos pacientes com LPO e indivíduos controle genotipados	59
Tabelas 5.9 - Análise dos resultados da genotipagem do SNP TLR2-rs1898830 com os dados de frequência e <i>odds ratio</i> de cada genótipo e análise estatística do grupo caso em relação ao controle	60
Tabelas 5.10- Análise dos resultados da genotipagem do SNP TLR2-rs4696480, frequência e odds ratio de cada genótipo e análise estatística do grupo caso em relação aos controles.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1-	Distribuição das formas clínicas apresentadas pelos pacientes com LPO	52
Gráfico 5.2-	Distribuição da localização das lesões orais dos pacientes com LPO	53
Gráfico 5.3-	Dados da relação entre a doença e o perfil emocional dos pacientes com de LPO	55
Gráfico 5.4-	Diferença na expressão gênica entre grupo caso (LPO) e controle evidenciando ausência de diferença estatisticamente significativa na expressão gênica do TLR2 ($P>0,05$)	58
Gráfico 5.5-	Resultados do ensaio TaqMan® para a discriminação alélica das amostras analisada do SNP TLR2-rs1898830 após análise dos resultados com o <i>software</i> TaqMan® Genotyper Software (v. 1.3). As amostras concentradas ao longo do eixo X são homozigotas para o alelo marcado com a sonda VIC (AA), as concentradas ao longo do eixo Y são homozigotas para o alelo marcado com a sonda FAM (GG) e aquelas dispostas entre estas apresentam marcação das duas sondas e são consideradas heterozigotas (AG)	60
Gráfico 5.6-	Resultados do ensaio TaqMan® para a discriminação alélica das amostras analisada do SNP TLR2-rs4696480 após análise dos resultados com o <i>software</i> TaqMan® Genotyper Software (v. 1.3). As amostras concentradas ao longo do eixo X são homozigotas para o alelo marcado com a sonda VIC (AA) e as concentradas entre os eixos X e Y apresentam marcação das duas sondas e são consideradas heterozigotas (AT).....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Células apresentadoras de antígenos
cDNA	DNA complementar
Ct	Cycle threshold
DC	Células Dendríticas
DLO	Doença liquenóide oral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GAPDH	Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GVHD	Doença do enxerto contra o hospedeiro
HMGB1	Proteína do grupo de alta mobilidade B1
HSP	Proteína de choque térmico
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IFN	Interferon
IC	Intervalo de confiança
IL	Interleucina
LD	Desequilíbrio de ligação
LLO	Lesão liquenóide oral
LLOR	Lesão liquenóide oral reacional
LPM	Líquen plano mucoso
LPMC	Líquen plano mucocutâneo
LPO	Líquen plano oral
LRR	Domínio extra-celular dos TLR rico em repetições de leucina
MAL	Adaptador similar ao MyD88
MAF	Menor frequência alélica
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NF-kB	Fator nuclear kappa B
OHQoL	Questionário de saúde oral na qualidade de vida

OMS	Organização mundial de saúde
OR	Odds ratio - razão de chances
PAMP	Padrões moleculares associados à patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRR	Receptores reconhecedores de padrões moleculares
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RL	Reação liquenóide
RLC	Reação liquenóide de contato
RLD	Reação liquenóide à drogas
RLO	Reação liquenóide oral
RLC	Reação liquenóide de contato
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
rs	Ref. SNP - número de referência do SNP
RT-PCR	Transcrição reversa prévia a reação em cadeia da polimerase
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
Th	Linfócitos T auxiliares
TIR	Domínio citoplasmático comum ao TLR e ao IL-1R
TIRAP	Proteína adaptadora contendo domínio TIR
TLR	Receptores Toll-like
TRAM	Molécula adaptadora relacionada ao TRIF
TRIF	Adaptador contendo o domínio TIR inductor de interferon- β
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”
VHC	Vírus da hepatite C
X ²	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	LÍQUEN PLANO ORAL	25
2.1.1	Características gerais da doença	25
2.1.2	Classificação de acordo com as características clínicas e histológicas	27
2.1.3	Etiopatogenia da doença	28
2.2	RECEPTORES TOLL-LIKE (TLR)	30
2.3	ESTUDO DE TLR EM LPO	34
3	PROPOSIÇÃO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	CASUÍSTICA E DESENHO DO ESTUDO	39
4.2	EXPRESSÃO GÊNICA	40
4.2.1	Obtenção das amostras de RNA	40
4.2.2	Extração de RNA	41
4.2.3	Eliminação do DNA genômico e purificação do RNA	42
4.2.4	Reação de transcrição reversa - Síntese de DNA complementar (cDNA)	42
4.2.5	Reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real	43
4.3	GENOTIPAGEM	44
4.3.1	Obtenção das amostras de DNA	44
4.3.2	Extração de DNA	45
4.3.3	Seleção dos SNPs para estudo	46
4.3.4	Genotipagem: Reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR)	47
4.4	ANÁLISE DOS DADOS	48
5	RESULTADOS	51
5.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PACIENTES	51
5.2	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO	56
5.3	AVALIAÇÃO DA GENOTIPAGEM	58
5.4	CORRELAÇÕES DAS ANÁLISES	62
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXOS	79
	APÊNDICES	85

1 INTRODUÇÃO

O líquen plano oral (LPO) é uma doença inflamatória crônica que acomete a mucosa bucal e causa, eventualmente, sintomas de dor e ardência. Afetando negativamente a qualidade de vida das pessoas portadoras desta doença. Sua etiologia ainda é desconhecida, de maneira que os tratamentos atualmente disponíveis se limitam a amenizar os sintomas relatados pelos pacientes (Carrozo; Gandolfo, et al., 1999; Van der Meij; Van der Waal, 2003; Aguirre-Urizar, 2008).

Sendo assim, aliando-se aos avanços nas técnicas de estudos moleculares, as investigações atuais se dedicam de maneira crescente à busca por esclarecimentos da etiopatogenia do LPO, para o estabelecimento de melhores protocolos terapêuticos, e maior conhecimento das consequências da presença destas lesões a longo prazo.

O LPO, assim como outras doenças inflamatórias crônicas bucais mediadas por linfócitos T, possivelmente apresenta alguma anormalidade acerca da sinalização dos receptores Toll-like (TLR) envolvida em sua etiopatogenia (Siponen et al., 2012). O desencadeamento da resposta inflamatória inata a partir da sinalização dos TLR pode ser resultado de uma ativação anormal destes receptores pela microbiota bucal, visto que os TLR atuam no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) derivados de diferentes classes de microrganismos (Arancibia et al., 2007).

Além disso, estes receptores também são capazes de reconhecer algumas proteínas próprias do organismo, como as proteínas do choque térmico (HSP) (Misch; Hawn, 2008; Bramanti et al., 1995) e pacientes com LPO apresentam aumento da expressão de algumas HSP (Sugerman et al., 2002).

Poucos estudos avaliaram a expressão gênica ou proteica dos TLR no LPO (Sinon et al., 2016; Adami et al., 2014; Stanimirovic et al., 2013; Trucci et al., 2013; Kho et al., 2013; Ge et al., 2012; El Tawady; Rashed, 2012; Siponen et al., 2012; Janardhanam et al., 2012; Ohno et al., 2011; Srinivasan et al., 2008; Zunt et al., 2009). Especificamente em relação ao TLR2, apenas seis estudos fizeram esta avaliação, e os resultados são algumas vezes contraditórios (Srinivasan et al., 2007; Janardhanam et al., 2012; Ohno et al., 2012; Kho et al., 2013; Adami et al., 2014; Sinon et al., 2016).

É possível que estas alterações na expressão gênica sejam desencadeadas por mutações nos genes dos TLR. Dentre os diversos tipos de mutações, o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), que corresponde à substituição de um único nucleotídeo, pode estar relacionado à susceptibilidade ao desenvolvimento de muitas doenças complexas (Komar, 2007).

Estas alterações genéticas podem propiciar a diminuição da tolerância imunológica, pela modificação da susceptibilidade do organismo frente a agentes microbianos ou a proteínas próprias do organismo, levando conseqüentemente ao aumento na propensão e incidência dos mais variados tipos de doenças imunomediadas, como o LPO (Janardhanam et al., 2012; Siponen et al., 2012; Kho et al., 2013). Suscitando a presente investigação em relação à participação de possíveis alterações genéticas no TLR2 e o desenvolvimento de LPO.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LÍQUEN PLANO ORAL (LPO)

O líquen plano é uma doença inflamatória crônica mucocutânea idiopática que se manifesta por erupções papulares principalmente em pele ou mucosas bucais e genitais, sendo menos comum em unhas ou em mucosas anal, nasal, ocular e da laringe. A manifestação bucal esta presente em 50 a 70% dos casos, sendo que de 20 a 30% dos casos são de manifestação exclusivamente bucal (Nico et al., 2011).

O Líquen Plano Oral (LPO) acomete de 2 a 4% da população mundial, geralmente indivíduos de meia-idade, da quarta até a sétima década de vida, mais em pacientes leucodermas e predileção ao sexo feminino (Lodi et al., 2005a).

2.1.1 Características gerais da doença

Clinicamente, o LPO é uma doença polimorfa que se apresenta na mucosa bucal sob diversas formas clínicas, tais como: reticular, em placa, atrófica, erosiva/ulcerativa e bolhosa, podendo ser encontradas de formas isoladas ou em múltiplas combinações com a forma reticular (Ismail et al., 2007).

A forma reticular é a mais comum, tende a ser assintomática, e caracteriza-se pela presença de linhas brancas dispostas em rede entrelaçada, descrita por Louis-Frédéric Wickham e posteriormente denominadas de estrias de Wickham (Steffen; Dupree, 2004).

A forma atrófica-ulcerativa é caracterizada por algum tipo de solução de continuidade do epitélio, parcial ou total respectivamente, são as que usualmente acompanham sintomas de dor e/ou ardência (Belal, 2015).

Os locais mais frequentemente acometidos pelas lesões de LPO na cavidade bucal são a mucosa jugal, dorso de língua e gengiva, porém também podem surgir em região de palato duro e/ou mole e lábios (Canto et al., 2010). Quando acomete a gengiva inserida, recebe a denominação de gengivite descamativa, como

mentionado anteriormente, e é caracterizado pela descamação crônica do epitélio da mucosa gengival, resultando em áreas eritematosas atróficas até áreas com úlceras e é bastante sensível (Scully; Porter, 1997; Leão et al. 2008).

Para o diagnóstico histológico do LPO é necessária a observação microscópica de algumas das seguintes características: hiperqueratose, acantose em “dentes de serra”, degeneração hidrópica da camada basal, e infiltrado inflamatório subepitelial linfocítico disposto em banda. Em alguns casos pode haver a presença de queratinócitos necróticos, ou corpos de Civatte, e não são observadas displasias epiteliais (van der Meij; van der Waal, 2003).

O diagnóstico diferencial do LPO pode incluir: queratose friccional ou irritativa, leucoplasia, lúpus eritematoso sistêmico, pênfigo vulgar, penfigóide de membranas mucosas, eritema multiforme e candidose (Lavanya et al., 2011).

Uma variedade de protocolos de tratamento já foi investigada para o controle da sintomatologia do LPO, tais como: corticosteroides, ácidos retinoicos, tracolimus, antifúngicos, irradiação ultravioleta, laserterapia, procedimentos cirúrgicos, criocirurgia, entre outros. Entretanto ainda não é possível uma cura definitiva (Lodi et al., 2005b).

A literatura recomenda o acompanhamento em longo prazo desses pacientes, tendo em vista o discutível com potencial de transformação maligna do LPO (Cortés-Ramírez et al., 2009; Lodi et al., 2005b).

Estudos realizados em diversos países mostraram uma probabilidade aproximada de 0 a 6,25% de uma lesão inicialmente diagnosticada como LPO sofrer transformação maligna ao longo dos anos (Gandolfo et al., 2004; Lodi et al., 2005b; Xue et al., 2005). Clinicamente, constatou-se que as lesões atróficas, erosivo-ulcerativas e atípicas (clínica ou histologicamente) apresentaram maior potencial de malignização (Gorsky et al., 2004).

Todavia, alguns autores acreditam que a maioria dos casos de transformação maligna do LPO descritos na literatura possa ser consequência de falhas no diagnóstico inicial da doença (Krutchkoff et al., 1978; van der Meij et al., 1999; Lodi et al., 2005b). Esta controvérsia também se dá, principalmente, pela falta de esclarecimentos sobre a etiologia do LPO.

2.1.2 Classificação de acordo com as características clínicas e histológicas

Com os crescentes estudos a respeito da doença, alguns autores encontraram dificuldades no diagnóstico correto do LPO, isso se deve principalmente ao fato de que algumas lesões apresentam características clínicas e/ou histológicas distintas da forma clássica, de lesão bilateral e simétrica, do LPO idiopático classicamente relatado (Scully et al., 1998; Al-Hashimi et al., 2007; Warnakulasuriya et al., 2007).

Desta forma, todo o grupo de lesões com padrões clínicos de linhas reticulares brancas pode ser dividido em cinco grupos: o líquen plano oral idiopático (LPO idiopático), o líquen plano mucoso (LPM), o líquen plano mucocutâneo (LPMC), a lesão liquenóide oral idiopática (LLO) e a lesão liquenóide oral reacional (LLOR) (Aguirre, 2008).

O LPO idiopático é a forma mais clássica do LPO e é representada pela presença de múltiplas lesões reticulares brancas, simétricas e bilaterais na mucosa bucal. O LPM exhibe lesões papulares em outras mucosas (genital, anal, etc), além das manifestações em mucosa bucal. No LPMC, como o nome sugere, exhibe lesões de pápulas pruriginosas sobre a pele, assim como lesões brancas em mucosa oral e em outras mucosas (Aguirre, 2008).

Já a LLO apresenta características clínicas distintas das anteriores, com lesões reticulares brancas únicas, de forma assimétrica ou/e unilateral na mucosa bucal, sem uma etiologia aparente. Este grupo também inclui as lesões que clinicamente são características, porém não apresentam todos os critérios para o diagnóstico histopatológico do LPO idiopático (Al-Hashimi et al., 2007).

Assim como na LLO, a LLOR se caracteriza pela presença de lesões focais, assimétricas ou/e unilaterais na mucosa da boca, porém com uma causa identificável, é subdividida em três tipos: a reação liquenóide de contato (RLC), a reação liquenóide a drogas (RLD) e a reação liquenóide por doença do enxerto contra o hospedeiro (RL por GVHD) (Khudhur et al., 2014).

Na RLC as estrias estão situadas próximas a materiais restauradores odontológicos, especialmente restaurações metálicas como as de amálgama, e o diagnóstico pode ser comprovado pela regressão dos sinais clínicos da lesão após a substituição do material restaurador (McParland et al., 2012).

A RLD ocorre em pacientes que fazem uso crônico de medicamentos sistêmicos como: anti-hipertensivos, diuréticos, hipoglicemiantes orais, anti-inflamatórios não esteroidais, entre outros. Porém o diagnóstico da RLD é complexo, visto que nem sempre é possível interromper o uso desses medicamentos para se realizar a prova diagnóstica (Zain; Nor, 1988; Zaïem et al., 2014).

Por fim, a RL por GVHD acomete pacientes com histórico de transplante de órgãos, gerando uma lesão na mucosa bucal com características clínicas e histológicas indistinguíveis do LPO idiopático (Kuten-Shorrer et al., 2014; Margaix-Muñoz et al., 2015).

2.1.3 Etiopatogenia da doença

Evidências atuais sugerem que o LPO está relacionado a uma alteração na imunidade mediada por células, iniciada por fatores endógenos ou exógenos, resultando em uma resposta alterada a antígenos não conhecidos. A maior parte dos linfócitos T acumulados no infiltrado inflamatório presentes no LPO são linfócitos T CD8+ (Matthews et al., 1984; Nogueira et al., 2015). A ligação deste antígeno às moléculas apresentadoras de antígenos do MHC-1 em queratinócitos, ativa diretamente os linfócitos T citotóxicos, desencadeando a resposta imunológica que culmina com apoptose dos queratinócitos basais e, por consequência, com o dano epitelial (Lodi et al., 2005a; Roopashree et al., 2010).

Estes linfócitos T CD8+ ativados liberam quimiocinas que atraem linfócitos adicionais para a lesão de LPO em desenvolvimento; os receptores para esta quimiocinas também já foram identificados no LPO, caracterizando um mecanismo cíclico de recrutamento, retroalimentando o processo. Isso poderia explicar, em parte, a cronicidade da doença (Schifter et al., 2013; Lijima et al., 2003; Lodi et al., 2005a).

Adicionalmente, outro fator que pode estar diretamente ligado ao caráter crônico do LPO é a presença de uma deficiência nos mecanismos de imunossupressão possivelmente mediada por alterações na expressão ou função do fator transformador de crescimento beta (TGF- β) (Nico, 2011).

As metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas que degradam as proteínas da matriz do tecido conjuntivo (colágeno, elastina, etc.), também podem estar envolvidas na etiopatogenia da doença. Acredita-se que a ruptura da membrana basal induzida pela MMP-9 pode facilitar a passagem de células T CD8+ citotóxicas para o epitélio. Estudos avaliaram a expressão dessas enzimas em pacientes portadores de LPO, constataram uma maior concentração de MMP-9 em relação aos controles saudáveis (Sugerman et al., 2002). Contudo, as causas que levam ao início do processo ainda não foram totalmente esclarecidas.

Proteínas do choque térmico (HSP) parecem apresentar expressão aumentada em pacientes com LPO, sendo relacionadas como possíveis antígenos para o desencadeamento da resposta inflamatória observada. Ou então, este aumento da expressão pode estar relacionado a uma via de sinalização que conecta uma grande variedade de agentes exógenos (medicamentos sistêmicos, materiais restauradores, trauma mecânico, infecção bacteriana ou viral) na patogênese do LPO, como os receptores Toll-like (Bramanti et al., 1995).

Recentemente, investiga-se que a base da peculiar alteração imunológica Th1, também observada em LPO, pode ser resultado de alterações genéticas. De fato, o polimorfismo genético no primeiro íntron do gene promotor do IFN- γ demonstrou ser um importante fator de risco para o desenvolvimento das lesões orais do LP, que um aumento na frequência do alelo -308 A TNF- α foi demonstrada em pacientes que apresentaram LPO com lesões concomitantes em pele (Carrozo et al., 2004).

O estresse também tem sido extensamente considerado como fator predisponente para o LPO, porém grande parte dos estudos não analisa objetivamente os fatores emocionais. Alguns autores encontraram diferença estatisticamente significativa no perfil psicológico dos pacientes portadores de LPO, que costumam apresentar uma tendência a serem estressados e ansiosos (Soto-Araya et al., 2004). Entretanto, o desconforto crônico presente nesses pacientes pode atuar como um fator estressante, explicando os casos em que esta associação tem sido documentada (Sugerman et al., 2002).

Algumas evidências epidemiológicas apoiam a ligação entre o LPO e a infecção viral da Hepatite C (VHC), uma vez que o vírus pode replicar-se na mucosa oral e atrair os linfócitos T específicos para o VHC, implicando na patogênese da DLO (Carrozo; Scally, 2014). Contraditoriamente, outros grupos de estudos em

populações chinesas não encontraram associação estatisticamente significativa entre as duas doenças (Song et al., 2016).

Outros fatores associadas ao LPO, tais como: auto-imunidade e deficiências imunológicas, alergia a certos alimentos, diabetes, hipertensão, hábito de mascar tabaco e trauma, também já foram relatados na literatura (Sugerman et al., 2002; Roopashree et al., 2010).

2.2 RECEPTORES TOLL-LIKE (TLR)

Os receptores toll-like (TLR) são proteínas transmembranares altamente conservadas, fazem parte de uma das maiores famílias de receptores pertencentes à classe de reconhecedores responsáveis pelo reconhecimento de padrões (PRR). Representam um dos receptores mais estudados e atualmente constituem um grupo de 10 receptores identificados em seres humanos (TLR1-10) (Ferraz et al., 2011).

Estão localizados em diversas células do sistema imunológico, principalmente nas células apresentadoras de antígenos (APC), como as células dendríticas (DC) e macrófagos. Sua função se dá ao reconhecimento de um amplo e complexo espectro de produtos moleculares derivados de diferentes classes de microrganismos, mais especificamente, os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) (Yamamoto; Takeda, 2010).

As PAMPs são derivadas principalmente de agentes infecciosos como as bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, protozoários e vírus. A interação entre os PRR e as PAMPs proporciona o início da resposta imunológica inata, com a indução de ativação dos macrófagos, produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas (Botos et al., 2011).

Os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 estão presentes na membrana plasmática (figura 2.1), de modo que eles contêm domínios intracelulares, devido à presença de proteínas do tipo domínio citoplasmático comum ao TLR e ao IL-1R (TIR), que atua em conjunto com diferentes moléculas adaptadoras, como: fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), proteína adaptadora contendo domínio TIR/adaptador similar ao MyD88 (TIRAP/MAL), adaptador contendo o domínio TIR indutor de interferon-beta (TRIF), e molécula adaptadora relacionada ao TRIF

(TRAM); e também domínios extracelulares, com repetições ricas em leucina (LRR) (Arancibia et al., 2007).

Figura 2.1 - Diagrama das vias de sinalização dos TLR da membrana citoplasmática: TLR2, TLR4, TLR6, TLR5 e TLR10. O TLR2 forma heterodímero com os TLR1, TLR6 e TLR10. Após o reconhecimento de seus respectivos ligantes, os TLR recrutam moléculas adaptadoras a sua porção intracelular, como MyD88 e TRIF (TLR4), para ativar IRAK, TRAF6 e IKK. A sequência de ativação destas moléculas ativa por sua vez a via de sinalização do NF- κ B e IRF, que induz a transcrição do DNA para a produção de uma série de respostas celulares específicas relacionadas com a proliferação celular, sobrevivência e inflamação, com a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferon do tipo I (no caso das respostas antivirais)

Fonte: Arancibia, 2007

Enquanto que os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 estão localizados intracelularmente (figura 2.2), ou seja, nos endossomos e não possuem domínio extracelular (Arancibia et al., 2007).

Figura 2.2 - Diagrama das vias de sinalização dos TLR intracelulares: TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9. Ao reconhecerem as PAMPs nos endossomos, os TLR intracelulares recrutam moléculas adaptadoras, como MyD88 (exceto TLR3) e TRIF (TLR3), para ativar IRAK, TRAF6 e IKK. A sequência de ativação destas moléculas ativa por sua vez a via de sinalização do NF- κ B e IRF, induzindo a transcrição do DNA para a expressão de uma série de respostas celulares

Fonte: Arancibia, 2007

Alguns TLR atuam de forma isolada (homodímeros) no reconhecimento das PAMPs, já outros de forma conjunta (heterodímeros), como é o caso do TLR2, que pode formar pares com outros TLR (TLR1, TLR6 e TLR10) para o reconhecimento de diferentes padrões moleculares de acordo com o heterodímero formado (Botos et al., 2011).

Sabe-se que a expressão dos TLR é regulada de maneira distinta em cada tecido ou órgão, mesmo na ausência de qualquer doença, e que cada receptor apresenta especificidade no reconhecimento de importantes PAMPs. A tabela 2.1 reúne os dez receptores toll-like, as PAMPs reconhecidas por cada receptor e em que tipo celular os TLR são expressos (Yamamoto; Takeda, 2010).

Tabela 2.1 - Relação dos diferentes ligantes e localização dos TLR em humanos

Receptor	PAMP ligante	Origem do PAMP	Tipos celulares
TLR1	Triacil-lipopeptídeos	Bactérias	Monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B
TLR2	Lipopeptídeos Ácido lipoteicóico Zymosan	Bactérias e Fungos	Monócitos, macrófagos, células dendríticas mielóides, mastócitos
TLR3	Fita dupla de RNA	Vírus	Células dendríticas, linfócitos B
TLR4	Lipopolissacarídeos	Bactérias gram-negativas	Monócitos, macrófagos, células dendríticas mielóides, mastócitos, linfócitos B
TLR5	Flagelina	Bactérias	Monócitos, macrófagos, células dendríticas
TLR6	Diacil-lipopeptídeos	Bactérias	Monócitos, macrófagos, mastócitos, linfócitos B
TLR7	Fita simples de RNA	Vírus	Monócitos, macrófagos, células dendríticas plasmocitóides, linfócitos B
TLR8	Fita simples de RNA	Vírus	Monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B
TLR9	DNA não metilado rico em CpG	Bactérias e vírus	Monócitos, macrófagos, células dendríticas plasmocitóides, linfócitos B
TLR10	Lipopeptídeos	Bactérias e vírus	Monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B

Fonte: Gallo, 2012

Embora os TLR desempenhem um papel primordial na defesa do hospedeiro contra os processos infecciosos e inflamatórios, deve haver um equilíbrio entre a ativação e inativação destes receptores para evitar uma resposta inflamatória ou imunológica excessiva e anormal, precipitando a ocorrência das diversas doenças crônicas inflamatórias (Ferraz et al., 2011).

Além disso, existe forte evidência de que os TLR podem reconhecer proteínas constitutivas do próprio organismo. As proteínas mais comumente reconhecidas pelos TLR são as do grupo de alta mobilidade B1 (HMGB1) e as proteínas do choque térmico, podendo gerar o desencadeamento da sinalização relacionada a doenças auto-imunes e doenças inflamatórias crônicas (Lu et al., 2013; Saito et al., 2015).

2.3 ESTUDOS DE TLR EM LPO

Poucos estudos avaliaram o papel dos TLR na etiopatogenia do LPO. As pesquisas atuais evidenciam a desregulação da expressão de genes relacionados à imunidade inata no epitélio com esta doença (Adami et al., 2013). Entretanto, ainda existem conflitos entre os estudos publicados no que diz respeito à expressão dos TLR e o desenvolvimento do LPO (Trucci et al., 2013).

A identificação de biomarcadores salivares representa uma importante fonte de informação das macromoléculas fornecendo o perfil fisiopatológico do epitélio oral observado. Com esta finalidade, Srinivasan et al. (2008) investigaram formas solúveis do TLR2 na saliva não estimulada de pacientes com LPO e observaram um aumento nas taxas de TLR2, em relação ao grupo controle. Entretanto, na avaliação da expressão gênica de células epiteliais orais presentes na saliva, observaram redução na expressão do TLR2 nos pacientes com LPO em relação aos controles.

Ainda sobre as formas solúveis de TLR, outro estudo encontrou aumento na expressão do TLR4 e não observou diferença em relação ao TLR2 na saliva de pacientes com LPO em relação aos controles. E, além disso, também observaram redução na expressão gênica de ambos nas células epiteliais presentes na saliva. Os autores ainda ressaltam que a presença de infecções fúngicas ou pelo vírus da hepatite C ou o aumento na taxa da população de bactérias Gram- e Gram+ presentes na microbiota oral desses pacientes poderia alterar a homeostasia dos TLR no epitélio do LPO (Zunt et al., 2009).

E um terceiro estudo com amostras de células da mucosa bucal descamadas, presentes na saliva não estimulada, não observou diferença na expressão gênica do TLR2 entre os pacientes com LPO e o grupo controle. Além disso, a expressão do TLR2 não esteve correlacionada com outras variáveis como a expressão de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α) ou a presença de sangue na saliva (Kho et al., 2013).

Análises de expressão gênica e proteica em amostras de LPO, pelas técnicas de RT-PCR e imunohistoquímica, também demonstraram a redução na expressão do TLR2 e aumento na expressão do TLR4. O aumento da expressão do TLR4 poderia proporcionar uma estimulação anormal da resposta imunológica Th1 pela

interação com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano da microflora bucal (Janardhanam et al., 2012).

Em contrapartida, o estudo de Ohno et al. (2011) reportou aumento na expressão proteica do TLR2 na mucosa lesionada de pacientes com LPO, bem como em monócitos do sangue periférico, por meio de avaliação imunohistoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

Outro estudo também observou aumento da expressão proteica do TLR4, por meio da análise de imunohistoquímica e não observou diferenças na expressão dos TLR2 e TLR8 comparando espécimes de LPO e controles de tecido inflamatório (lesões traumáticas). Em relação à expressão gênica, observaram uma expressão significativamente menor do TLR3 no LPO, enquanto o TLR8 apresentou uma expressão elevada, porém não significativa. Além disso, estes autores encontraram uma diminuição na expressão de moléculas relacionadas à sinalização via TLR, o que parece ser importante na etiopatogenia desta doença diminuindo o controle sobre a tolerância imunológica, o que pode estar também relacionado à cronicidade das lesões (Sinon et al., 2016).

O aumento na expressão proteica do TLR4 e TLR9 também foi observado em amostras de LPO reticular (31 casos) e atrófico/erosivo (19 casos) no estudo de Siponen et al. (2012). Porém não foi observada uma redução na expressão destes receptores com o uso tópico de tacrolimus, por estes autores. Aparentemente, o aumento da ativação do TLR4 nas lesões de LPO induz a ativação da via do NF- κ B, e consequentemente, de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Ge et al., 2012). Assim como o TLR4, a interação com o ligante com o TLR9 induziria a capacidade produção de citocinas Th1, como IFN e IL-12 por estas células (Li et al., 2007).

Outros TLR foram estudados com menor ênfase, como o TLR1, que apresentou expressão gênica e proteica aumentada em pacientes com LPO em relação ao grupo controle de pacientes com outras lesões de mucosa e de pacientes com mucosa saudável (Adami et al., 2013). E o TLR7, que mostrou redução significativa na expressão proteica de TLR7, avaliada por Western-Blot, independentemente da presença ou não da infecção pelo vírus da hepatite C em pacientes com líquen plano exclusivamente cutâneo (El Tawdy; Rashed, 2012).

A sinalização aberrante de TLR, criticamente envolvida no desenvolvimento de diversas doenças imunológicas, também presente no LPO, pode ser resultado de polimorfismos em TLR que modifiquem a susceptibilidade às respostas a patógenos

comensais, alterando a habilidade da resposta imunológica adaptativa quanto à tolerância imunológica e ao restabelecimento do equilíbrio homeostático do sistema imune.

Poucos estudos avaliaram a associação entre polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) dos TLR e o LPO. O estudo de Stanimirovic et al. (2013) avaliou as variantes rs3804099 (TLR2), rs3775291, rs5743312 (TLR3), rs4986790 e rs4986791 (TLR4) em amostras de 101 pacientes com LPO e 104 indivíduos controles, genotipadas por PCR em tempo real ou pela técnica de PCR convencional associada à análise de polimorfismo pelo comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP).

Este estudo observou uma relação de risco de LPO para a variante rs5743312 do TLR3, porém a presença de um ou dois alelos mutantes não foi correlacionada com as variáveis clínicas. Este SNP está localizado no íntron 2 do gene do TLR3 e ainda não se conhece exatamente a função deste SNP e como poderia atuar no aumento do risco de LPO, porém é provável que haja uma influência na expressão deste gene.

Outro estudo avaliou 8 variantes nos TLR1 (rs4833095 e rs5743618), TLR2 (rs4696480), TLR4 (rs1927911), TLR6 (rs5743810), TLR9 (rs5743836 e rs352139) e TLR10 (rs11096957) por ensaios TaqMan® ou pirosequenciamento, e observou que a presença de um alelo mutado no SNP TLR2-rs4696480 aumentou significativamente o risco para o desenvolvimento de CEC de boca e de LLO, mas não de LPO idiopático. De forma que esta variante pode ser relevante para o risco de desenvolvimento de CEC de boca e LLO nesta população, incentivando novos estudos sobre a possível associação destes grupos de doenças e SNP no gene do TLR2, colaborando com a demonstração de polimorfismos de TLR como marcadores úteis do prognóstico e prevenção do câncer de boca (Gallo, 2012).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a expressão gênica e a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) do receptor TLR2 em população brasileira com líquen plano oral e indivíduos controles saudáveis, por meio de técnicas de biologia molecular, buscando identificar diferenças entre esses grupos de pacientes que possam contribuir com o esclarecimento da etiopatogenia desta doença:

- Avaliar a expressão gênica do TLR2 em pacientes com LPO em relação a indivíduos controles normais.
- Avaliar a presença de SNP no gene do TLR2 em pacientes com LPO em relação a indivíduos controles normais.
- Correlacionar a expressão gênica e a presença do SNP aos parâmetros clínicos e a qualidade de vida dos pacientes com LPO.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA E DESENHO DO ESTUDO

Para o estudo da expressão gênica e da presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) do receptor Toll-like 2 (TLR2) foi delineado um estudo epidemiológico observacional do tipo caso-controle.

As amostras biológicas de DNA e RNA necessárias para esta investigação foram coletadas de pacientes que buscaram tratamento ou se encontravam em acompanhamento no Ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) e no Ambulatório da Disciplina de Propedêutica Estomatológica da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FO-UNESP São José dos Campos) no período entre dezembro de 2014 e fevereiro de 2016.

Os indivíduos que concordaram com a participação mediante leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A e B), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP, protocolo n° 919.055 e 981.093 (Anexo A e B) foram incluídos nesta investigação. Os pacientes foram divididos em dois grupos: grupo de estudo, indivíduos com LPO; e grupo controle, pareado por sexo e idade ao grupo de estudo, composto por pessoas saudáveis não portadoras de LPO.

Os pacientes com LPO foram diagnosticados e tratados segundo o protocolo de rotina, baseado em evidências publicadas na literatura científica e classificados de acordo com a OMS (Aguirre-Urizar, 2008; Van der Meij; Van der Waal, 2003). Sendo assim, o critério para diagnóstico clínico consistiu em observação de pápulas e/ou estrias brancas na mucosa bucal em disposição irradiada de forma isolada ou em associação com as formas atrófica e erosiva; e o critério histológico consistiu na presença de degeneração hidrópica da camada basal. Infiltrado inflamatório linfocitário subepitelial em banda e ausência de displasia.

Desta forma, os pacientes que apresentavam diagnóstico prévio ou quadro clínico consistente de LPO foram submetidos à coleta das células superficiais da

mucosa bucal por meio de bochecho com solução de clorexidina 0.12% sem álcool para obtenção das amostras de DNA. Os pacientes que não apresentavam o diagnóstico prévio de LPO, durante o procedimento rotineiro de biópsia para o estabelecimento do diagnóstico histopatológico, foram submetidos à coleta de uma amostra de tecido lesionado da mucosa bucal para obtenção das amostras de RNA.

O grupo controle foi selecionado entre aqueles indivíduos que necessitaram outros tratamentos cirúrgicos para lesões benignas de mucosa bucal (lesões ósseas ou fibroma, por exemplo). Foram submetidos à coleta das células superficiais da mucosa bucal por meio de bochecho com solução de clorexidina 0.12% sem álcool, para obtenção das amostras de DNA e à coleta de um fragmento de mucosa clinicamente saudável para obtenção da amostra de RNA, durante o procedimento cirúrgico proposto para o tratamento de sua condição.

Os critérios de exclusão deste estudo para ambos os grupos foram: indivíduos menores de 18 anos de idade, pacientes grávidas, pacientes em que a biópsia incisional não confirmou a hipótese diagnóstica estabelecida, paciente com quadros infecciosos, pacientes em tratamento oncológico ou com história de outras neoplasias malignas.

Além disso, foram aplicados questionários para a caracterização dos pacientes do grupo estudo em relação ao LPO (Apêndice C) e da qualidade de vida em relação à saúde bucal, por meio do questionário *Oral Health Quality of Life* (OHQoL), internacionalmente validado para o idioma português-brasileiro (Anexo C – Dini et al., 2003).

Os experimentos descritos em seguida foram realizados no Laboratório de Patologia Molecular (LPM) da FOUSP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes, e supervisionados pela Profa. Dra. Camila de Barros Gallo.

4.2 EXPRESSÃO GÊNICA

4.2.1 Obtenção das amostras de RNA

As amostras de tecido de mucosa bucal foram coletadas através de biópsia

incisional, padronizada com o uso de *punch* (Kolplast CI LTDA – Brasil) de 5 mm de diâmetro e profundidade de 3 a 4 mm. A anestesia foi infiltrada à distância da região submetida à biópsia.

Após a remoção cirúrgica, as amostras de tecido foram acondicionadas em criotubos (Cryovial®, Axygen Scientific – Califórnia, EUA) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente foram armazenadas a -80°C, em freezer, até a execução dos passos seguintes do experimento.

4.2.2 Extração de RNA

A extração do RNA total foi realizada pelo método do fenol-clorofórmio e precipitação alcoólica, com o reagente TRIzol (Invitrogen Corporation, Life Technologies – Califórnia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Inicialmente, cada amostra congelada foi completamente macerada em nitrogênio líquido, até a visualização de um pó branco, sem descongelamento e a consequente extração do RNA. A este pó branco, foi adicionado 1 mL de TRIzol, de acordo com a recomendação do fabricante para o tamanho da amostra coletada, e misturado até a completa homogeneização. Para cada 1 mL de TRIzol inicial, foi acrescido 200 µL de clorofórmio (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil), e o microtubo devidamente selado foi agitado vigorosamente durante 30 segundos e centrifugados (centrífuga Eppendorf AG modelo 5415R – Hamburgo, Alemanha) a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Após a centrifugação, observou-se a formação de três fases: a fase inferior (cor rosa), contendo fenol e clorofórmio, a interface (película esbranquiçada), contendo o DNA e proteínas, e a fase superior (transparente e aquosa), contendo o RNA. A fase superior representa cerca de 60% do volume e foi transferida para outro microtubo, no qual se acrescentou 500 µL de álcool isopropílico (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil).

Em seguida os microtubos foram submetidos a uma nova centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, verificando-se então a presença do precipitado de RNA no fundo do microtubo. O sobrenadante foi descartado e este precipitado lavado com 1 mL de etanol 75% (LAFAN Química Fina LTDA – São

Paulo, Brasil) e novamente centrifugado a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido a secagem, deixando-se os microtubos abertos por um período de 10 minutos. Por fim, foi ressuspenso em 25 µL de água livre de RNase e DNase (Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA) até a dissolução completa do precipitado de RNA.

A qualidade do RNA extraído foi avaliada por gel de agarose 1% e a pureza por meio da análise espectrofotométrica (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific – Massachusetts, EUA).

4.2.3 Eliminação do DNA genômico e purificação do RNA

Previamente à síntese do DNA complementar para a realização da RT-PCR foi realizado o tratamento da amostra de RNA total em duas etapas. A primeira etapa consistiu na digestão da amostra de RNA total com a enzima DNase (RNase-Free DNase Set, QIAGEN – Venlo, Holanda) para a degradação do DNA genômico eventualmente presente na amostra. Esta etapa 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 correspondeu à purificação do RNA (RNeasy Min Elute Clean-up Kit, QIAGEN – Venlo, Holanda), eliminando eficientemente os contaminantes das reações anteriores, produzindo 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.

4.2.4 Reação de transcrição reversa

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada para com o conjunto de reagentes High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life

Technologies – Califórnia, EUA) partindo de 1 µg de RNA purificado.

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

4.2.5 Reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real

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), para os genes do TLR2 e para o gene constitutivo GAPDH (tabela 4.1). Sendo que as sequências de iniciadores deveriam englobar, em ao menos uma delas (senso ou anti-senso), 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 entre 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
TLR2	NM_003264	Senso: GGAGTTCTCCCAGTGTTTGGT Anti-senso: CCAGTGCTTCAACCCACAAC	157 pb
GAPDH	NM_002046	Senso: GCATCCTGGGCTACACTGA Anti-senso: CCACCACCCTGTTGCTGTA	162 pb

As reações foram realizadas em triplicata 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), resultando em um 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 minutos a 50°C (incubação), 10 minutos a 95°C (ativação da enzima Taq polimerase), seguidos de 40 ciclos, cada um com duas fases: 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 60 segundos 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), Ct>35 foram excluídos.

4.3 GENOTIPAGEM

4.3.1 Obtenção das amostras de DNA

As amostras de células da mucosa bucal foram coletadas dos indivíduos participantes como fonte de DNA genômico, de acordo com protocolos previamente publicados na literatura (Trevilatto; Line, 2000; Garcia-Closas et al., 2001). Como padrão os pacientes fizeram um bochecho rápido com água. Após este bochecho prévio, os indivíduos realizaram um bochecho com 10 mL de solução de clorexidina 0.12% sem álcool durante dois minutos, em seguida todo o volume do bochecho foi acondicionado em tubos de fundo cônico de 50 mL (TPP Techno Plastic Products – Trasadingen, Suíça). As coletas foram realizadas no período da manhã, as amostras ficaram mantidas em gelo e depois encaminhadas ao LPM-FOUSP, onde foram processadas e armazenadas.

No laboratório, os tubos contendo o material coletado foram centrifugados a 1.500 rpm durante 15 minutos a 4°C (centrífuga Eppendorf AG modelo 5810 R –

Hamburgo, Alemanha) formando um precipitado constituído por células da mucosa bucal sedimentadas no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 mL de tampão para lise celular (Cell Lysis Solution QIAGEN® – Duesselforf, Alemanha) e misturados por aproximadamente 20 segundos, até sua completa homogeneização. Por fim, as amostras foram armazenadas em refrigeradores de 2 a 8°C até o momento da extração do DNA.

4.3.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo Gentra Puragene para células bucais coletadas por meio de enxágues da QIAGEN®, visto que este método permite a extração de quantidade adequada de DNA de boa qualidade em amostras obtidas a partir de bochechos.

Para a extração do DNA, cada amostra foi misturada com 10 µL de Puragene Proteinase e incubada em banho-maria a 56°C por 2 horas. Após esse período, as amostras foram transferidas para micro-tubos de 2 mL, no qual acrescentou-se 340 µL de solução precipitadora de proteína (Protein Precipitation Solution QIAGEN® – Duesselforf, Alemanha), armazenadas por 10 minutos no congelador a -20°C e posteriormente centrifugadas durante 15 minutos a 13.000 rpm a -9°C. O sobrenadante, contendo material genômico, foi transferido para outro micro-tubo de 1,5 mL e o precipitado, formado por proteínas, foi descartado. Adicionou-se as amostras 500 µL de Isopropanol e 2,5 µL de solução de glicogênio (Glycogen Solution QIAGEN® – Duesselforf, Alemanha) que foram misturadas por inversão por cerca de 50 vezes.

Neste momento, a formação de "nuvem de DNA" foi observada nas amostras e estas foram, então, centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos a 0°C. O sobrenadante foi descartado com cuidado para não deslocar o precipitado de DNA e 1 mL de etanol 80% gelado foi adicionado e o tubo invertido por 10 vezes para lavagem do precipitado. Após a lavagem, as amostras foram novamente centrifugadas por 2 minutos a 13.000 rpm a 0°C. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o tubo ficou aberto e emborcado em papel por cerca de 10 minutos para evaporação do excesso de etanol 80%. O precipitado foi ressuspendido em 50

μL de água millique e incubado em banho-maria a 65°C por 15 minutos para dissolução completa do pellet de DNA. Por fim, as amostras foram resfriadas e armazenadas em congelador a -20°C .

A qualidade e pureza do DNA extraído foi avaliada por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific Inc. – Massachusetts, EUA) por meio da avaliação da relação entre as absorbâncias A_{260}/A_{280} para avaliação da contaminação por proteínas, e A_{260}/A_{230} para avaliação da contaminação por sais oriundos dos reagentes da extração de DNA, em que os valores de pureza entre 1,8 e 2,0 foram consideradas adequadas em ambas as relações.

As amostras que não obtiveram bons resultados de pureza foram submetidas em nova avaliação através de outra técnica de espectrofotometria (Qubit Fluorometer Invitrogen – Carlsbad, Califórnia).

4.3.3 Seleção dos SNPs para estudo

Foram selecionados os SNPs, depositados no *GenBank*, que podem potencialmente influenciam a função ou expressão gênica, baseado em estudo previamente desenvolvido durante o doutoramento da Profa. Dra. Camila de Barros Gallo. Desta forma, para a genotipagem dos TLR2 foram selecionados os SNP relacionados na tabela 4.2, considerando três características: Menor frequência alélica (MAF) maior que 10%, desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNP selecionados menor que 0,65 e posição e tipo do SNP (região não-codificante ou mutações com perda ou sem sentido).

Tabela 4.2 - Dados dos SNP nos genes-alvo selecionados para genotipagem do grupo caso (LPO) e grupo controle, com base nos critérios de seleção dos SNP adotados para este estudo (posição do SNP, MAF e LD), a partir de SNP encontrados na revisão de literatura relacionada e na consulta de banco de dados

Gene	GeneBank	Posição do SNP	Alelos	MAF
TLR2	rs1898830	Não codificante: íntron	A/G	A=0.36
TLR2	rs4696480	Não codificante: íntron	A/T	A=0.48

4.3.4 Genotipagem: Reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR)

A genotipagem dos SNPs selecionados para o estudo foi realizada por meio da amplificação pela reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR), utilizando-se o equipamento ABI Prism® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) e o sistema de detecção TaqMan™ (figura 4.1), em que iniciadores e sondas hibridizam especificamente a região alvo de estudo do DNA permitindo a identificação dos diferentes alelos.

Figura 4.1 - Ilustração do ensaio Taqman para genotipagem. Os ensaios Taqman utilizam dois iniciadores (*forward primer* e *reverse primer*) e sondas específicas para cada um dos alelos marcados com diferentes agentes fluoróforos (VIC e FAM), que permitem a identificação dos alelos de forma precisa (imagem à esquerda). Os resultados de genotipagem de um ensaio são representados graficamente, sendo que cada ponto representa uma amostra. As cores e posições de cada ponto no gráfico indicam o genótipo de cada amostra: os azuis são homozigotos para o alelo 1 (marcados por FAM), os verdes são heterozigóticos (marcados pelos dois fluoróforos) e os vermelhos são homozigotos para o alelo 2 (marcados por VIC) e os pontos restantes representam os controles negativos e as amostras que não foram adequadamente amplificadas

Fonte: <http://medicine.tdc.ie/functional-genetics-genomics/genotyping.php>

Contudo previamente à genotipagem das amostras de DNA incluídas no estudo, foi realizada a amplificação do material genômico, por meio de PCR em tempo real com um gene constitutivo (ZNF80 – tabela 4.3), para verificação da viabilidade da amostra de DNA.

As reações foram realizadas de acordo com o seguinte método: em cada tubo óptico de 0,2 mL, específico para PCR em tempo real, foi acrescentado a cada 1 µL

de DNA, 3 µL de água millique, 5 µL de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies – Califórnia, EUA) e 0,5 µL de cada iniciador (concentração final de 400nM), gerando um volume final de 10 µL.

Por fim, 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 minutos a 50°C (incubação), 10 minutos a 95°C (ativação da enzima Taq polimerase), seguidos de 40 ciclos, cada um com duas fases: 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 60 segundos a 60°C (hibridização/extensão-detecção).

Tabela 4.3 - Sequência dos iniciadores utilizados na reação de qPCR para amplificação de gene constitutivo ZNF80

Gene-SNP	Iniciadores 5'>3'	Tamanho do produto de PCR
ZNF80	Senso: CTGTGACCTGCAGCTCATCCT Anti-senso: TAAGTTCTCTGACGTTGACTGATGTG	162 pb

As amostras consideradas adequadas após a amplificação do gene constitutivo foram submetidas à genotipagem de acordo com as seguintes condições de reação: para cada tubo óptico de 0.2 mL, específico para PCR em tempo real, acrescentou-se 1 µL de DNA genômico diluído na concentração de 100 ng/µL, 0.25 µL da solução de sonda e iniciador, 2.5 µL do TaqMan™ Master Mix (Applied Biosystems – Califórnia, EUA) e 1.25 µL de água millique, num volume final de 5µL.

As condições de ciclagem consistiram em ciclos de: 2 minutos a 50°C (incubação), 10 minutos a 95°C (ativação da enzima Taq polimerase), seguidos de 40 ciclos, cada um com duas fases: 15 segundos a 95° C (de naturezação) e 60 segundos a 60° C (associação/extensão-detecção).

4.4 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados dos SNP foram compilados e analisados pelo programa TaqMan® Genotyper Software, Version 1.3 (Life Technologies – Califórnia, EUA) e as análises seguiram o Equilíbrio de Hardy-Weinberg entre as amostras do grupo caso e controle. A associação entre LPO e os SNP estudados foram estimados pela análise das frequências, comparadas pelo teste Qui Quadrado e pelo *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC) (programa BioEstat 5.0, Manuel Ayres, 2007 – Pará, Brasil).

A expressividade do TLR2 foi avaliada a partir da normalização dos dados da quantificação com base na expressão do gene constitutivo e analisada pelo método de Ct comparativo ou quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Neste método, são comparados os valores de Ct (Thresholdcycle), ou seja, do número do ciclo em que a fluorescência gerada na reação atinge o limiar de amplificação exponencial (threshold) e os resultados obtidos foram comparados por meio do teste estatístico Mann-Whitney (programa BioEstat 5.0, Manuel Ayres, 2007 – Pará, Brasil).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PACIENTES

Amostras de 174 pacientes foram incluídas neste estudo e distribuídas em dois grupos: 91 pacientes com LPO¹ no grupo caso e 83 indivíduos não-LPO no grupo controle. Em relação aos parâmetros de sexo, idade e hábitos nocivos, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados, sendo assim os grupos foram considerados pareados por estas características (tabela 5.1). Houve um predomínio do sexo feminino, numa proporção aproximada de 3:1.

Tabela 5.1 - Caracterização demográfica e de hábitos nocivos dos pacientes com LPO e dos indivíduos controle incluídos no estudo

Característica		LPO (N=91)	Controle (N=83)	P-value (X ²)
Idade	Média	57.1	55.4	0.535*
	Variação	31-83	29-88	
Sexo	Feminino (%)	72 (79.1)	60 (72.3)	0.382
	Masculino (%)	19 (20.9)	23 (27.7)	
Tabagismo	Sim (%)	11 (12)	7 (8.4)	0.588
	Não (%)	80 (88)	76 (91.6)	
Etilismo	Sim (%)	14 (15.4)	7 (8.4)	0.241
	Não (%)	77 (84.6)	76 (91.6)	

*Teste estatístico *t-Student* para amostras independentes

Em relação aos pacientes diagnosticados com LPO, o tipo clínico mais comum, de acordo com a classificação proposta por van der Meiji e van der Waal (2003) e Aguirre-Urizar (2008), foi o LPO idiopático (81.3%), já o menos comum foi a LLOR (4.3%), conforme sumarizado na tabela 5.2. Entre os quatro pacientes

¹ 71 pacientes do Ambulatório de Estomatologia Clínica da FOU SP e 20 pacientes do Ambulatório de Protedêutica Estomatológica da UNESP-SJC.

diagnosticados com LLOR, 3 eram por reação de contato a materiais odontológicos e apenas 1 com reação liquenóide por doença do enxerto contra o hospedeiro (RL por GVHD).

Tabela 5.2 - Distribuição dos tipos de LPO dos pacientes do grupo caso incluídos

Tipo de LPO	
Líquen Plano Oral idiopático (LPO)	74 (81.3%)
Líquen Plano Oral Mucocutâneo (LPMC)	8 (8.9%)
Lesão Liquenóide Oral Reacional (LLOR)	4 (4.3%)
Lesão Liquenóide Oral (LLO)	5 (5.5%)

Clinicamente, houve um equilíbrio entre as formas clínicas reticular (50.5%) e atrófico-erosivas (49.5%) nos pacientes com LPO incluídos no estudo (gráfico 5.1). E do total de pacientes com LPO, 20 (22.0%) apresentavam o quadro de gengivite descamativa.

Gráfico 5.1 - Distribuição das formas clínicas apresentadas pelos pacientes com LPO

Em relação à localização das lesões de LPO na boca (gráfico 5.2), a maioria foi observada nas regiões de mucosa jugal (69.2%), borda de língua (36.2%) e gengiva (27.4%). Seguidas pelas regiões de lábio e palato, com sete casos (7.7%)

cada, e apenas dois casos em região de assoalho bucal (2.2%). Em 53 pacientes (58.2%) havia a manifestação das lesões em duas ou mais localizações orais simultaneamente. A grande maioria dos casos (81), as lesões se apresentaram de forma bilateral e simétrica (90.1%) e em dez casos de forma unilateral (10.9%), sendo que em alguns casos houve a presença concomitante de lesões bilaterais e unilaterais, porém em localizações diferentes.

Gráfico 5.2 - Distribuição da localização das lesões orais dos pacientes com LPO

O principal sintoma relatado pelos pacientes com LPO no momento da consulta para a coleta da amostra foi o de ardência da região afetada por 41 pacientes (45%). Seguido pela queixa de dificuldade na alimentação por 21 (23%) e dor por 16 (17.6%), sendo que destes, 42 apresentaram queixas simultâneas (46.1%) dos sintomas citados. E 28 pacientes (30.7%) apresentavam um quadro assintomático no momento da consulta.

Quanto à saúde geral dos pacientes com LPO (tabela 5.3), 35.1% relataram apresentar hipertensão arterial sistêmica, 12% hipotireoidismo, 9.8% diabetes mellitus e 2.2% relataram ser portadores da hepatite C. Outras doenças foram citadas com menor frequência por 24 pacientes, como osteoporose (4), depressão (7), dislipidemia (9), gastrite (1), artrose (2), hipertireoidismo (2), glaucoma (1), síndrome das pernas inquietas (1), doença do enxerto contra o hospedeiro (1). E 40 pacientes (43.5%) relataram bom estado geral de saúde.

Tabela 5.3 - Distribuição das doenças sistêmicas relatadas pelos pacientes com LPO

Doença sistêmica	
Diabetes	9
Hipertensão	32
Hipotireoidismo	11
Hepatite C	2
Outras	24
Nenhuma	35

Os medicamentos mais frequentemente utilizados eram os anti-hipertensivos (26.4%), seguidos dos hipoglicemiantes orais (8.7%), ansiolíticos e antidepressivos (7.7%). E 30 pacientes relataram utilizar outros medicamentos, como omeprazol (2), sinvastatina (9), complexos vitamínicos (7), anti-inflamatórios esteroidais (6), bisfosfonato (3), AAS (2) e contraceptivos (1). Trinta pacientes (32.9%) relataram que não estavam fazendo uso de qualquer tipo de medicação e cinco (5,4%) não possuíam qualquer doença sistêmica, mas utilizavam algum complexo vitamínico ou remédios preventivos (contraceptivos). Esses dados em números estão representados na tabela 5.4.

Tabela 5.4- Distribuição dos medicamentos utilizados pelos pacientes com LPO

Medicação em uso	
Hipoglicemiante oral	8 (8.7%)
Anti-hipertensivo	24 (26.4%)
Antidepressivo	7 (7.7%)
Outros	30 (32.9%)
Nenhum	30 (32.9%)

Em relação ao perfil emocional dos pacientes (gráfico 5.3), foi investigada a influência de fatores psicológicos – como estresse, ansiedade, nervosismo e depressão – na manifestação bucal do LPO. Aproximadamente metade dos pacientes (43) relatou a associação entre os quadros mais sintomáticos do LPO e os períodos de maior tensão emocional. Em contrapartida, 32 pacientes não estabeleceram esta associação e 16 não souberam responder e/ou nunca repararam nesta relação.

Gráfico 5.3 - Dados da relação entre a doença e o perfil emocional dos pacientes com LPO

5.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO

Dos pacientes incluídos neste estudo, 39 pacientes com diagnóstico clínico de LPO que compareceram ao Ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica foram submetidos ao procedimento de biópsia incisinal para o diagnóstico histopatológico e, assim, à coleta de amostra para análise da expressão gênica do TLR2. Para o estudo comparativo da expressão gênica do TLR2, foram coletadas 11 amostras de mucosa bucal clinicamente normal de indivíduos que também necessitariam de alguma intervenção cirúrgica como descrito na seção de Materiais e Métodos.

A reação de PCR em tempo real foi considerada adequada (figura 5.1) quando a curva de dissociação dos iniciadores apresentava um pico único, correspondente à dissociação do produto de PCR e conferindo especificidade à reação de PCR. Além da observação de curvas exponenciais de amplificação do gene estudado, em que o programa 7500 Fast Real-Time PCR Systems (v. 1.4) delimita o limiar de detecção (*threshold*) em que se inicia esta amplificação exponencial. A partir deste limiar são obtidos os valores do ciclo em que cada amostra ultrapassa este (*cycle threshold* – Ct), que foram utilizados na análise dos resultados (tabela 5.5).

Figura 5.1 - Ilustração de exemplo de curvas de amplificação (A) e curvas de dissociação (B) consideradas adequadas extraída do programa do 7500 Real-Time PCR System – Applied Biosystems

Tabela 5.5 - Número de amostras utilizadas para o estudo de expressão gênica do TLR2

Amostras utilizadas no estudo de Expressão Gênica		
Etapas	LPO	Controle
1. Total de pacientes coletados	91	83
2. Pacientes submetidos à biópsia e coleta	39	11
3. Amostras com amplificação adequada	22	8

Foi realizada nova avaliação do pareamento dos grupos analisados em relação aos parâmetros de sexo e idade, e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0.05$) entre os grupos (tabela 5.6) e, assim, os grupos foram considerados como pareados por sexo e idade.

Tabela 5.6 - Caracterização das variáveis sexo e idade dos pacientes com LPO e indivíduos controle utilizados para avaliação da expressão gênica do TLR2

Característica		LPO (N = 22)	Controle (N = 8)	P-value
Idade	Média	55.5	46.9	0.160*
	Variação	34 – 83	31 – 67	
Sexo	Feminino (%)	16 (72.7)	5 (62.5)	0.928**
	Masculino (%)	6 (27.3)	3 (37.5)	

*Distribuição normal ($P > 0.05$, Shapiro-Wilk), teste t-Student

**Teste Qui-Quadrado

Os dados obtidos pela quantificação avaliados pelo método Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) demonstraram que os pacientes com LPO apresentam um discreto aumento na expressividade do gene do TLR2 (1.25 fold-change) em relação ao grupo controle (gráfico 5.4), e essa diferença não foi estatisticamente significativa ($P = 0.656$, teste t-Student, tendo em vista que os resultados para a expressão gênica do TLR2 seguiam distribuição normal comprovada pelo teste Shapiro-Wilk, com $P > 0.05$, em ambos os grupos).

Gráfico 5.4 - Diferença na expressão gênica entre grupo caso (LPO) e controle evidenciando ausência de diferença estatisticamente significativa na expressão gênica do TLR2 ($P > 0,05$, $DP =$)

5.3 AVALIAÇÃO DA GENOTIPAGEM

Das 174 amostras inicialmente coletadas, 69 amostras do grupo caso (LPO) e 68 do grupo controle foram submetidas à genotipagem após a análise da amplificação do gene constitutivo ZNF80.

As amostras genotipadas por ensaios TaqMan em reação de PCR em tempo real e analisadas pelo programa TaqMan® Genotyper Software, Version 1.3 (Life Technologies – Califórnia, EUA) consideradas adequadas foram utilizadas para as análises estatísticas (tabela 5.7). Inicialmente foi realizada nova avaliação do pareamento dos grupos analisados em relação aos parâmetros de sexo e idade, e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0.05$) entre os grupos (tabela 5.8).

Tabela 5.7 - Número de amostras utilizadas na genotipagem do estudo de SNP no TLR2

Amostras utilizadas no estudo de genotipagem (Controle/ LPO)			
Etapas		LPO	Controle
1. Total de pacientes coletados		91	83
2. Validados pelo gene constitutivo ZNF80 (%)		69 (75.8)	68 (81.9)
3. Amostras com reação adequada na genotipagem:			
TLR2-rs1898830	Falhas (%)	24 (34.8)	6 (8.8)
	FAM/FAM (GG)	5	7
	VIC/FAM (AG)	20	24
	VIC/VIC (AA)	20	31
	Total analisados (%)	45 (49.4)	62 (74.6)
TLR2-rs4696480	Falhas (%)	32 (76.2)	19 (45.2)
	FAM/FAM (TT)	0	0
	VIC/FAM (AT)	1	5
	VIC/VIC (AA)	9	18
	Total analisados (%)	10 (10.9)	23 (27.7)

Tabela 5.8 - Caracterização das variáveis sexo e idade dos pacientes com LPO e indivíduos controle genotipados

Característica		LPO (N = 45)	Controle (N = 62)	P-value
Idade	Média	58.7	56.5	0.354*
	Variação	33 – 80	29 – 88	
Sexo	Feminino (%)	37 (82.2)	46 (74.2)	0.420**
	Masculino (%)	8 (17.8)	16 (25.8)	

*Distribuição normal ($P > 0.05$, Kolmogorov-Smirnov), teste t-Student

**Teste Qui-Quadrado

Os dados da genotipagem foram consistentes quanto ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), e a análise estatística foram realizadas por meio dos testes Qui-Quadrado, para análise das diferenças nas frequências dos genótipos, e *Odds ratio* (razão de chances), para a avaliação do risco de desenvolvimento do LPO com a herança dos SNPs do gene do TLR2 analisados.

A distribuição dos genótipos para o SNP TLR2-rs1898830 está representada no gráfico 5.5. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa ($P > 0.05$) em relação à frequência dos genótipos entre os grupos estudados e a presença de um ou dois alelos mutantes do SNP TLR2-rs1898830 tampouco teve relação com o risco de desenvolvimento de LPO (tabela 5.9).

Gráfico 5.5 - Resultados do ensaio TaqMan® para a discriminação alélica das amostras analisada do SNP TLR2-rs1898830 após análise dos resultados com o software TaqMan® Genotyper Software (v. 1.3). As amostras concentradas ao longo do eixo X são homozigotas para o alelo marcado com a sonda VIC (AA), as concentradas ao longo do eixo Y são homozigotas para o alelo marcado com a sonda FAM (GG) e aquelas dispostas entre estas apresentam marcação das duas sondas e são consideradas heterozigotas (AG)

Tabela 5.9 - Análise dos resultados da genotipagem do SNP TLR2-rs1898830 com os dados de frequência e *odds ratio* de cada genótipo e análise estatística do grupo caso em relação ao controle

	Controle	LPO
Total (n)	62	45
AA (n)	31	20
%	50.0	44.4
OR (95% CI)		1
AG (n)	24	20
%	38.7	44.4
OR (95% CI)		0.77 (0.34 - 1.75)
GG (n)	7	5
%	11.3	11.2
OR (95% CI)		0.90 (0.25 - 3.24)
% p-value		0.7111
OR p-value		0.6849

Em relação ao SNP TLR2-rs4696480, cuja distribuição dos genótipos para o está representada no gráfico 5.6, foi observada diferença significativa para a frequência do alelo mutado no grupo LPO em relação ao controle ($P = 0.038$). Porém não foi observada a relação de risco (tabela 5.10).

Gráfico 5.6 - Resultados do ensaio TaqMan® para a discriminação alélica das amostras analisada do SNP TLR2-rs4696480 após análise dos resultados com o software TaqMan® Genotyper Software (v. 1.3). As amostras concentradas ao longo do eixo X são homozigotas para o alelo marcado com a sonda VIC (AA) e as concentradas entre os eixos X e Y apresentam marcação das duas sondas e são consideradas heterozigotas (AT)

Tabela 5.10 - Análise dos resultados da genotipagem do SNP TLR2-rs4696480, frequência e odds ratio de cada genótipo e análise estatística do grupo caso em relação aos controles

	Controle	LPO
Total (n)	23	10
AA (n)	18	9
%	78.3	90.0
OR (95% CI)		1
AT (n)	5	1
%	21.7	10.0
OR (95% CI)		2.50 (0.35 - 24.72)
TT (n)	0	0
%	-	-
OR (95% CI)	-	-
% p-value		0.0383
OR p-value		0.7547

5.4 CORRELAÇÕES DAS ANÁLISES

Não foi possível correlacionar a expressão gênica do TLR2 e a presença de um ou ambos os alelos mutados dos SNP analisados nos pacientes com LPO. Houve muitas falhas na genotipagem das amostras submetidas ao estudo da expressão, de forma que a comparação estatística foi inviabilizada.

Em relação aos dados da expressão gênica do TLR2 nas amostras dos pacientes com LPO, foi possível avaliar a correlação com a variável idade, e tendo em vista que os dados da expressão gênica não seguiam distribuição de padrão normal ($P = 0.007$ – teste Shapiro-Wilk), foi realizado o teste de correlação de Spearman. Observou-se que estas variáveis se correlacionam de maneira fraca e inversa ($r_s = -0.042$), ou seja, quando menor a idade do paciente com LPO, maior a expressão gênica do TLR2, porém esta correlação não apresentou diferença estatisticamente significativa ($P = 0.853$).

Quanto aos dados dos pacientes genotipados, foi possível avaliar a correlação da idade dos pacientes com LPO e a qualidade de vida relacionada à saúde bucal (OHQoL). Estes dados apresentavam distribuição normal ($P > 0.05$ – teste Kolmogorov-Sminov) de forma que se utilizou o teste de correlação de Pearson. Observou-se que estas variáveis se correlacionam de maneira fraca e inversa, ou seja, quanto maior a idade do paciente com LPO menor o índice de OHQoL. A correlação apresentou diferença estatisticamente significativa ($r_s = -0.28$, $P = 0.024$).

6 DISCUSSÃO

O caráter crônico do LPO, muitas vezes acompanhado de sintomas e tratamento apenas paliativo, aliado a falta de conhecimento em relação a sua etiologia e o questionável risco de transformação maligna (Belal, 2015; Zaïem et al., 2014; Carrozzo; Gandolfo, 1999; Cortés-Ramírez et al., 2009) justificam as buscas atuais em direção ao aprofundamento do conhecimento dos mecanismos desta doença.

Em relação às características gerais da população incluída nas análises dos de expressão gênica e genotipagem, assim como descrito na literatura, os pacientes com LPO apresentavam uma média de idade acima dos 40 anos de idade (Nico et al., 2011; Scully et al., 1998). O número de pacientes com LPO do sexo feminino foi maior que o sexo masculino numa proporção de 3:1, esta predominância de mulheres afetadas pelo LPO também foi observada em outros estudos de investigação epidemiológica na literatura (Boorghani et al., 2010; Oliveira Alves et al., 2010).

Seguindo a classificação proposta por Aguirre et. al. (2008), a maior parte dos pacientes incluídos neste estudo (81.3%) foi diagnosticada com o LPO idiopático com manifestação oral exclusiva, 4.3% apresentavam LLOR e 5.5% apresentaram lesões atípicas, classificadas como LLO. Apenas 8.9% dos pacientes apresentaram envolvimento cutâneo, além das lesões bucais, e todos estavam em tratamento ou controle dermatológico.

Esta última observação se contrapõe a relatada por Nico et al. (2011), que refere que até 30% dos casos de líquen plano apresentam manifestação exclusivamente bucal. Porém, acredita-se que a baixa prevalência de lesões cutâneas nos pacientes com LPO está relacionada ao fato que este estudo foi desenvolvido num centro odontológico.

A localização mais comum das lesões de LPO foi a mucosa jugal (69.2%) seguida pelas lesões localizadas em borda de língua (36.2%) e gengivas (27.4%), como relatado na literatura (Canto et al., 2010). As lesões em assoalho, palato e lábios foram raramente acometidas na amostra estudada e também são pouco relatadas na literatura (Oliveira Alves et al., 2010).

Neste estudo houve um equilíbrio entre as formas clínicas reticular (50.5%) e erosivo-ulcerativa (49.5%) observadas. Embora a literatura aponte para um predomínio da forma clínica reticular (Steffen; Dupree, 2004). A gengivite descamativa foi observada em 22.0% dos pacientes com LPO e é uma manifestação clínica frequentemente observada neste grupo de pacientes e, na maior parte dos casos, sintomática (Leão et al., 2008).

Tendo em vista que o atendimento dos pacientes acompanhados nesta pesquisa ocorreu em um ambulatório especializado, grande parte destes pacientes (69.3%) apresentava alguma queixa sintomática relacionada à doença. O que pode haver proporcionado este equilíbrio, anteriormente mencionado, nas formas clínicas observadas, uma vez que pacientes assintomáticos (30.7%) procuraram atendimento após um achado clínico em consulta odontológica de rotina.

Além disso, o maior número de casos sintomáticos também está relacionado aos casos de manifestações atrófico-erosivas, logicamente, por haver uma solução de continuidade parcial ou total do epitélio da mucosa bucal. Porém a presença dos sintomas observados, principalmente de ardor, também é associada aos quadros de gengivite descamativa que podem se manifestar em pacientes com LPO reticular que seria assintomático, justificando este maior número de casos sintomáticos.

A doença de base mais comum nos pacientes estudados foi a hipertensão (53.1%), o hipotireoidismo (12%) e a diabetes (9.8%). Porém, destes nem todos os pacientes estavam sob tratamento medicamentoso, dos 32 pacientes hipertensos, 24 (26.4%) relataram tomar algum remédio anti-hipertensivo, já dos 9 pacientes diabéticos, apenas 1 não fazia uso de hipoglicemiante.

Existem estudos correlacionando o uso desses medicamentos anti-hipertensivos e hipoglicemiantes com o surgimento do LPO, correspondendo ao quadro de LLOR medicamentosa (Khudhur et al., 2014; Aguirre et. al., 2008), que regredem após a interrupção ou troca da medicação. Nem sempre esta manobra é possível, dificultando o diagnóstico deste subtipo de LPO (Krupaa et al., 2015). Neste estudo nenhum dos pacientes foi diagnosticado com esse subtipo da DLO.

Apenas 2 casos (2.2%) afirmaram diagnóstico de infecção por Hepatite C, porém a maior parte dos pacientes questionados (81.3%) não sabiam e/ou nunca fizeram o teste para Hepatite C. Alguns estudos tentaram correlacionar a incidência de LPO em pacientes portadores da VHC (Song et al., 2016), porém não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa (Carrozzo; Scally, 2014;

Lodi et al., 2005a), o que não justificaria a solicitação de algum tipo de exame complementar para investigação do VHC em pacientes portadores de LPO.

Outras correlações encontradas na literatura como possíveis fatores associados à etiologia do LPO, como o hábito de mascar tabaco e histórias de traumas (Roopashree et. al., 2010; Gorsky et al., 2004; Sugerman et. al., 2002), não foram encontradas nesse estudo.

No que se refere ao perfil emocional dos pacientes, no qual se questionou objetivamente se o paciente portador de LPO associa os quadros clínicos (sinais e sintomas) da lesão com algum fator psicológico, como estresse, ansiedade ou depressão. Quase a metade dos pacientes (47%) afirmou acreditar nesta relação, associando o surgimento ou a piora dos sinais e sintomas após um conflito social, perda de algum parente querido, dificuldade financeira, entre outros.

Em contrapartida, 35% dos pacientes do estudo afirmaram não existir essa correlação. Associação entre estresse e ansiedade e o LPO também foi observada no estudo de Soto-Araya et al. (2004), numa avaliação destes aspectos emocionais investigados por meio de questionários específicos para esta finalidade.

Entretanto, não é possível, a partir deste resultado inferir uma relação causal, uma vez que desconforto crônico presente nesses pacientes pode atuar como um fator estressante e provocar esta associação (Sugerman et al., 2002). Embora seja já bastante estudada a influência de fatores emocionais no equilíbrio imunológico, mais estudos neste sentido são necessários para que se estabeleça uma relação concreta.

Nesta população foi observado que quanto maior a idade do paciente com LPO, menor o índice de obtido no questionário de qualidade de vida relacionado à saúde bucal. Esta relação era de certa forma esperada e já relatada previamente na literatura (Carrozo; Gandolfo, et al., 1999), uma vez que a cronicidade de um quadro que pode apresentar fases sintomáticas relacionadas aos fatores estressantes da vida cotidiana (Soto-Araya et al., 2004). Entretanto, a qualidade da saúde bucal é influenciada pela idade e sequelas de negligências e múltiplos tratamentos realizados ao longo da vida, de forma que a comparação com um grupo controle reforçaria este achado.

Em relação à expressão gênica do TLR2, não observamos neste estudo diferenças significativas na expressão deste gene entre os pacientes com LPO e o grupo controle que apresentava a mucosa clinicamente saudável. Este resultado

está em concordância com o estudo de Kho et al. (2013), que também avaliou a expressão gênica deste receptor, e o de Sinon et al. (2016), que por sua vez, além da expressão gênica também avaliou a expressão proteica do TLR2.

Outros estudos observaram expressão gênica reduzida do TLR2 em células epiteliais bucais descamadas e presentes na saliva de pacientes com LPO (Srinivasan et al., 2008 e Zunt et al., 2009). Esta fonte de amostra deve ser analisada com cautela, uma vez que as células mais superficiais do epitélio oral apresentam menor atividade transcricional. E além disso, os estudos que utilizaram a técnica de imunohistoquímica, para identificação do TLR2, observaram que a marcação era citoplasmática e acontecia principalmente nos queratinócitos de zonas mais profundas da camada espinhosa e na camada basal do epitélio. Além da marcação em macrófagos e linfócitos presentes no infiltrado inflamatório característico do LPO (Janardhanam et al., 2012; Sinon et al., 2012).

Apenas um estudo observou o aumento da expressão proteica do TLR2 em mucosa de pacientes com LPO e em monócitos do sangue periférico (Ohno et al., 2011). De maneira geral, o presente estudo e os aqui citados avaliaram a expressão do TLR2 numa amostra de LPO heterogênea, envolvendo tanto pacientes com a forma reticular como pacientes com lesões atrófico-erosivas, e sabe-se que a expressão gênica de moléculas relacionadas à resposta inflamatória e imunológica podem se apresentar de maneira diferente nestes tipos de lesões (Torrezani, 2014).

No estudo de Torrezani (2014), o TLR2 apresentou expressão semelhante entre o grupo de pacientes com LPO de manifestação reticular exclusiva e pacientes controle. Desta forma, aliado aos dados do presente estudo, pode se supor que esta ausência de diferença na expressão do TLR2 é comum aos diferentes tipos de LPO, de forma que acredita-se que seja uma alteração importante para a etiopatogenia desta doença.

A ativação do TLR2 pode interferir em sua atividade inibitória da reposta imunológica Th1, pois sabe-se que a ativação do TLR2 bloqueia a atividade imunossupressora dos linfócitos T reguladores e induz a diferenciação de linfócitos em células Th efetoras pró-inflamatórias (Trucci et al., 2013).

Polimorfismos nos TLR podem influenciar na susceptibilidade de doenças inflamatórias e susceptibilidade a infecções em humanos (Ferraz et al., 2011; Yamamoto et al., 2010; Misch; Hawn, 2008; Botos et al., 2011; Arancibia et al., 2007). Portanto, sugeriu-se que uma mutação genética, como o SNP, poderia estar

envolvida na alteração de expressão do TLR2 e, conseqüentemente, na etiologia do LPO (Saito et al., 2015; Siponen et al., 2012; Srinivasan et al., 2008; Li et al., 2007).

Não foi observada na amostra estudada qualquer relação de risco de desenvolvimento de LPO pela presença das variantes rs1898830 e rs4696480 do TLR2. Apenas dois estudos (Gallo, 2012 e Stanimirovic et al., 2013) avaliaram a associação de SNP nos TLR e o LPO.

No estudo realizado por Gallo (2012), foi constatada a presença de um aumento do risco de desenvolvimento de LLO e a presença do SNP rs4696480 no gene do TLR2, e esta relação não foi observada nos pacientes com LPO idiopático. Este SNP reforça a discussão do potencial de transformação maligna do LPO, uma vez que estas lesões atípicas (LLO) estão relacionadas com o diagnóstico de carcinoma espinocelular. Além disso, este achado também reforça a necessidade da análise diferencial das formas clínicas de LPO, assim como no caso das lesões reticulares e atrófico-erosivas anteriormente citadas, as LLO também devem ser consideradas e analisadas independentemente. Entretanto, esta avaliação não foi possível no presente estudo devido ao restrito número de pacientes com LLO incluídos na investigação e as perdas das amostras nos experimentos.

A herança de SNP relacionados em seu conjunto pode levar ao desenvolvimento de doenças complexas e multifatoriais, como é o caso do LPO, porém por conta dos complexos padrões de herança poligênica, o impacto de uma mutação em um único alelo na susceptibilidade, ou penetrância, de uma doença é muitas vezes modesto. Por conta disso, estudos que encontram associações mais convincentes de SNP e doenças com padrões de herança complexos, incluem um grande número de amostras, análises estatísticas de comparação múltipla e projetos de diversos estudos em diferentes populações (Misch; Hawn et al., 2008).

7 CONCLUSÃO

- Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de TLR2 de pacientes com LPO, reticular e atrófico-erosivo, em relação aos indivíduos controles.
- Os SNP TLR2-rs1898830 e TLR2-rs4696480 não foram relacionados ao risco de desenvolvimento de LPO na população estudada.
- A partir dos dados clínicos dos pacientes de LPO genotipados, foi possível observar uma correlação inversa e significativa entre a idade e o índice de qualidade de vida relacionada à saúde bucal. Demonstrando o impacto de uma condição crônica na qualidade de vida relacionada à saúde bucal dos pacientes com LPO.

REFERÊNCIAS²

Adami GR, Yeung AC, Stucki G, et al. Gene expression based evidence of innate immune response activation in the epithelium with oral lichen planus. *Arch Oral Biol*. 2014 Mar;59(3):354-61. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.12.010. Epub 2014 Jan 4.

Aguirre Urizar JM. Letter to the editor: oral lichenoid disease. A new classification proposal. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 Apr 1;13(4):E224.

Al-Hashimi I, Schifter M, Lockhart PB, et al. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Mar;103 Suppl:S25.e1-12.

Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, et al. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res*. 2007;40(2):97-112. Epub 2007 Nov 21.

Belal MH. Management of symptomatic erosive-ulcerative lesions of oral lichen planus in an adult Egyptian population using Selenium-ACE combined with topical corticosteroids plus antifungal agent. *Contemp Clin Dent*. 2015 Oct-Dec;6(4):454-60. doi: 10.4103/0976-237X.169837.

Boorghani M, Gholizadeh N, TaghaviZenouz A, et al. Oral lichen planus: clinical features, etiology, treatment and management; a review of literature. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2010 inter;4(1):3-9. Epub 2010 Mar 14.

Botos I, Segal DM, Davies DR. The Structural Biology of Toll-Like Receptors. *Structure* (London, England : 1993). 2011;19(4):447-459. doi:10.1016/j.str.2011.02.004.

Bramanti TE, Dekker NP, Lozada-Nur F, et al. Heat shock (stress) proteins and gamma delta T lymphocytes in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995 Dec;80(6):698-704.

Canto AM, Müller H, Freitas RR, et al. Oral lichen planus (OLP): clinical and complementary diagnosis. *An Bras Dermatol*. 2010 Sep-Oct;85(5):669-75.

² De acordo com o Estilo Vancouver.

Cao W, Hashibe M, Rao JY, et al. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detect Prev.* 2003;27(5):397-404.

Carrozzo M, Gandolfo S. The management of oral lichen planus. *Oral Dis.* 1999 Jul;5(3):196-205.

Carrozzo M, Scally K. Oral manifestations of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2014 Jun 28;20(24):7534-43. doi: 10.3748/wjg.v20.i24.7534.

Carrozzo M, Ubaldi de Capei M, Dametto E, et. al. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma polymorphisms contribute to susceptibility to oral lichen planus. *J Invest Dermatol.* 2004 Jan;122(1):87-94. Erratum in: *J Invest Dermatol.* 2004 Oct;123(4):805.

Consortium IH. The International HapMap Project. *Nature.* 2003 Dec 18;426(6968):789-96.

Cortés-Ramírez DA, Gainza-Cirauqui ML, Echebarria-Goikouria MA, et al. Oral lichenoid disease as a premalignant condition: the controversies and the unknown. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009 Mar 1;14(3):E118-22.

Dini EL, McGrath C, Bedi R. An evaluation of the oral health quality of life (OHQoL) instrument in a Brazilian population. *Community Dent Health.* 2003 Mar;20(1):40-4.

El Tawdy A, Rashed L. Downregulation of TLR-7 receptor in hepatic and non-hepatic patients with lichen planus. *Int J Dermatol.* 2012 Jul;51(7):785-9. doi: 10.1111/j.1365-4632.2011.04977.x.

Ferraz EG, Silveira BBB, Sarmento VA, et al. Toll-Like Receptors: regulation of the immune responses. *Rev Gaúcha Odontol.* 2011 Jul; 59(3): 483-490.

Gallo CB. Estudo de polimorfismo de nucleotídeo único em genes de receptores Toll-like em pacientes com líquen plano oral e pacientes com carcinoma epidermóide de boca [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012.

Gandolfo S, Richiardi L, Carrozzo M, et al. Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncol.* 2004 Jan;40(1):77-83.

Garcia-Closas M, Egan KM, Abruzzo J, et al. Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Jun;10(6):687-96.

Ge Y, Xu Y, Sun W, Man Z, et al. The molecular mechanisms of the effect of Dexamethasone and CyclosporinA on TLR4 /NF- κ B signaling pathway activation in oral lichen planus. *Gene.* 2012 Oct 25;508(2):157-64. doi: 10.1016/j.gene.2012.07.045.

Gorsky M, Epstein JB, Hasson-Kanfi H, et al. Smoking habits among patients diagnosed with oral lichen planus. *TobInduc Dis.* 2004 Jun 15;2(2):103-8. doi: 10.1186/1617-9625-2-2-103.

Ismail SB, Kumar SK, Zain RB. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J Oral Sci.* 2007 Jun;49(2):89-106.

Janardhanam SB, Prakasam S, Swaminathan VT, et al. Differential expression of TLR-2 and TLR-4 in the epithelial cells in oral lichen planus. *Arch Oral Biol.* 2012 May;57(5):495-502. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.10.013.

Kho HS, Chang JY, Kim YY, et al. MUC1 and Toll-like receptor-2 expression in burning mouth syndrome and oral lichen planus. *Arch Oral Biol.* 2013 Jul;58(7):837-42. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.01.008.

Khudhur AS, Di Zenzo G, Carrozzo M. Oral lichenoid tissue reactions: diagnosis and classification. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014 Mar;14(2):169-84. doi: 10.1586/14737159.2014.888953.

Komar AA. Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. *Pharmacogenomics.* 2007 Aug;8(8):1075-80.

Krupaa RJ, Sankari SL, Masthan KM, et al. Oral lichen planus: An overview. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015 Apr;7(Suppl 1):S158-61. doi: 10.4103/0975-7406.155873.

Krutchkoff DJ, Cutler L, Laskowski S. Oral lichen planus: the evidence regarding potential malignant transformation. *J Oral Pathol.* 1978 Feb;7(1):1-7.

Kubanov AA, Ivanova EV, Sabantseva EG, et al. [Diagnosis of bullous dermatoses with lesions of the oral mucosa]. *Stomatologiya (Mosk).* 2015;94(4):49-52.

Kujundzic B, Zeljic K, Supic G, et al. Association of vdr, cyp27b1, cyp24a1 and mthfr gene polymorphisms with oral lichen planus risk. Clin Oral Investig. 2016 May;20(4):781-9. doi:10.1007/s00784-015-1572-7. Epub 2015 Aug 26.

Kuten-Shorrer M, Woo SB, Treister NS. Oral graft-versus-host disease. Dent Clin North Am. 2014 Apr;58(2):351-68. doi: 10.1016/j.cden.2013.12.007.

Lavanya N, Jayanthi P, Rao UK, et al. Oral lichen planus: An update on pathogenesis and treatment. J Oral Maxillofac Pathol. 2011 May;15(2):127-32. doi: 10.4103/0973-029X.84474.

Leao JC, Ingafo M, Khan A, et al. Desquamative gingivitis: retrospective analysis of disease associations of a large cohort. Oral Dis. 2008 Sep;14(6):556-60.

Li J, Chen J, Tan Z, et al. Expression of TLR9 and its mRNA in the lesions of lichen planus. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2007 Apr;27(2):203-5.

Lijima W, Ohtani H, Nakayama T, et al. Infiltrating CD8+ T cells in oral lichen planus predominantly express CCR5 and CXCR3 and carry respective chemokine ligands RANTES/CCL5 and IP-10/CXCL10 in their cytolytic granules: a potential self-recruiting mechanism. Am J Pathol. 2003 Jul;163(1):261-8.

Lodi G, Scully C, Carrozzo M, et al. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part. 1. Viral infections and etiopathogenesis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005a Jul;100(1):40-51.

Lodi G, Scully C, Carrozzo M, et al. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part. 2. Clinical management and malignant transformation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005b Aug;100(2):164-78.

Lu B, Wang H, Andersson U, et al. Regulation of HMGB1 release by inflammasomes. Protein Cell. 2013 Mar;4(3):163-7. doi: 10.1007/s13238-012-2118-2. Epub 2013 Mar 13.

Margaix-Muñoz M, Bagán JV, Jiménez Y, et al. Graft-versus-host disease affecting oral cavity. A review. J Clin Exp Dent. 2015 Feb 1;7(1):e138-45. doi: 10.4317/jced.51975.

Matthews JB, Scully CM, Potts AJ. Oral lichen planus: an immunoperoxidase study using monoclonal antibodies to lymphocyte subsets. *Br J Dermatol*. 1984 Nov;111(5):587-95.

McParland H, Warnakulasuriya S. Oral lichenoid contact lesions to mercury and dental amalgam--a review. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:589569. doi: 10.1155/2012/589569. Epub 2012 Jul 24.

Misch EA, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *ClinSci (Lond)*. 2008 Mar;114(5):347-60. doi: 10.1042/CS20070214.

Nico MM, Fernandes JD, Lourenço SV. Oral lichen planus. *An Bras Dermatol*. 2011 Jul-Aug;86(4):633-41; quiz 642-3.

Nogueira PA, Carneiro S, Ramos-e-Silva M. Oral lichen planus: an update on its pathogenesis. *Int J Dermatol*. 2015 Sep;54(9):1005-10. doi: 10.1111/ijd.12918. Epub 2015 Jul 3.

Ohno S, Tateishi Y, Tatemoto Y, et al. Enhanced expression of Toll-like receptor 2 in lesional tissues and peripheral blood monocytes of patients with oral lichen planus. *J Dermatol*. 2011 Apr;38(4):335-44.

Oliveira Alves MG, Almeida JD, Balducci I, et al. Oral lichen planus: A retrospective study of 110 Brazilian patients. *BMC Res Notes*. 2010 Jun 3;3:157. doi: 10.1186/1756-0500-3-157.

Pennisi E. A closer look at SNPs suggests difficulties. *Science*. 1998 Sep 18;281(5384):1787-9.

Roopashree MR, Gondhalekar RV, Shashikanth MC, et al. Pathogenesis of oral lichen planus--a review. *J Oral Pathol Med*. 2010 Nov;39(10):729-34. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00946.x. Epub 2010 Oct 4.

Saito K, Kukita K, Kutomi G, et al. Heat shock protein 90 associates with Toll-like receptors 7/9 and mediates self-nucleic acid recognition in SLE. *Eur J Immunol*. 2015 Jul;45(7):2028-41. doi: 10.1002/eji.201445293. Epub 2015 Apr 28.

Schifter M, Suran L, Li F, et al. Oral Lichen Planus, Skin Biopsy - Diagnosis and Treatment, Prof. Suran Fernando (Ed.), (2013) ISBN: 978-953-51-1173-3, InTech, DOI: 10.5772/56482. Available from: <http://www.intechopen.com/books/skin-biopsy-diagnosis-and-treatment/oral-lichen-planus>

Scully C, Beyli M, Ferreiro MC, et al. Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(1):86-122.

Scully C, Porter SR. The clinical spectrum of desquamative gingivitis. *Semin Cutan Med Surg*. 1997 Dec;16(4):308-13.

Siponen M, Kauppila JH, Soini Y, et al. TLR4 and TLR9 are induced in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2012 Nov;41(10):741-7. doi: 10.1111/j.1600-0714.2012.01169.x. Epub 2012 Jun 5.

Sinon SH, Rich AM, Parachuru VP, et al. Downregulation of toll-like receptor-mediated signalling pathways in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2016 Jan;45(1):28-34. doi: 10.1111/jop.12319. Epub 2015 Apr 12.

Song J, Zhang Z, Ji X, et al. Lack of evidence of hepatitis in patients with oral lichen planus in China: A case control study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016 Mar 1;21(2):e161-8.

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

Srinivasan M, Kodumudi KN, Zunt SL. Soluble CD14 and toll-like receptor-2 are potential salivary biomarkers for oral lichen planus and burning mouth syndrome. *Clin Immunol*. 2008 Jan;126(1):31-7. Epub 2007 Oct 3.

Stanimirovic D, Zeljic K, Jankovic L, et al. TLR2, TLR3, TLR4 and CD14 gene polymorphisms associated with oral lichen planus risk. *Eur J Oral Sci*. 2013 Oct;121(5):421-6. doi: 10.1111/eos.12074. Epub 2013 Aug 9.

Steffen C, Dupree ML. Louis-Frédéric Wickham and the Wickham's striae of lichen planus. *Skinmed*. 2004 Sep-Oct;3(5):287-9.

Sugerman PB, Rollason PA, Savage NW, et al. Suppressor cell function in oral lichen planus. *J Dent Res*. 1992 Dec;71(12):1916-9.

Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, et. al. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(4):350-65.

Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, et al. The International HapMap Project Web site. *Genome Res*. 2005 Nov;15(11):1592-3.

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

Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *The Journal of forensic odonto-stomatology*. 2000 Jun;18(1):6-9.

Trucci VM, Salum FG, Figueiredo MA, et al. Interrelationship of dendritic cells, type 1 interferon system, regulatory T cells and toll-like receptors and their role in lichen planus and lupus erythematosus -- a literature review. *Arch Oral Biol*. 2013 Oct;58(10):1532-40. doi:10.1016/j.archoralbio.2013.06.016. Epub 2013 Jul 8.

van der Meij EH, Schepman KP, Smeele LE, et al. A review of the recent literature regarding malignant transformation of oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999 Sep;88(3):307-10.

van der Meij EH, van der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med*. 2003 Oct;32(9):507-12.

Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007 Nov;36(10):575-80.

Wu D, Chen X, Dong C, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in MPO and COX genes with oral lichen planus. *Int J Immunogenet*. 2015 Jun;42(3):161-7. doi: 10.1111/iji.12193. Epub 2015 Mar 30. Erratum in: *Int J Immunogenet*. 2015 Aug;42(4):312.

Xue JL, Fan MW, Wang SZ, et al. A clinical study of 674 patients with oral lichen planus in China. *J Oral Pathol Med*. 2005 Sep;34(8):467-72. PubMed PMID: 16091113.

Yamamoto M, Takeda K. Current Views of Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Gastroenterol Res Pract*. 2010 ;2010:240365. doi:10.1155/2010/ 240365.

Zaïem A, Sahnoun R, Badri T, et al. Lichen associated with metformin. *Therapie*. 2014 May-Jun;69(3):253-4. doi: 10.2515/therapie/2014025. Epub 2014 Jun 16.

Zain RB, Nor GM. Oral lichenoid drug reaction. *Dent J Malays*. 1988 Nov;10(2):15-7.

Zeljic K, Supic G, Jovic N, et al. Association of TLR2, TLR3, TLR4 and CD14 genes polymorphisms with oral cancer risk and survival. *Oral Dis*. 2014 May;20(4):416-24. doi: 10.1111/odi.12144. Epub 2013 Jun 24.

Zunt SL, Burton LV, Goldblatt LI, et al. Soluble forms of Toll-like receptor 4 are present in human saliva and modulate tumour necrosis factor-alpha secretion by macrophage-like cells. *Clin Exp Immunol*. 2009 May;156(2):285-93. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03854.x. Epub 2009 Mar 9.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para estudo de polimorfismo de nucleotídeo único em genes de TLR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto:

ESTUDO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DE
RECEPTORES TOLL-LIKE EM PACIENTES COM DOENÇA LIQUENÓIDE ORAL

Pesquisadores: Wellington Hideaki Yanaguizawa e Profa. Dra. Camila de Barros Gallo

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - FOU SP

Local: Ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOU SP

Contato: (11) 3091-7883 e (11) 2648-8148

camilabg@usp.br

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 Cidade Universitária São Paulo-SP

Convite para participação voluntária

As informações abaixo se destinam a esclarecer e pedir a sua participação voluntária nesta pesquisa, antes de concordar em participar desta pesquisa é muito importante que o Sr(a). compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Os pesquisadores estão aptos a esclarecer às suas dúvidas a qualquer tempo. O Sr(a). tem o direito de desistir da participação nesta pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade ou perda da continuidade do tratamento que está realizando na Faculdade de Odontologia da USP.

➤ **Objetivos do estudo:** Com esta pesquisa poderemos identificar se existem alterações em genes da inflamação em pacientes com líquen plano oral colaborando com o conhecimento da causa desta doença e possivelmente com um futuro melhor tratamento.

➤ **Procedimentos:**

1. Exame clínico de rotina da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOU SP, que corresponde ao preenchimento de ficha e exame da boca;
2. Caso o Sr(a). seja portador de líquen plano oral, a coleta de material para a pesquisa será realizada por um bochecho com 10 mL de solução de clorexedina sem álcool durante 1 minuto e todo o volume do bochecho será acondicionado em recipiente apropriado.
3. Caso o Sr.(a) não seja portador desta condição, a coleta do bochecho com 10 mL de solução de clorexedina sem álcool durante 1 minuto será realizada para a comparação com os pacientes que apresentam a outra doença citada.

➤ **Riscos e desconfortos:** Os risco e desconforto relacionados com esta pesquisa são mínimos e decorrem da realização do bochecho. A amostra utilizada na pesquisa será coletada durante o tratamento clínico por profissional habilitado sob condições adequadas de segurança e limpeza, não acarretando prejuízo ou desconforto adicional ao do procedimento que será realizado.

➤ **Tempo despendido:** em relação à pesquisa, a coleta da amostra será realizada no mesmo procedimento para o diagnóstico do problema que o Sr(a). apresenta, não sendo necessário nova consulta ou novos procedimentos.

➤ **Benefícios:** Não haverá benefícios direto, mas Sr.(a) receberá toda informação, orientação e o tratamento necessário para o líquen plano oral ou outras lesões bucais, sem qualquer custo. Estará colaborando com conhecimento científico nesta área e possibilitando a melhoria dos protocolos de tratamento do líquen plano oral.

➤ **Garantia do sigilo da identidade do sujeito da pesquisa:** As informações fornecidas serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

➤ **Desistência:** O(a) Sr(a). tem o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

➤ **Reutilização dos dados:**

O(a) Sr(a). autoriza a utilização da amostra biológica em outras pesquisas:

☐ NÃO autorizo a utilização da amostra biológica em outra pesquisa

☐ SIM autorizo a utilização da amostra biológica em outra pesquisa

Para utilizar da amostra biológica em outra pesquisa o(a) Sr(a). quer ser consultado:

☐ NÃO quero ser consultado da utilização da minha amostra biológica em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa

☐ SIM quero ser consultado da utilização da minha amostra biológica em outra pesquisa

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

“Após ter sido informado e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador concordo em participar de forma voluntária desta pesquisa”

São Paulo, ____ de ____ de ____

Nome: _____ RG: _____

Assinatura: _____

Pesquisadores responsáveis:

Wellington Hideaki Yanaguizawa
RG: 47076942-7 N^oUSP: 6910823

Profa. Dra. Camila de Barros Gallo
RG: 28841603-X N^oUSP: 3304011

APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para estudo de expressão gênica em TLR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto:

**AValiação DA EXPRESSÃO GÊNICA DO TLR2, IL-10 E IL-35 EM PACIENTES
COM LÍQUEN PLANO ORAL**

Pesquisadores: Cinthya Alves Ferreira e Profa. Dra. Camila de Barros Gallo

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - FOU SP

Local: Ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOU SP

Contato: (11) 3091-7883 e (11) 2648-8148

camilabg@usp.br

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 Cidade Universitária São Paulo-SP

Convite para participação voluntária

As informações abaixo se destinam a esclarecer e pedir a sua participação voluntária nesta pesquisa, antes de concordar em participar desta pesquisa é muito importante que o Sr(a). compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Os pesquisadores estão aptos a esclarecer às suas dúvidas a qualquer tempo. O Sr(a). tem o direito de desistir da participação nesta pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade ou perda da continuidade do tratamento que está realizando na Faculdade de Odontologia da USP.

➤ **Objetivos do estudo:** Com esta pesquisa poderemos identificar se existem alterações na função de genes em pacientes com líquen plano oral colaborando com o conhecimento da causa desta doença e possivelmente com um futuro melhor tratamento.

➤ **Procedimentos:**

1. Exame clínico de rotina da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOU SP, que corresponde ao preenchimento de ficha e exame da boca;
2. Caso o Sr(a). seja portador de líquen plano oral, realizaremos uma coleta de fragmento de mucosa bucal (para a pesquisa) durante o procedimento de biópsia necessário para o diagnóstico de sua lesão (procedimento de rotina).
3. Caso o Sr.(a) não seja portador desta condição, um fragmento de mucosa será removido (para a pesquisa) durante o procedimento cirúrgico necessário para seu tratamento de lesão bucal (procedimento de rotina) para a comparação com os pacientes que apresentam a outra doença citada.

➤ **Riscos e desconfortos:** Os risco e desconforto relacionados com esta pesquisa são decorrentes da realização da biópsia. A amostra utilizada na pesquisa será coletada durante o procedimento cirúrgico de biópsia necessário para o diagnóstico da lesão que o Sr(a). apresenta, por profissional habilitado sob condições adequadas de segurança, limpeza, esterilização e anestesia, não acarretando prejuízos ou desconfortos adicionais aos comumente decorrentes do procedimento cirúrgico que será realizado independentemente da realização da pesquisa.

➤ **Tempo despendido:** em relação à pesquisa, a coleta da amostra será realizada no mesmo procedimento para o diagnóstico do problema que o Sr(a). apresenta, não sendo necessário nova consulta ou novos procedimentos.

➤ **Benefícios:** Não haverá benefícios diretos, mas Sr.(a) receberá toda informação, orientação e o tratamento necessário para o líquen plano oral ou outras lesões bucais, sem qualquer custo. Estará colaborando com conhecimento científico nesta área e possibilitando a melhoria dos protocolos de tratamento do líquen plano oral.

➤ **Garantia do sigilo da identidade do sujeito da pesquisa:** As informações fornecidas serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

➤ **Desistência:** O(a) Sr(a). tem o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

➤ **Reutilização dos dados:**

O(a) Sr(a). autoriza a utilização da amostra biológica em outras pesquisas:

() NÃO autorizo a utilização da amostra biológica em outra pesquisa

() SIM autorizo a utilização da amostra biológica em outra pesquisa

Para utilizar da amostra biológica em outra pesquisa o(a) Sr(a). quer ser consultado:

() NÃO quero ser consultado da utilização da minha amostra biológica em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa

() SIM quero ser consultado da utilização da minha amostra biológica em outra pesquisa

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

"Após ter sido informado e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador concordo em participar de forma voluntária desta pesquisa"

São Paulo, ____ de ____ de ____

Nome: _____ RG: _____

Assinatura: _____

Pesquisadores responsáveis:

Cinthya Alves Ferreira
RG: 347367780-X NºUSP: 7168699

Profa. Dra. Camila de Barros Gallo
RG: 28841603-X NºUSP: 3304011

APÊNDICE C – Ficha clínica para avaliação do quadro de Líquen Plano Oral

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FICHA CLÍNICA

Paciente:	Idade:	Sexo:
Nome: _____	Data da Coleta: ____/____/____	
RG USP: _____ Nº AP: _____	Telefone: () _____ - _____	

Tipo de Doença Liquenóide Oral (DLO):

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

Tipo de Lesão:

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

Sintomatologia:

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

Doenças sistêmicas:

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

Localização:

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

Hepatite C:

1. (...) Reagente
2. (...) Não Reagente
3. (...) Desconhece

Medicação em uso:

1. (...) Hipoglicemiante
2. (...) Anti-hipertensivo
3. (...) Anti-depressivo
4. (...) Outros: _____

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

1. (...) Sim
2. (...) Não

Hábitos:**1. Tabagismo:**

- a. (...) Sim, ____ cigarros/dia, há ____ anos
- b. (...) Ex-fumante há ____ anos, fumou ____ cigarros/dia, por ____ anos
- c. (...) Não

2. Etilismo:

- a. (...) Sim, tipo: _____, quantidade/dia: _____
- b. (...) Ex-etilista há ____ anos, tipo: _____, quantidade/dia: _____
- c. (...) Não

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa para estudo de polimorfismo de nucleotídeo único em genes de TLR

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de polimorfismos de nucleotídeo único de receptores Toll-like em pacientes com líquen plano oral

Pesquisador: Camila de Barros Gallo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 41436115.0.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 981.093

Data da Relatoria: 11/03/2015

Apresentação do Projeto:

O líquen plano oral é uma doença que acomete a cavidade bucal causando dor e desconforto. Embora a etiopatogenia da doença ainda não esteja esclarecida, vários fatores têm sido consistentemente relacionados ao surgimento do LPO, especialmente alterações imunológicas. Anomalias envolvendo as funções destes podem proporcionar resposta imunológica aberrante em diversas doenças crônicas inflamatórias.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar a presença de polimorfismos nos genes dos receptores Toll-Like 1, 2, 4, 6 e 10 em população portadora de LPO e indivíduos controles sadios, buscando identificar diferenças entre esses grupos de pacientes e contribuir com o esclarecimento da etiopatogenia desta doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos e desconforto relacionados com esta pesquisa são mínimos e decorrem da realização do bochecho. A amostra utilizada na pesquisa será coletada durante o tratamento clínico por profissional habilitado sob condições adequadas de

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO**

Continuação do Parecer: 981.083

segurança e limpeza, não acarretando prejuízo ou desconforto adicional ao do procedimento que será realizado.

Benefícios:

O paciente receberá toda informação, orientação e tratamento necessário para o líquen plano oral ou outras lesões bucais, sem qualquer custo e estará colaborando com conhecimento científico nesta área e possibilitando a melhoria dos protocolos de tratamento do líquen plano oral.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada a declarar.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou: Informações básicas, Projeto de Pesquisa, Autorização da clínica, Autorização do Centro Coparticipante e TCLE adequados.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

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

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa para estudo de expressão gênica em TLR

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP														
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA														
Título da Pesquisa: Avaliação da expressão gênica do TLR2, IL-10 e IL-35 em pacientes com líquen plano oral														
Pesquisador: Camila de Barros Gallo														
Área Temática:														
Versão: 2														
CAAE: 31587814.0.0000.0075														
Instituição Proponente: Universidade de São Paulo														
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio														
DADOS DO PARECER														
Número do Parecer: 919.055														
Data da Relatoria: 16/12/2014														
Apresentação do Projeto:														
<p>Para o estudo de expressão gênica em pacientes com Líquen Plano Oral (LPO) será realizado um estudo do tipo caso-controle em que os pacientes serão divididos em dois grupos. O grupo A (caso, n=10) será composto por indivíduos com quadro clínico consistente para o diagnóstico do LPO idiopático, segundo o protocolo do Ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOU SP, baseado em evidências publicadas na literatura científica (2, 3). Uma amostra de tecido de mucosa bucal para esta análise será coletada biópsia realizada para o processo de diagnóstico. O grupo B (controle, n=10) será selecionado entre aqueles indivíduos que necessitem outros tratamentos cirúrgicos para lesões benignas de mucosa bucal.</p>														
Objetivo da Pesquisa:														
<p>Avaliação da expressão gênica de moléculas relacionadas a linfócitos T regulatórios (IL-10, IL-35) e do receptor Toll-like 2 (TLR2) em pacientes com LPO (idiopático) em relação a indivíduos controle sadios.</p>														
<table style="width: 100%; border: none;"><tr><td style="width: 40%;">Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227</td><td style="width: 20%;"></td><td style="width: 40%;">CEP: 05.508-900</td></tr><tr><td>Bairro: Cidade Universitária</td><td></td><td></td></tr><tr><td>UF: SP</td><td>Município: SAO PAULO</td><td></td></tr><tr><td>Telefone: (11)3091-7960</td><td>Fax: (11)3091-7814</td><td>E-mail: cepfo@usp.br</td></tr></table>			Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227		CEP: 05.508-900	Bairro: Cidade Universitária			UF: SP	Município: SAO PAULO		Telefone: (11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814	E-mail: cepfo@usp.br
Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227		CEP: 05.508-900												
Bairro: Cidade Universitária														
UF: SP	Município: SAO PAULO													
Telefone: (11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814	E-mail: cepfo@usp.br												
Página 01 de 03

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 919.055

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são inerentes a pacientes que serão submetidos a cirurgias orais, como dor, edema, possíveis infecções, etc.. Os autores se disponibilizam a prestar todo auxílio aos participantes. No grupo controle participarão pacientes que necessitem de alguma outra intervenção e no mesmo ato será coletado o material de biópsia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Dada a evolução das análises genéticas das lesões, a pesquisa é importante e relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo está adequado, evidenciando os riscos e ressaltando a possível desistência do participante sem qualquer tipo de sanção.

Recomendações:

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.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram obedecidas as ressalvas anteriores. Não há mais pendências. O cronograma está de acordo.

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: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7980

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepf@usp.br

ANEXO C – Questionário de qualidade de vida

QUESTIONÁRIO QUALIDADE DE VIDA¹

	Muito bom	Bom	Indiferente	Ruim	Muito ruim
Alimentação/Aproveitamento/ Prazer em comer					
Aparência					
Discurso					
Saúde em geral/ Bem estar geral					
Sono e capacidade de relaxar					
Vida social					
Relacionamento amoroso					
Sorrir/ Rir					
Confiança					
Falta de preocupação					
Humor ou felicidade					
Trabalhou aproveitamento em trabalhos rotineiros					
Finanças					
Personalidade					
Conforto (ausência de dor ou desconforto)					
Respiração					

¹ Dini EL, McGrath C, Bedi R. An evaluation of the oral health quality of life (OHQoL) instrument in a Brazilian population. *Community Dent Health*. 2003 Mar;20(1):40-4