ALESSANDRA RODRIGUES DE CAMARGO

**População de Células T CD8+ e Foxp3+ no Líquen Plano Oral Associado à
Infecção Crônica de Hepatite C**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Patologia e
Estomatologia Básica e Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Karem Lopez
Ortega

Co-Orientadora: Profa. Dra. Marília
Trierveiler Martins

São Paulo

2013

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

Camargo, Alessandra Rodrigues de.

População de células T CD8+ e Foxp3+ no líquen plano oral associado à infecção crônica de hepatite C / Alessandra Rodrigues de Camargo; orientador Karem Lopez Ortega. -- São Paulo, 2013.

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

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
Área de Concentração: Patologia e Estomatologia básica e aplicada. --
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Líquen plano bucal. 2. Hepatite C. 3. Imuno-histoquímica. I.
Ortega, Karem Lopez. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camargo AR. População de Células T CD8+ e Foxp3+ no Líquen Plano Oral Associado à Infecção Crônica de Hepatite C. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/2013

Banca Examinadora

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por investirem e acreditarem em minha educação e compreenderem a ausência decorrente desse investimento.

Obrigada por tudo...

Ao meu irmão e à minha pequena sobrinha:

Vocês fazem valer a frase "Longe é um lugar que não existe!"

A toda minha família, avós (mesmo ausentes), tios, tias, primos e primas que mesmo longe sempre torcem e vibram muito por mim!

Amo Muito vocês!!!

Aos amigos incondicionais Gá, Ciro e "Manu"; Marli, Daniel e "Caio"; Sica, Chris e "Henry"; Ana Cláudia, André e "Mel"; Aninha, KK, Robson e Alexandre. Vocês são verdadeiros companheiros de jornada. Com certeza muitos dos capítulos dessa história não poderiam ser escritos sem a participação de todos vocês!!

A Profa. Dra. Karem Lopez Ortega:

Se você já conseguia prever algum dos passos que seriam dados ao longo desse caminho, saiba que grande parte deles, foi inspirado por sua trajetória pessoal. Que muitos outros "orientados" tenham o prazer de trabalhar e aprender ao seu lado.

Obrigada... por tudo!

A Deus pelo dom da vida!

...e pela felicidade de permitir a construção de momentos inesquecíveis ao lado dos familiares e amigos que fazem parte dessa história...

AGRADECIMENTOS

À **professora Marília Trierveiler Martins** que me aceitou como aluna co-orientada. Seu dom pelo magistério é verdadeiramente inspirador. Muito obrigada pela ajuda e pela paciência, seja no desenvolvimento da tese ou nas poucas “rotinas” que fizemos juntas ao longo do curso. Para mim, foi uma honra tê-la como professora co-orientadora.

Ao **professor Celso Augusto Lemos Júnior**, por TODA ajuda em parte deste trabalho e especialmente pelo apoio e torcida em momentos decisivos de minha carreira profissional. Espero que a palavra OBRIGADA possa refletir minha gratidão, carinho e admiração.

Aos **demais professores da Disciplina de Patologia Bucal, Marina Helena Cury Gallottini, Suzana Cantanhe de Orsini Machado de Sousa, Andrea Mantesso, Décio dos Santos Pinto Júnior e Fábio Daumas Nunes** por toda ajuda e pelo aprendizado.

À **professora Luciana Corrêa** que sempre mantém a porta de sua sala aberta, com um enorme sorriso no rosto, para cada aluno que busca ajuda e orientação. Muitas das etapas realizadas neste trabalho não seriam possíveis sem sua colaboração, e por isso e muito mais OBRIGADA!

Aos **funcionários e técnicos da Disciplina de Patologia Bucal Zilda, Néia, Nair, Elisa, Adriana e Juvani**. O andamento das nossas “vidas” no curso de pós-graduação não seria possível sem a ajuda e o carinho de cada um de vocês.

Aos meus **amigos de pós graduação Anna Torrezani, Camila Gallo, Ana Paula Cândido, Rita Barcessat, Luciana Ferreira Valente, Flávia Cristina Perillo Rosin, Bianca Pulino, Carina Esteves, Karin Sá Fernandes, Lília Rocha, Michella Lima, Juvani Lago, Fabiana Martins, Márcio Augusto, Gustavo Rabelo, Carla Siqueira, Gabriela Nagata, Janaína Medina e Maria Luiza Veloso**, por toda amizade e companheirismo de trabalho compartilhados nestes dias um tanto complicados de pós-graduação, pela troca de experiências, pela parceria em trabalhos científicos e acima de tudo pelos momentos de estresse, choros e desabafos tão comuns em nosso dia-a-dia!

Aos **colegas e professores da Disciplina de Patologia Bucal e Ambulatório de Estomatologia do HU/UFSC: Filipe Modolo, Filipe Ivan Daniel, Elena Riet Correa Rivero, Maria Inês Meurer, Beatriz Inês Rath e Aira Bonfim Santos**. Sem palavras para descrever o carinho e amizade de todos vocês! Saudades dos nossos dias de ambulatório.

À **amiga e professora Liliane Janete Grando** que de coração e braços abertos me recebeu na universidade, permitindo e igualmente participando da realização deste trabalho, e acima de tudo me recebendo em sua vida como uma nova amiga paulistana.

À **professora doutora Esther Corrêa Dantas**, que à pedido da professora Liliane Janete Grando, possibilitou a realização deste estudo. Obrigada pelo carinho e ensinamentos durante as tardes sempre corridas de ambulatório.

À **toda equipe de profissionais médicos, residentes, internos e funcionários do Ambulatório de Hepatologia do HU/UFSC** que me receberam de braços abertos. Obrigada por permitir que estudo fosse realizado.

À **toda equipe de funcionários do Ambulatório de Estomatologia do HU/UFSC** que, de alguma forma, viabilizam nosso trabalho semanal nesta unidade hospitalar.

Aos **alunos do Curso de Graduação em Odontologia da UFSC**, em especial às **alunas Caroline Zimmerman, Maire Christine Rambo, Taíse Silva, e Suzeli Dias** que de alguma forma auxiliaram a realização desta pesquisa.

Às **residentes em Odontologia do curso multiprofissional do HU/UFSC**, **Luciana Goulart Medeiros, Cíntia Locks e Maíra Mery Rosa**, pela participação em parte desta pesquisa.

Às **amigas “manezinhas” Inês Beatriz Rath, Vera Lúcia Bosco, Cleumara Kosmann e Maria Inês Meurer**. Espero que a palavra “obrigada” possa refletir todo carinho, atenção e cuidado que vocês deferiram à mim desde minha chegada à Florianópolis. Tenham certeza que vocês se tornaram minha família de coração. Adoro muito vocês!

À **minha querida ‘ex – secretária’, companheira diária e amiga Andréia** que me ajuda e MUITO a organizar meus dias. Obrigada! Boa sorte com sua nova profissão. Não tenho dúvidas de que muitos pacientes serão beneficiados com seus cuidados.

À **todos os pacientes** que de alguma forma viabilizaram a realização deste trabalho, seja pelo conhecimento que me permitiram adquirir ao longo desses anos, ou pelo carinho que maioria de vocês me proporciona no exercício diário de minha profissão.

À **todos os grandes centros** que, direta ou indiretamente, participaram da realização deste sonho: **Universidade Metodista de São Paulo, Hospital Heliópolis, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Universidade Federal de Santa Catarina, Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago HU/UFSC e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.**

À **CAPES** pelo suporte financeiro.

“O que fazemos por nós mesmos morre conosco, mas o que fazemos pelos outros e pelo mundo, permanece e é imortal”.

Albert Pine

“A mente que se abre a uma nova idéia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

“Nada é impossível, se puder ser sonhado, então pode ser feito.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

Camargo AR. População de Células T CD8+ e Foxp3+ no Líquen Plano Oral Associado à Infecção Crônica de Hepatite C. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

A experiência adquirida na realização de estudos epidemiológicos sobre o líquen plano oral associado à infecção crônica de hepatite C nos faz acreditar que as lesões atróficas/erosivas associadas ao vírus C tendem a apresentar características clínicas atípicas, por vezes exacerbadas e com resposta piorada à terapêutica proposta. Acreditando que existiria uma contrapartida histopatológica que justificasse o comportamento clínico evidenciado, o presente estudo propôs-se a estudar as populações de células T CD8+ e Foxp3+ no líquen plano oral associado à infecção crônica de hepatite C e compará-las com as populações do líquen plano oral idiopático. Foram selecionados 11 blocos de líquen plano oral associado à infecção crônica de hepatite C (Grupo 1) e 19 blocos parafinados de líquen plano oral idiopático (Grupo 2) dos arquivos do Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e do Laboratório de Patologia Bucal, do Departamento de Patologia, da Universidade Federal de Santa Catarina. Para ambos os grupos foram realizados ensaios imuno-histoquímicos com marcação dos anticorpos anti-CD8 e anti-Foxp3. As células marcadas foram contabilizadas e os resultados tratados estatisticamente. No Grupo 1, 64% dos pacientes eram do sexo feminino; 82% leucodermas e a média de idade era de 59 anos (variação 46 aos 75 anos). No Grupo 2, 63% dos pacientes eram do sexo feminino; 71% leucodermas e a média de idade era de 50,2 anos (variação 32 aos 66 anos). Quando os dados entre os Grupos 1 e 2 foram comparados, não houve correlação estatisticamente significativa entre as contagens de células T CD8+, contagens de células T Foxp3+ ou na relação CD8+/Foxp3+ por mm². As lesões atróficas/erosivas do Grupo 1 apresentaram densidade aumentada de células T CD8+ ($p=0,034$) e aumento na relação CD8+/Foxp3+ por mm² ($p=0,018$), em relação ao Grupo 2. O estudo realizado não encontrou diferenças nas densidades de

células T CD8+ e Foxp3+ no infiltrado do líquen plano oral associado ao vírus C em relação ao líquen plano idiopático. Por outro lado, as diferenças encontradas na quantidade de células T CD8+ e na relação CD8/Foxp3, em lesões atróficas/erosivas, parecem justificar as características clínicas evidenciadas em estudos prévios.

Palavras-chave: Hepatite C. Líquen plano oral. Manifestação extra-hepática. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Camargo AR. Subset of CD8(+) and Foxp3(+) T Cells in Oral Lichen Planus Associated with Chronic Hepatitis C virus Infection. [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

Our previous studies with oral lichen planus associated with chronic hepatitis C virus infection leads us to believe that atrophic/erosive forms of oral lesions tend to present unusual clinical features, sometimes exacerbated with a worsened response to treatment. Considering that this exacerbated aspect could indicate a similar exacerbate histopathological feature, the aim of this study was evaluated the populations of CD8(+) and Foxp3(+) T cells in oral lichen planus associated with chronic hepatitis C virus infection and correlated the findings with idiopathic forms of these lesions. The sample consisted of 11 cases of oral lichen planus associated with chronic hepatitis C virus infection (Group 1) and 19 cases of idiopathic oral lichen planus (Group 2) obtained from the Laboratories of Oral Pathology of the University of São Paulo and the Federal University of Santa Catarina. In both groups immunohistochemistry staining were performed using anti-CD8 and anti-Foxp3 antibodies. Positive cells were counted per area and the results were subjected to statistical analysis. In Group 1, 64% of the patients were female, 82% caucasian with mean age of 59 years (range from 46 to 75 years). In Group 2, 63% of the patients were female, 71% caucasian with mean age 50.2 years (range from 32 to 66 years). When Groups 1 and 2 were compared, no significant correlation between the frequencies of CD8(+), Foxp3(+) T cells and the ratio of CD8(+)/Foxp3(+) counts per mm² was found. The atrophic/erosive lesions in Group 1 showed an increased frequency of CD8(+) T cells ($p = 0.034$) and an increased ratio of CD8(+)/Foxp3(+) counts per mm² ($p = 0.018$) compared to Group 2. In conclusion, our data indicated no differences in the frequencies of CD8(+) and Foxp3(+) T cells in the inflammatory infiltrate of oral lichen planus associated with chronic hepatitis C virus infection compared to idiopathic lesions. However, the differences in the counts of CD8(+) T cells and the ratio of CD8(+)/Foxp3(+) in atrophic/erosive lesions seemed justify the clinical features in previous studies.

Keywords: Hepatitis C. Oral lichen planus. Extrahepatic manifestations.
Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Representação do vírus C	22
Figura 2.2 - Genoma do vírus da hepatite C e distribuição das proteínas virais	22
Figura 2.3 - Mapa da distribuição de estudos epidemiológicos realizados sobre o líquen plano oral associado à infecção de hepatite C crônica	30
Figura 6.1 - Marcação imuno-histoquímica para CD8 e Foxp3. A) Positividade para CD8 no Grupo 1 (100x no original); B) Células positivas para CD8 no Grupo 2 (100x); C) Foxp3 presente no núcleo de linfócitos no Grupo 1 (100x); D) Positividade nuclear para Foxp3 no Grupo 2 (100x). Estreptavidina biotina.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 6.1 - Dados clínicos e análise do infiltrado inflamatório do Grupo 1.....	47
Quadro 6.2 - Densidade das populações celulares no infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado à infecção de hepatite C crônica	48
Quadro 6.3 - Densidade das populações celulares no epitélio do líquen plano oral associado à infecção de hepatite C crônica	50
Quadro 6.4 - Dados clínicos e análise do infiltrado inflamatório do Grupo 2.....	53
Quadro 6.5 - Densidade das populações celulares no infiltrado inflamatório do líquen plano oral idiopático	54
Quadro 6.6 - Densidade das populações celulares no infiltrado epitélio do líquen plano oral idiopático	56

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 6.1 - Gráfico de dispersão da relação de células T CD8+/Foxp3+ no infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado ao vírus C49
- Gráfico 6.2 - Gráfico de dispersão correlacionando a densidade de células T CD8+ no infiltrado inflamatório e no epitélio do líquen plano oral associado ao vírus C51
- Gráfico 6.3 - Gráfico de dispersão correlacionando a densidade de células T Foxp3+ no infiltrado inflamatório e no epitélio do líquen plano oral associado ao vírus C51
- Gráfico 6.4 - Gráfico de dispersão da relação de células T CD8+/Foxp3+ no infiltrado inflamatório do líquen plano oral idiopático55
- Gráfico 6.5 - Gráfico de dispersão correlacionando a densidade de células T CD8+ no infiltrado inflamatório e no epitélio do líquen plano oral idiopático ..57
- Gráfico 6.6 - Gráfico de dispersão correlacionando a densidade de células T Foxp3+ no infiltrado inflamatório e no epitélio do líquen plano oral idiopático ..57
- Gráfico 6.7 - Gráfico de dispersão da correlação de células T CD8+ e Foxp3+ no infiltrado inflamatório dos Grupos 1 e 2.....60
- Gráfico 6.8 - Gráfico de dispersão da correlação de células T CD8+ e Foxp3+ no epitélio dos Grupos 1 e 2.....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Resumo das principais manifestações extra-hepáticas associadas à infecção crônica de hepatite C	28
Tabela 5.1 - Simulação do tamanho amostral para o cálculo da prevalência de pacientes com líquen plano oral dentre os que possuem infecção crônica pelo vírus C na cidade de São Paulo, com variação do Erro e da Confiança	41
Tabela 6.1 - Dados gerais do Grupo 1	46
Tabela 6.2 - Mínimos, máximos, médias, medianas e desvios padrão das contagens de células T CD8+ e Foxp3+, com áreas de contagens e células por área no infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado ao vírus C.....	48
Tabela 6.3 - Dados gerais do Grupo 2	52
Tabela 6.4 - Mínimos, máximos, médias, medianas e desvios padrão das contagens de células T CD8+ e Foxp3+, com áreas de contagens e células por área no infiltrado inflamatório do líquen plano oral idiopático.....	54
Tabela 6.5 - Comparação entre os dados demográficos dos Grupos 1 e 2	58
Tabela 6.6 - Comparação entre as populações celulares dos Grupos 1 e 2... ..	59
Tabela 6.7 - Comparação entre as populações celulares dos Grupos 1 e 2. Segundo tipo clínico.. ..	61
Tabela 6.8 - Mínimos, máximos, médias, medianas e desvios padrão das contagens de células T CD8+ e Foxp3+, com áreas de contagens e células por área no epitélio.....	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 A infecção de hepatite C crônica	21
2.2 A Resposta imune ao vírus C	23
2.3 O papel de linfócitos T regulatórios na infecção de hepatite C	25
2.4 A infecção de hepatite C e suas manifestações extra-hepáticas.....	27
2.5 Líquen plano oral idiopático e como manifestação extra-hepática da infecção de hepatite C crônica	29
3 JUSTIFICATIVA	34
4 OBJETIVOS.....	35
5 MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1 Materiais.....	36
5.1.1 Seleção dos casos	36
5.1.1.1 <i>Informações adicionais sobre o Grupo 1</i>	<i>37</i>
5.1.1.2 <i>Informações adicionais sobre o Grupo 2.....</i>	<i>39</i>
5.1.2 Cálculo amostral.....	39
5.2 Métodos.....	41
5.2.1 Análise morfológica	41
5.2.2 Reações de imuno-histoquímica	42
5.3 Análise dos resultados	43
5.4 Análise estatística	44
6 RESULTADOS.....	45
6.1 Análise do Grupo 1.....	45
6.1.1 Análise dos parâmetros clínicos e anátomo-patológicos do Grupo1	46
6.1.2 Análise das populações CD8 e Foxp3 positivas no infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado ao vírus C	47
6.1.3 Análise da exocitose de linfócitos T CD8 e Foxp3 positivos no líquen plano oral associado ao vírus C	49
6.2 Análise do Grupo 2.....	52
6.2.1 Análise dos parâmetros clínicos e anátomo-patológicos do Grupo 2.....	52

6.2.2 Análise das populações CD8 e Foxp3 positivas no infiltrado inflamatório do líquen plano oral idiopático	53
6.2.3 Análise da exocitose de linfócitos T CD8 e Foxp3 positivos no líquen plano oral idiopático.....	55
6.3 Comparação dos resultados entre os Grupos 1 e 2.....	57
7 DISCUSSÃO	65
8 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXOS	82

1 INTRODUÇÃO

A associação entre o líquen plano oral e a infecção crônica pelo vírus C tem sido tema de pesquisa desde a década de 90,⁽¹⁾ sendo que a maior parte dos trabalhos publicados tem base epidemiológica, com resultados discrepantes ao redor do mundo.⁽²⁻⁵⁾

O presente estudo foi conduzido como parte de uma linha de pesquisa iniciada no ano 2007 com a elaboração de uma monografia apresentada ao curso de especialização em Pacientes Especiais,⁽⁵⁾ seguida por dois estudos epidemiológicos realizados em diferentes regiões geográficas brasileiras,⁽⁶⁾ e que, na atualidade, culmina com a tese de doutorado aqui apresentada.

Trata-se de um estudo comparativo do perfil inflamatório do líquen plano oral associado à infecção crônica pelo vírus C e do líquen plano oral idiopático.

A experiência adquirida ao longo dos anos nos levou a acreditar que as lesões atróficas/erosivas de líquen plano oral associadas ao vírus C tendiam a apresentar características clínicas atípicas, de caráter exacerbado e recalcitrante ao tratamento, comparadas as lesões de líquen plano oral idiopático.^(6,7)

Alguns autores já avaliaram se diferentes mecanismos patogênicos poderiam justificar o aparecimento de lesões de líquen plano oral em pacientes com infecção crônica de hepatite C comparados às lesões idiopáticas.⁽⁸⁻¹¹⁾

Nenhuma resposta concreta foi alcançada,⁽⁸⁻¹¹⁾ e novos questionamentos continuam a ser feitos e avaliados pela produção de novos trabalhos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nas próximas páginas serão abordadas informações relevantes para compreensão do estudo desenvolvido.

2.1 A infecção de hepatite C crônica

A infecção de hepatite C crônica constitui um grave problema de saúde pública, com cerca de 170 milhões de pessoas infectadas no mundo.^(12,13) No Brasil, o número de novas notificações no período de 1999 à 2010, chegou a contabilizar 69.952 casos da doença e segundo Focaccia, aproximadamente 1,42% da população na cidade de São Paulo encontra-se infectada.^(14,15)

Aproximadamente 20% dos indivíduos infectados eliminam o vírus da hepatite C espontaneamente, enquanto 80% desenvolvem doença crônica progressiva.⁽¹⁶⁾ Destes, ao menos 20% poderão evoluir para a cirrose hepática, num período que pode variar de 20 a 50 anos. Além disso, alguns pacientes podem vir a óbito em decorrência de complicações como o carcinoma-hepato-celular.⁽¹⁷⁾

Como se vê a progressão da infecção crônica de hepatite C não é linear em todos os pacientes e, segundo pesquisadores, determinadas variáveis com impacto substancial nesta evolução podem ser identificadas:

- Fatores virais, como a cinética do vírus C e a lesão citopática que ele causa;
- Fatores do hospedeiro, como o sexo masculino, raça negra, idade avançada (acima dos 40 anos) e polimorfismos genéticos;
- Fatores ambientais, como o etilismo, diabetes e obesidade.⁽¹⁶⁾

O vírus da hepatite C apresenta um formato esférico com aproximadamente 50 nm de diâmetro e pertence à família *Flaviviridae* do gênero *Hepacivirus* (Figura 2.1). Seu genoma é constituído por uma molécula de RNA que contém aproximadamente 10.000 nucleotídeos que codificam as informações necessárias à replicação viral. A cadeia de RNA é composta por duas regiões terminais altamente

conservadas e não codificadoras (NTR) 5' e 3' e entre estas, uma única fase de leitura aberta (ORF do inglês “open reading frame”) que codifica uma poliproteína com pouco mais de 3.000 aminoácidos. Esta poliproteína é clivada no pólo N-terminal em três proteínas estruturais: o núcleocapsídeo (core), envelope um (E1) e envelope dois (E2) que estão envolvidas na organização arquitetural do vírus C. No pólo carboxiterminal a poliproteína é clivada em seis proteínas não estruturais: NS2, NS3, NS4A e NS4B, NS5A e NS5B, responsáveis pelo ciclo biológico do vírus (Figura 2.2).^(16,18)

Figura 2.1– Representação do vírus da hepatite C
Fonte: Thimme et al. (2012)⁽¹⁶⁾

Figura 2.2 – Genoma do vírus da hepatite C e distribuição das proteínas virais
Fonte: Thimme et al. (2012)⁽¹⁶⁾

Após o contágio, o vírus da hepatite C penetra na corrente sanguínea e segue ao fígado por tropismo, passando por diversos tecidos.⁽¹⁹⁾ Um número crescente de evidências mostra que hepatócitos são apenas um dos alvos para infecção do vírus C, já que sequências genômicas também foram encontradas em populações de linfócitos B e T, monócitos e macrófagos, células de Kupffer e dendrócitos.⁽¹⁹⁻²²⁾

A compartimentalização e o linfotropismo viral podem diminuir o reconhecimento do vírus C pelo sistema imune,⁽²²⁾ além de favorecer o aparecimento de diversas manifestações em outros órgãos e sistemas.^(18,23,24)

O vírus da hepatite C ainda apresenta uma alta taxa replicativa, de aproximadamente 10^{12} cópias/dia,⁽¹²⁾ e uma alta taxa mutacional; o que leva à uma grande heterogeneidade de apresentações conhecidas como quasiespécies, também responsáveis pela persistência do vírus quando seu comportamento biológico excede a resposta imune do hospedeiro.^(12,19)

A seleção e a adaptação do organismo humano às quasiespécies deu origem a distintos genótipos, cuja classificação baseia-se na similaridade da sequência de nucleotídeos.⁽¹⁸⁾ Na classificação atual existem 6 tipos de genótipos identificados de 1 a 6, com mais de 100 subtipos em diferentes regiões geográficas.⁽²⁵⁾

2.2 A resposta imune ao vírus C

Uma das características mais desafiadoras da infecção de hepatite C diz respeito a sua elevada propensão para cronificação, fato que evidencia a habilidade viral em evadir as respostas imunes natural – ou inata – e adaptativa – ou adquirida – do hospedeiro.⁽²⁵⁾

A resposta imune inata é marcada pela produção de interferons tipo I - α e β - por células infectadas e constitui a primeira linha de defesa contra a replicação do vírus C no organismo humano.^(12,13,16)

Pesquisadores estimam que durante o pico de viremia, não mais que 10% dos hepatócitos estejam infectados. Ou seja, interferons tipo I secretados por células infectadas induzem um estado hepático antiviral que se estende a células vizinhas não infectadas.^(12,26) A produção destes interferons induz várias ações antivirais como a expressão de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade

(MHC) tipo I, que facilitam o reconhecimento de antígenos virais pelo sistema imune, além de viabilizar a ativação de linfócitos T CD8+, células NK (natural killer) e macrófagos. Na infecção pelo vírus C diversas proteínas induzidas por interferons são responsáveis pela expressão de genes que inibem a replicação deste vírus no interior dos hepatócitos.⁽²⁷⁾

Dada a importância deste estado de alerta para iniciação da resposta imune inata do hospedeiro, numerosas estratégias de subversão viral são experimentadas, tais como o bloqueio da produção de interferons tipo I, interferências em cascatas de sinalização e inibição da expressão de genes responsivos ao interferon. Todos esses processos permitem que a maquinaria replicativa viral seja liberada no interior da célula alvo, antes que o hospedeiro reconheça de forma efetiva sua presença.^(12,16)

As células NK têm habilidade de destruir células infectadas e inibir diretamente a replicação do vírus C em hepatócitos.⁽²⁷⁾ Estas provavelmente constituem uma das mais importantes linhas de defesa das hepatites virais, visto que o fígado humano contém um grande número delas. As células NK são componentes da resposta imune inata que respondem minutos ou horas após a infecção, por meio da polarização de grânulos em direção a células infectadas e liberação de seu conteúdo (perforinas) que irá fragmentar o núcleo destas células, para assim induzir sua morte.⁽²⁸⁾ Elas inibem a replicação viral pela produção de interferon gama (IFN γ), recrutam células inflamatórias adicionais intrahepáticas e estimulam a resposta Th1.⁽²⁹⁾

As células dendríticas, assim como macrófagos, são consideradas células apresentadoras de antígenos (APC) profissionais que, uma vez ativadas no foco inflamatório, expressam em sua superfície grandes quantidades de moléculas co-estimulatórias, que auxiliam a ativação da resposta imune mediada por linfócitos T.⁽²⁹⁾ Análises de células dendríticas em pacientes com infecção de hepatite C crônica mostraram uma diminuição em sua capacidade de ativar células NK em resposta ao estímulo de interferon α na fase aguda da infecção.⁽³⁰⁾ Por sua vez, as células NK também têm a capacidade de aumentar as funções das células dendríticas, porém esta capacidade está comprometida em pacientes com infecção de hepatite C crônica.⁽³¹⁾

Nos indivíduos cronicamente infectados, após uma fraca iniciação da resposta imune natural, a resposta imune humoral é ativada, sendo marcada pela

produção de altos títulos de anticorpos contra múltiplos epítomos virais, na tentativa de debelar a infecção.⁽²⁷⁾ A expressão da região hipervariável E2 do envelope viral estimula linfócitos B a produzir anticorpos neutralizantes contra o vírus C.⁽¹⁶⁾ O vírus passa a sofrer pressão seletiva do organismo, que estimula a variação nucleotídica e o aparecimento de mutações das proteínas do envelope, selecionando variantes genômicas na tentativa de eliminar o sítio de reconhecimento da resposta imune.^(12,13,27) As diferentes mutações dão origem a quasispécies circulantes do vírus C, sendo que qualquer uma delas pode passar a ser a cepa dominante, conforme outras cepas coexistentes passam a ser controladas pelo sistema imune.^(19,27) A grande quantidade de quasispécies do vírus C originada⁽¹⁹⁾ dribla a resposta humoral e a persistência da infecção ocorre, com insuficiente ação de anticorpos neutralizantes.^(16,27,30)

Concomitantemente à ativação da resposta imune humoral, a imunidade adaptativa celular mediada por células T também é ativada, sendo fundamental para a eliminação do vírus C do organismo humano, além de ser a grande responsável pela lesão citopática no fígado.^(13,16,25)

Para alguns pesquisadores, linfócitos T CD4⁺ são as principais células envolvidas na eliminação do vírus C do hospedeiro, cuja ação deficiente seria um dos fatores responsáveis pela evolução crônica da infecção.^(16,25) A fraca ativação de linfócitos T CD4⁺ induz a uma resposta imune menos vigorosa de linfócitos T CD8⁺, inadequada para eliminar o vírus do fígado,^(25,32,33) porém suficiente para causar a lesão citopática deste órgão.^(15,18,24)

Em resumo, pesquisadores relacionam a resposta imune vigorosa e duradoura mediada por linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ a uma infecção aguda auto-resolutiva (erradicação viral do organismo), enquanto a perda de resposta linfocitária mediada por células T CD4⁺ e consequente fraca ativação de linfócitos T CD8⁺ com a evolução crônica da infecção.^(12,13,16,25,33)

2.3 O papel de linfócitos T regulatórios na infecção de hepatite C

Nos últimos vinte anos, uma compilação de dados sugere que células T regulatórias identificadas pelos marcadores CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ sejam responsáveis

pela supressão de respostas imunomediadas em diversos processos patológicos, tais como: doenças autoimunes, processos alérgicos, câncer e doenças infecciosas.^(13,33–37)

Linfócitos T regulatórios demonstram ser fundamentais para a imunotolerância tecidual, especialmente por não apresentarem reatividade frente a estímulos para receptores de células T.⁽³⁴⁾ Ao contrário, uma vez ativadas, essas células passam a suprimir funções como proliferação, ativação, diferenciação e função efetora de linfócitos T CD4+/CD8+, linfócitos B, células natural killer, células T natural killer e células dendríticas.^(34,38)

Didaticamente, linfócitos T regulatórios podem ser divididos em dois grupos: (a) linfócitos T regulatórios naturais, ou nTregs, originados no timo durante o processo de maturação; e (b) linfócitos T regulatórios induzidos, ou iTregs, formados a partir de linfócitos T *naïve* CD4+CD25- presentes na periferia.^(36–38)

Não existem marcadores capazes de diferenciar sua origem, e na atualidade o fator de transcrição nuclear Foxp3 demonstra ser o marcador fenotípico mais específico para linfócitos T regulatórios.⁽³⁷⁾ Identificado a partir de mutações no gene Foxp3 em camundongos Scurfy e subsequentemente em pacientes com enteropatia ligada ao X (IPEX), a expressão do fator de transcrição Foxp3 em linfócitos T CD4+ *naïve* passou a ser relacionada ao controle da imunotolerância tecidual.⁽³⁶⁾

No caso de doenças infecciosas, pesquisadores acreditam que a expressão de Foxp3 em linfócitos T, represente um mecanismo fisiológico, capaz de suprimir um dano imuno-patológico excessivo. Nesse cenário, a presença dessa subpopulação limitaria o dano tecidual imunomediado após o controle da infecção. No entanto, em determinadas situações, a ativação precoce dessas células poderia suprimir respostas imunes incipientes contra patógenos e também contribuir com a cronificação de infecções.^(13,37)

Uma das características clínicas mais marcantes da infecção de hepatite C está em sua elevada propensão em desenvolver doença crônica progressiva. Como visto anteriormente, infecções de curso crônico são marcadas por uma resposta imune disfuncional mediada por linfócitos T CD4+/CD8+, incapazes de erradicar o vírus C do organismo hospedeiro.^(16,25)

Estudos demonstram que, durante as fases iniciais da doença, não existem diferenças nas proporções de células T regulatórias entre os pacientes que desenvolverão infecção crônica versus infecção aguda auto-resolutiva. Pacientes

com infecção aguda apresentam uma alta frequência de linfócitos T regulatórios circulantes, sugerindo que a expansão clonal desta subpopulação se dê em fases ainda incipientes da doença.⁽³⁹⁾ Porém, conforme a progressão da infecção ocorre, a função destas células muda ao longo do tempo, e ao que parece, a resolução espontânea da infecção pode ser relacionada à perda temporal da função supressora destas células.^(39,40) Por outro lado, uma vez estabelecida a infecção crônica, linfócitos T regulatórios passam a inibir ativamente a erradicação do vírus C, via supressão de linfócitos T CD8+. Paradoxalmente à disfunção linfocitária de células T CD8+, células T regulatórias exerceriam suas funções supressoras com bastante eficácia nesse estágio da doença.^(16,25,40,41)

O exato mecanismo de ação de linfócitos T regulatórios não está completamente elucidado e alguns estudos indicam que o contato direto célula/célula é necessário para que funções supressoras sejam exercidas, enquanto outros trabalhos sugerem que a ação de citocinas como IL-10 e TGF- β sejam essenciais para que estas células exerçam funções supressoras.^(35,36,40)

2.4 A infecção de hepatite C e suas manifestações extra-hepáticas

Logo após a descoberta da hepatite C em 1989, um número crescente de manifestações em diferentes órgãos e sistemas começou a ser correlacionado à infecção crônica (Tabela 2.1).⁽¹⁾

Tabela 2.1* – Resumo das principais manifestações extra-hepáticas associadas à infecção crônica de hepatite C

Hematológicas
(linfoma não-Hodgkin, crioglobulinemia mista)
Alterações renais
(glomerulonefrite membranoproliferativa)
Pele
(porfiria cutânea tardia, líquen plano)
Autoimune/Inflamatórias
(sialodenite/síndrome sicca, tireoidite auto-imune)
Síndrome metabólica
(diabetes melito tipo 2)

*Tabela adaptada Jacobson et al. (2010).⁽²³⁾

Segundo a literatura, cerca de 40 a 75% dos pacientes cronicamente infectados pode desenvolver ao menos uma manifestação extra-hepática ao longo da vida,^(12,24,42,43) sendo este risco aumentado em 12 vezes para porfiria cutânea tardia, 11 vezes para crioglobulinemia mista, 7 para glomerulonefrite membranoproliferativa, 2,5 para o linfoma e 2 vezes para o líquen plano.^(25,44)

Dentre as manifestações citadas, o mecanismo da patogênese da crioglobulinemia mista é o mais conhecido. Por esse motivo, todos os pacientes diagnosticados com a doença devem ser sistematicamente avaliados para infecção pelo vírus C.^(21,23) A vasculite, sinal mais marcante da doença, resulta da estimulação crônica de linfócitos B e consequente expansão clonal com produção de anticorpos, formando complexos imunes circulantes, compostos por fator reumatoide, IgG-IgM e partículas do vírus C, que se depositam na parede dos vasos.^(20,23,45)

O linfoma representa outra importante manifestação associada à infecção de hepatite C crônica^(23,44) e, como em outras manifestações extra-hepáticas, a

patogênese da doença é bastante controversa.^(44,46) Hipotetiza-se que a neoplasia apresente mecanismos biológicos semelhantes aos da crioglobulinemia mista,⁽²¹⁾ logo, é possível que o estímulo antigênico do vírus C induza à expansão clonal de linfócitos B e, ocasionalmente, culmine com a formação de um linfoma não-Hodgkin de baixo grau.^(21,46)

2.5 Líquen plano oral idiopático e como manifestação extra-hepática da infecção de hepatite C crônica

A primeira descrição sobre a associação entre a infecção de hepatite C crônica e o líquen plano foi verificada na literatura em 1991, entretanto os primeiros relatos de casos publicados sobre líquen plano oral datam de 1994.⁽¹⁾ A partir de então, estudos epidemiológicos passaram a ser realizados, fornecendo evidências contraditórias e instigantes sobre a veracidade desta associação (Figura 2.3).^(3,5,6)

Figura 2.3 – Mapa da distribuição de estudos epidemiológicos realizados sobre o líquen plano oral associado à infecção de hepatite C crônica

Fonte: Camargo e Ortega. (2007).⁽⁵⁾

Será que o vírus da hepatite C influencia o desenvolvimento de líquen plano em pacientes com infecção crônica? Todos os pacientes diagnosticados com líquen plano deveriam ser obrigatoriamente avaliados quanto à presença da infecção pelo vírus C? Será que a doença líquen plano teria um curso clínico piorado quando associada à infecção crônica de hepatite C?⁽¹⁾ Meta-análises recém publicadas confirmam a ligação entre ambas as doenças,⁽²⁻⁴⁾ enquanto novas evidências biológicas são necessárias para desmistificar se a relação entre o líquen plano e a infecção de hepatite C crônica é apenas casual.⁽¹⁾

O líquen plano idiopático é uma doença mucocutânea inflamatória crônica de etiologia incerta que raramente apresenta remissão espontânea. No Brasil a prevalência da doença é desconhecida, e a literatura mundial estima que entre 1% e

2% dos indivíduos seja acometido, com predileção pelo sexo feminino (2:1), e manifestação entre 5^a. e 6^a. décadas de vida.⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾

O acometimento da mucosa bucal ocorre em 50 a 70% dos casos e pode ser exclusivo em 20 a 30% dos pacientes avaliados.⁽⁵¹⁾ Clinicamente o líquen plano oral é uma doença polimorfa, com seis formas de apresentação descritas na literatura: reticular, papular, placa, atrófica, erosiva e bolhosa; que podem estar presentes simultaneamente em um mesmo paciente.^(48,52) Nessas situações, a classificação da doença é determinada pela forma clínica mais severa e predominante no sítio lesional.^(50,52) As lesões afetam a mucosa jugal, língua e gengivas, nesta ordem de preferência,^(48,50,52) sendo normalmente bilaterais e simétricas.⁽⁵²⁾

O quadro histopatológico do líquen plano oral idiopático é caracterizado por paraqueratose, atrofia e projeções epiteliais em “dentes em serra”; além da presença de degeneração da camada basal e um infiltrado inflamatório em banda, predominantemente linfocitário, na zona papilar da lâmina própria. A apoptose de queratinócitos pode ainda estar presente e ser identificada pela marcação de glóbulos eosinofílicos homogêneos denominados corpos de Civatte – corpos coloides, hialinos ou citoides.^(48,49,53)

O evento precoce para a manifestação da doença talvez seja a expressão de um estímulo antigênico em queratinócitos, demarcando assim, a futura localização da lesão no epitélio oral.^(48,54) A expressão deste “antígeno para líquen plano” poderia ser precipitada por fatores extrínsecos ao organismo – patógenos, traumas e medicamentos – ou ainda ser ocasionada por alterações intrínsecas – hormonais e genéticas - mesmo assim, não se descarta a possibilidade desse “antígeno” ser um autopeptídeo tornando o líquen plano oral uma doença auto-imune verdadeira.^(48,54)

Mesmo desconhecido, a ligação desse “antígeno para líquen plano” a moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) classe I, expressas na superfície de queratinócitos basais sensibilizados, ativaria linfócitos T CD8+, desencadeando a resposta imunológica que culminaria com apoptose de queratinócitos e consequente dano epitelial.^(48,49,53)

Pesquisadores acreditam que células inflamatórias adicionais sejam atraídas ao sítio lesional pela produção de quimiocinas, retroalimentando todo o processo. Células de Langerhans presentes no epitélio seriam ativadas pelo ‘antígeno para líquen plano’ via moléculas de MHC classe II, desencadeando uma cascata de eventos na qual a produção de citocinas inflamatórias, especialmente interleucina –

2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- γ), ativariam linfócitos T CD4+, com subsequente expansão clonal e ativação de linfócitos T CD8+. ^(48,49,53) A expressão de moléculas MHC classe II também poderia se dar na superfície de queratinócitos sensibilizados pelo 'antígeno para líquen plano', resultando na amplificação da resposta Th1 via ativação de linfócitos T CD4+. ⁽⁵³⁾

A natureza imunomediada da doença também suscita a ação de células T regulatórias Foxp3+, que nestas circunstâncias, exercem funções supressoras sobre linfócitos T CD8+, possivelmente modulando manifestações clínicas da doença e talvez influenciando o caráter crônico das lesões. Segundo Tao e colaboradores ⁽⁵⁵⁾ existe uma correlação entre a qualidade do infiltrado inflamatório do líquen plano idiopático com o tipo clínico lesional. Os autores apontam uma maior quantidade de células T Foxp3+ em lesões reticulares/hiperqueratóticas e uma menor quantidade em lesões erosivas/eritematosas. De acordo com a análise, linfócitos T Foxp3+ desempenham um importante papel na patogênese do líquen plano oral idiopático, e podem ser utilizados como uma nova estratégia no manejo de lesões. ⁽⁵⁵⁾

Três estudos epidemiológicos conduzidos por nosso grupo de pesquisa confirmam a associação entre o líquen plano oral e a infecção de hepatite C crônica, ^(6,7,56) especialmente quando pacientes cronicamente infectados foram avaliados quanto à presença da manifestação (dado ainda não publicado). ⁽⁶⁾ Apesar da baixa casuística analisada, lesões de líquen plano oral associadas ao vírus C mostraram, em determinadas situações, um curso clínico exacerbado, por vezes com baixa resposta à terapêutica proposta, ^(6,7) de forma que o tipo clínico atrófico apresentou predominância na maioria dos casos, sendo a ausência de bilateralidade e simetria uma característica marcante da doença. ⁽⁶⁾

Poucos estudos na área odontológica foram realizados até o momento com o objetivo de averiguar se a compartimentalização do vírus C poderia, de alguma maneira, influenciar ou participar da patogênese do líquen plano oral associado à infecção crônica de hepatite C. ^(9,11,57-59)

Segundo pesquisadores, a identificação de cadeias negativas de RNA viral em amostras de tecido de líquen plano oral, sugere sua participação na patogênese da doença. ^(9,11,58) Embora os resultados na literatura sejam contraditórios, ⁽⁵⁷⁾ sinais positivos de marcação permaneceram restritos ao epitélio (queratinócitos), sem qualquer evidência de infecção pelo vírus C em células do infiltrado inflamatório. ⁽⁹⁾

Conceitualmente, lesões de líquen plano oral idiopático desenvolvem-se a partir de uma resposta imunomediada guiada por células T dirigida contra o epitélio.^(48–50,53) No caso do líquen plano oral associado à infecção de hepatite C crônica, uma resposta imune compartimentalizada, composta por linfócitos T CD4+/CD8+ vírus C específicos,⁽⁵⁹⁾ poderia ser direcionada a queratinócitos infectados pelo vírus C,⁽⁹⁾ e assim contribuir com o aparecimento da manifestação extra-hepática. O assunto é bastante controverso, e mesmo diante destas evidências, novos estudos são necessários para confirmar essas hipóteses.

JUSTIFICATIVA

A literatura demonstra uma correlação entre a qualidade do infiltrado inflamatório presente no líquen plano oral idiopático e as características clínicas apresentadas por essa lesão.

A experiência adquirida com os estudos epidemiológicos realizados, nos leva a acreditar que as lesões de líquen plano oral associadas à infecção crônica de hepatite C tendem a apresentar características clínicas muitas vezes mais exacerbadas e recalcitrantes à terapêutica, comparadas às lesões de líquen plano oral idiopático. Essas duas informações nos levam a crer que o perfil inflamatório do líquen plano idiopático possa ser diferente do perfil inflamatório do líquen plano associado a hepatite C.

4 OBJETIVOS

Estudar as populações de células T CD8+ e Foxp3+ no infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado à infecção crônica de hepatite C e compará-las as mesmas populações do líquen plano oral idiopático.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo aprovou a realização deste estudo em 04/10/2012 por meio do parecer de número 115.649 (Anexo A).

5.1 Materiais

O estudo conduzido é parte de uma linha de pesquisa iniciada no ano de 2007 pela elaboração de uma monografia apresentada ao curso de especialização em Odontologia para Pacientes Portadores de Necessidades Especiais,⁽⁵⁾ seguida por dois estudos epidemiológicos realizados em diferentes universidades brasileiras:

- Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, área de concentração Diagnóstico Bucal;⁽⁶⁾
- Projeto de pesquisa desenvolvido por professores da Universidade Federal de Santa Catarina, Disciplinas Estomatologia e Patologia Bucal.

Trata-se de um estudo comparativo entre o líquen plano oral associado à infecção crônica de hepatite C (Grupo 1 - Grupo caso) e o líquen plano oral idiopático (Grupo 2 – Grupo controle).

5.1.1 Seleção dos casos

Foram selecionados 23 blocos parafinados de líquen plano oral idiopático e 13 blocos de líquen plano oral associado à infecção crônica de hepatite C, do arquivo do Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo B) e do

Laboratório de Patologia Bucal, do Departamento de Patologia, da Universidade Federal de Santa Catarina (Anexo C).

Os blocos representavam resultados de biópsias de pacientes avaliados no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto de Infectologia Emílio Ribas/SP (Anexo D),⁽⁶⁾ do Ambulatório de Hepatologia do Hospital Professor Polydoro Ernani de São Thiago HU/UFSC (Anexo E) e da Clínica de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo⁽⁶⁾ (Anexo F).

As biópsias foram executadas em dois estudos prévios conduzidos pela mesma pesquisadora.⁽⁶⁾

5.1.1.1 Informações adicionais sobre o Grupo 1

Pacientes com líquen plano oral associados à infecção crônica de hepatite C foram selecionados durante o atendimento médico no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER/SP) e no Ambulatório de Hepatologia do Hospital Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC); no período de outubro de 2008 à março de 2010, e novembro de 2011 à julho de 2012, respectivamente.⁽⁶⁾ Foram avaliados um total de 397 (IIER/SP 275; HU/UFSC 122) indivíduos, dos quais 13 apresentaram diagnóstico clínico/histopatológico confirmado de líquen plano oral. Na ocasião todos os pacientes foram primariamente avaliados quanto à presença de lesões sugestivas de líquen plano oral, durante consulta médica de rotina, posteriormente encaminhados para o setor de odontologia dos respectivos hospitais para a realização de biópsias incisionais.

Os critérios de inclusão dos pacientes com líquen plano oral associados à infecção crônica de hepatite C foram:

- idade superior a 18 anos;
- diagnóstico da infecção de hepatite C pelo exame ELISA (MEIA, *kit* AxSYM[®] HCV version 3.0, Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois) confirmado pelo teste de PCR qualitativo (Cobas Amplicor HCV Monitor[™] test, version 2.0, Roche Diagnostic Systems, NJ, USA) para os pacientes avaliados no IIER/SP;
- diagnóstico da infecção de hepatite C pelo exame ELISA (anti-VHC)

confirmado pelo teste de PCR qualitativo para os pacientes avaliados no HU/UFSC. A padronização da marca comercial dos exames diagnósticos foi inviabilizada neste trabalho, visto que muitos pacientes já foram encaminhados ao Ambulatório de Hepatologia do HU/UFSC com o diagnóstico de infecção pelo vírus C efetuado previamente; e

- diagnóstico clínico/histopatológico de líquen plano oral.

Dentre as características demográficas analisadas, o sexo, a idade e a etnia foram incluídos devido às implicações no curso crônico da infecção – como exposto na revisão da literatura.⁽¹⁶⁾

Os critérios de não inclusão dos pacientes com líquen plano oral associados à infecção crônica de hepatite C foram:

- uso prévio de interferon e ribavirina por um período menor que 6 meses à avaliação bucal;
- pacientes em um uso de terapia antiviral (interferon e ribavirina) no momento da avaliação bucal;
- evidências de co-infecções como: hepatite B, HIV, HTLV, entre outras;
- pacientes com diagnóstico sugestivo de reações liquenoides por contato com materiais restauradores ou drogas para lesões bucais; e
- casos de líquen plano oral com achados histopatológicos de displasia epitelial.

O diagnóstico para lesões sugestivas de LPO foi fundamentado em bases clínicas e histopatológicas, segundo critérios definidos pela OMS em 1978 e posteriormente modificados por van der Meij e van der Waal em 2003⁽⁶⁰⁾. Segundo os autores, o critério clínico-diagnóstico requer a presença de estrias e/ou pápulas esbranquiçadas bilaterais, isoladas ou em associação as formas clínicas atróficas e erosivas.^(52,60)

O critério histopatológico considerado foi baseado na presença de um infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário na região justaeptelial, somados à presença de sinais de degeneração da camada basal e a ausência de displasia epitelial. Lesões com aspectos clínicos e histopatológicos típicos ou compatíveis de líquen plano oral também foram incluídos no estudo.^(52,60)

5.1.1.2 Informações adicionais sobre o Grupo 2

No período de outubro de 2008 a março de 2010, 2136 indivíduos procuraram a Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para tratamento odontológico. Desses, 1593 foram atendidos na Clínica de Estomatologia e 32 tiveram o diagnóstico clínico de líquen plano oral idiopático efetuado. Apenas 28 pacientes tiveram confirmação histopatológica para o diagnóstico clínico. No presente estudo foram utilizados 23 blocos originados destas biópsias, pois 5 blocos não foram localizados nos arquivos.

Os critérios de inclusão para estes pacientes foram:

- idade acima de 18 anos;
- hemograma completo com resultados dentro dos padrões de normalidade;
- valores normais de enzimas hepáticas (AST e ALT); e
- sorologia negativa para hepatite C (anti-VHC – ELISA).

Os critérios de não inclusão considerados foram:

- pacientes com diagnóstico sugestivo de reações liquenoides por contato com materiais restauradores ou drogas para lesões bucais; e
- casos de líquen plano oral com achados histopatológicos de displasia epitelial.

5.1.2 Cálculo amostral

Com o objetivo de verificar se a amostra do grupo 1 é suficiente para dar prosseguimento ao estudo, foram feitas algumas avaliações.

Para execução do cálculo estatístico considera-se que, a população de São Paulo é de 11.244.369 habitantes,⁽⁶¹⁾ e a prevalência estimada de pacientes com vírus C em São Paulo de 1,42%, com Intervalo de Confiança (IC) de 95% [IC = 1,41%; 1,43%].⁽¹⁵⁾ Assumindo que esta prevalência é verdadeira, cerca de 159.670

habitantes de São Paulo estão infectados pelo vírus C. O estudo realizado pela autora em 2010⁽⁶⁾ avaliou uma população de 275 pacientes infectados pelo vírus C (0,2% da população estimada de pacientes com o vírus C do estado de São Paulo) e encontrou 6 pacientes com líquen plano oral (prevalência de 2,18%, IC (95%) = [0,46%; 3,91%]).

Com base nestas informações, a equação abaixo foi utilizada para determinar o tamanho da amostra. Sendo que, para 90% de confiança teremos o valor crítico ($Z_{\alpha/2}$) = 1,645 e para 95% de confiança o valor crítico ($Z_{\alpha/2}$) = 1,960.

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 \cdot p \cdot q}{E^2}$$

Onde:

n = Número de indivíduos na amostra;

$Z_{\alpha/2}$ = Valor crítico que corresponde ao grau de confiança desejado;

p = Proporção populacional de indivíduos que pertence à categoria que se está interessado em estudar;

q = Proporção populacional de indivíduos que não pertence à categoria que se está interessado em estudar ($q = 1 - p$);

E = Margem de erro ou erro máximo de estimativa. Identifica a diferença máxima entre a proporção amostral e a verdadeira proporção populacional (p).⁽⁶²⁾

Portanto, para uma amostra ideal de 13 pacientes, deve-se ter uma confiança de 95% e um erro de 0,08 para determinar a proporção da população de pacientes com líquen plano oral dentre os que possuem infecção crônica pelo vírus C na cidade de São Paulo (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Simulação do tamanho amostral para o cálculo da prevalência de pacientes com líquen plano oral dentre os que possuem infecção crônica pelo vírus C na cidade de São Paulo, com variação do Erro e da Confiança

Erro	Confiança	
	90%	95%
0,05	23	33
0,06	16	23
0,07	12	17
0,08	9	13
0,09	7	10
0,10	6	8

5.2 Métodos

Para facilitar a análise cada etapa desta metodologia será abordada em tópicos.

5.2.1 Análise morfológica

A análise morfológica dos casos deste trabalho foi feita a partir do estudo de cortes de 5µm de espessura, corados por hematoxilina e eosina, e observados ao microscópio de luz.

Os casos de líquen plano oral idiopáticos e associados ao vírus C foram classificados de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório (discreto, moderado, intenso), conforme critérios propostos por Nagao e colaboradores em 2000.⁽⁸⁾

5.2.2 Reações de imuno-histoquímica

Para o estudo imuno-histoquímico foi utilizado o método enzimático da estraptavidina-biotina e os cortes submetidos aos anticorpos anti-CD8 (clone C8/144, DAKO, Glostrup, Dinamarca) e anti-Foxp3 (clone 236/E7, Abcam).

A partir do material fixado em formol e embocado em parafina, foram obtidos cortes histológicos com 3 µm de espessura, dispostos em lâminas de vidro (26mm x 76mm), silanizadas comercialmente (Starfrost®).

Para dar início à reação, os cortes foram desparafinados em banhos de xilol, o primeiro em estufa a 60°C por 30 minutos e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos.

Na sequência, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanóis, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95% e 85% (4 minutos cada banho). Após a reidratação, foi realizada a remoção do pigmento formólico por meio de incubação em solução de hidróxido de amônio a 10% em solução alcoólica (etanol 95%) durante 10 minutos. Finalizada essa etapa, seguiu-se lavagem em água destilada e as lâminas receberam tratamento para recuperação antigênica e exposição dos epítomos.

Para ambos os anticorpos, o tratamento foi feito pela imersão em banho aquecido a 95°C por 30 minutos em uma solução de EDTA (1mM) que teve seu pH ajustado para 8,0 para o tratamento dos cortes que receberiam o anticorpo anti-CD8 e para 9,0 para o anticorpo anti-Foxp3.

Ao final do tratamento de recuperação, todos os cortes foram imediatamente lavados em água destilada por 10 minutos, para posterior bloqueio da peroxidase endógena tecidual. Esta etapa foi efetuada pela incubação dos cortes em dois banhos de 15 minutos cada, em solução 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol. Repetida a lavagem em água destilada, os cortes foram imersos em solução TRIS (50mM, NaCL 150 mM) pH 7,6 - solução tampão da reação - fazendo-se dois banhos de 10 minutos cada.

Neste momento foram realizadas as incubações dos anticorpos primários diluídos em tampão TRIS acrescidos de BSA (albumina bovina e azida sódica), por 18 horas a 4°C (CD8 – 1:100; Foxp3 – 1:200).

Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi utilizado o kit LSAB plus (DAKO). As reações foram reveladas pela diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+, K3468) em incubação de 10 minutos e, após lavagem com TRIS e água destilada para remoção de excessos, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer (12 minutos).

Desidratação em série crescente de etanóis seguida de diafanização em xilol e montagem permanente em *Permount* no aparelho *Tissue Tek®* SCA (Sakura) para microscopia, concluíram o preparo dos cortes que seguiram para análise em microscopia de luz.

Cortes de linfonodos reativos foram utilizados como controles positivos para as reações de imuno-histoquímica para as marcações dos anticorpos anti-CD8 e anti-Foxp3.

5.3 Análise dos resultados

A análise dos resultados foi realizada de forma quantitativa por meio da contagem de células positivas expressas por área em mm² em campos significativos e representativos de líquen plano oral. Logo, os cortes foram examinados e capturados em microscópio LEICA DM 2500 com uma câmera digital acoplada (LEICA DFC295) e a quantificação executada com o auxílio do software LAS V4.1 em aumento de 400X para o tecido conjuntivo e de 100X para o epitélio.

Para cada corte analisado foram realizadas duas contagens diferentes para a presença de células marcadas com os anticorpos anti-CD8 e anti-Foxp3, sendo 3 campos significativos no tecido conjuntivo e 1 campo no epitélio. Desta forma, para calcular o número de células positivas por área no tecido conjuntivo, dividiu-se a média de contagens de células pela média da área delimitada em cada caso.

5.4 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando o programa EpiInfo™, versão 3.4.3 de novembro de 2007 e o pacote estatístico Statistical Package for Social Sciences (versão 16.0).

Para testar a normalidade de dados foram utilizados os testes ANOVA e Shapiro-Wilk. Para variáveis sem distribuição normal foram aplicados os testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Para comparação entre frequências e proporções, foram utilizados os testes Exato de Fisher e Qui-quadrado. Para correlação de dados foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância foi estabelecido como 0,05 ou 5%.

As variáveis qualitativas foram representadas por frequência absoluta (n) e relativa (%) e as quantitativas por média, desvio padrão, mediana e valores mínimo e máximo.

6 RESULTADOS

Foram selecionados 13 blocos parafinados de líquen plano oral associado à infecção crônica de hepatite C e 23 de líquen plano oral idiopático. Como geralmente os fragmentos de tecido são pequenos, algumas amostras foram insuficientes para a análise. Assim, a avaliação das populações de células T CD8+ e Foxp3+ pode ser realizada em 11 blocos do Grupo 1 e 19 do Grupo 2.

Inicialmente foram analisados os dados do Grupo 1 (pacientes com líquen plano oral associado à infecção de hepatite C crônica), na sequência os dados do Grupo 2 (pacientes com líquen plano oral idiopático) e, por fim, os grupos foram comparados.

6.1 Análise do Grupo 1

Os dados demográficos dos pacientes do Grupo 1 são descritos na tabela 6.1.

Tabela 6.1 – Dados gerais do Grupo 1

Característica	Homens (N = 4)	Mulheres (N = 7)	Total (N = 11)
Idade			
Média	57,3	60	59
Variação	46-68	50-75	46-75
Cor da pele			
Leucoderma	3	6	9
Melanoderma	1	--	1
Feoderma	--	1	1
METAVIR			
F4	2	4	6
F3	2	2	4
F2	--	1	1
Genótipo			
1	3	5	8
2	--	1	1
3	--	1	1

6.1.1 Análise dos parâmetros clínicos e anátomo-patológicos do Grupo 1

Foram avaliados 11 casos de líquen plano oral associados à infecção crônica pelo vírus C que, para facilitar a análise, foram numerados em sequência de 1 a 11.

Os diagnósticos anátomo-patológicos foram efetuados segundo os critérios expostos na revisão de literatura.^(48,49,53) O quadro 6.1 expõe as informações referentes aos dados clínicos e à intensidade do infiltrado inflamatório de cada caso. Um infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário em banda esteve presente em todos os casos incluídos nesta pesquisa (100%), sendo que 2 (18%) pacientes foram classificados com infiltrado discreto, 4 (36%) infiltrado moderado e 5 (46%) pacientes com infiltrado inflamatório intenso.

No. Caso	Sexo*	CP**	Idade	Sítio lesional***	Forma Clínica	Infiltrado
1	M	L	51	Mucosa jugal	Erosivo	Intenso
2	F	L	75	Mucosa jugal	Atrófico	Intenso
3	M	M	64	Gengiva	Atrófico	Moderado
4	F	L	50	Mucosa jugal	Reticular	Discreto
5	F	L	58	Mucosa jugal	Atrófico	Intenso
6	F	F	65	Mucosa jugal	Reticular	Moderado
7	F	L	55	Mucosa jugal	Atrófico	Moderado
8	F	L	59	Mucosa jugal	Atrófico	Moderado
9	F	L	58	Mucosa jugal	Atrófico	Discreto
10	M	L	46	Mucosa jugal	Erosivo	Intenso
11	M	L	68	Mucosa jugal	Erosivo	Intenso

*Sexo: F: Feminino; M: Masculino;

**CP: Cor da pele; L: Leucoderma; M: melanoderma; F: Feoderma;

*** Sítio onde a biópsia foi realizada.

Quadro 6.1 – Dados clínicos e análise do infiltrado inflamatório do Grupo 1

6.1.2 Análise das populações CD8 e Foxp3 positivas no infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado ao vírus C

A densidade de células T positivas para os anticorpos anti-CD8 e anti-Foxp3 expressas no infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado à infecção crônica de hepatite C podem ser observadas no quadro 6.2. A proporção média entre a contagem de células T CD8 e Foxp3 positivas/mm² foi de 1,6:1. Análises sobre os valores mínimos e máximos de contagens, médias e medianas são descritos na sequência (Tabela 6.2).

No. Caso	CD8/mm2	Foxp3/mm2	Proporção
1	200,1	146,9	1,3:1
2	247,7	116,8	2,1:1
3	209,8	34,3	6,11:1
4	61,8	85,2	1:1,3
5	217,4	88,3	2,5:1
6	140,6	6,2	22,7:1
7	91,3	56,5	1,6:1
8	108,6	46,8	2,3:1
9	22,4	2,5	9:1
10	213,8	61,3	3,5:1
11	212,4	169,8	1,3:1

Quadro 6.2 – Densidade das populações celulares no infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado à infecção de hepatite C crônica

Tabela 6.2 – Mínimos, máximos, médias, medianas e desvios padrão das contagens de células T CD8+ e Foxp3+, com áreas de contagens e células por área no infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado ao vírus C

	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	DP*
CD8/mm²	13,1	224,6	119,9	102,5	55
Foxp3/ mm²	19,1	163,8	80,4	77,9	37,2

*DP: Desvio padrão.

Em 100% dos casos as marcações celulares foram dispersas ao longo do infiltrado inflamatório, localizado na região de lâmina própria. Mais além, o Coeficiente de Correlação de Spearman demonstra uma dependência média entre as variáveis ($[r] = 0,564$; $p = 0,071$), como demonstra o gráfico 6.1.

Gráfico 6.1 – Gráfico de dispersão da relação de células T CD8+/Foxp3+ no infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado ao vírus C

A partir desta análise primária, as contagens de linfócitos T CD8 e Foxp3 positivos/mm², presentes no infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado ao vírus C, foram correlacionadas aos dados demográficos (idade e sexo), padrão histopatológico e tipo clínico do líquen plano oral, padrão histológico hepático (METAVIR) e genótipo viral; na tentativa de identificar um padrão de resposta imune compartimentalizada. Nenhuma das análises apresentou significância.

6.1.3 Análise da exocitose de linfócitos T CD8 e Foxp3 positivos no líquen plano oral associado ao vírus C

Seguindo a mesma linha de raciocínio adotada para análise da imunofenotipagem de células T CD8 e Foxp3 positivas no infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado ao vírus C, padrões de exocitose também foram avaliados, conforme detalhamento do quadro 6.3.

No. Caso	CD8/mm2	Foxp3/mm2	Proporção
1	7,4	1,5	5:1
2	3,7	2,2	1,7:1
3	3,7	0,7	5,3:1
4	7,7	2,3	3,4:1
5	4,4	0	--
6	2,3	0,3	7,7:1
7	1,8	4,6	0,3:1
8	10,5	0	--
9	0,4	0	--
10	14,9	0	--
11	11,8	2,5	4,7:1

Quadro 6.3 – Densidade das populações celulares no epitélio do líquen plano oral associado à infecção de hepatite C crônica

Células marcadas com anticorpo anti-CD8, quando comparadas a células T Foxp3 positivas, apresentaram-se em uma proporção de 4,8:1 células por mm². Segundo o Coeficiente de Correlação de Spearman, os padrões de exocitose demonstraram uma fraca dependência com as densidades celulares presentes no infiltrado inflamatório (CD8: [r] = 0,364 e p = 0,270; Foxp3: [r] = 0,461 e p = 0,154), conforme exposto nos gráficos 6.2 e 6.3.

Gráfico 6.2 – Gráfico de dispersão correlacionando a densidade de células T CD8+ no infiltrado inflamatório e no epitélio do líquen plano oral associado ao vírus C

Gráfico 6.3 – Gráfico de dispersão correlacionando a densidade de células T Foxp3+ no infiltrado inflamatório e no epitélio do líquen plano oral associado ao vírus C

6.2 Análise do Grupo 2

As características demográficas dos pacientes do Grupo 2 são descritas na tabela 6.3.

Tabela 6.3 – Dados gerais do Grupo 2

Característica	Homens (N = 7)	Mulheres (N = 12)	Total (N = 19)
Idade			
Média	57,6	45,9	50,2
Variação	34-66	32-62	32-66
Cor da pele			
Leucoderma	5	12	17
Feoderma	2	--	2

6.2.1 Análise dos parâmetros clínicos e anátomo-patológicos do Grupo 2

Todos 19 casos analisados de líquen plano oral idiopáticos, apresentaram um infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário em banda (100%), dentre os quais 4 (21%) foram classificados com um infiltrado discreto, 11 (58%) com um infiltrado inflamatório moderado e 4 (21%) pacientes com um infiltrado inflamatório intenso. Os diagnósticos anátomo-patológicos foram efetuados segundo os critérios estabelecidos na revisão de literatura^(48,49,53) e o padrão do infiltrado detalhado em conjunto com os parâmetros clínicos deste grupo no quadro 6.4. Para facilitar a análise todos os casos foram numerados sequencialmente de 1 a 19.

No. Caso	S*	CP**	Idade	Sítio lesional***	Forma Clínica	Infiltrado
1	F	L	61	Mucosa jugal	Atrófico	Intenso
2	F	L	62	Mucosa jugal	Placa	Discreto
3	F	L	32	Mucosa Jugal	Reticular	Moderado
4	F	L	51	Mucosa jugal	Atrófico	Moderado
5	M	L	65	Mucosa jugal	Reticular	Moderado
6	F	L	50	Mucosa jugal	Atrófico	Moderado
7	F	L	32	Mucosa jugal	Erosivo	Moderado
8	M	L	66	Língua	Atrófico	Discreto
9	F	L	34	Mucosa jugal	Reticular	Discreto
10	F	L	51	Mucosa jugal	Erosivo	Intenso
11	F	L	44	Mucosa jugal	Reticular	Moderado
12	M	L	59	Mucosa jugal	Reticular	Moderado
13	F	L	35	Mucosa jugal	Atrófico	Discreto
14	F	L	45	Mucosa jugal	Atrófico	Moderado
15	M	L	53	Mucosa jugal	Erosivo	Discreto
15	M	L	66	Mucosa jugal	Reticular	Moderado
17	F	L	53	Mucosa jugal	Reticular	Discreto
18	M	F	34	Mucosa jugal	Reticular	Moderado
19	M	F	60	Mucosa jugal	Erosivo	Moderado

*Sexo: F: Feminino; M: Masculino

**CP: Cor da pele; L: Leucoderma; M: melanoderma; F: Feoderma

*** Sítio onde a biópsia foi realizada.

Quadro 6.4 – Dados clínicos e análise do infiltrado inflamatório do Grupo 2

6.2.2 Análise das populações CD8 e Foxp3 positivas no infiltrado inflamatório do líquen plano oral idiopático

O quadro 6.5 expõe os dados referentes ao fenótipo de populações celulares marcadas pela técnica de imuno-histoquímica para os anticorpos anti-CD8 e anti-Foxp3, complementada pela análise da densidade de células positivas no infiltrado inflamatório do líquen plano oral idiopático. A proporção média entre as contagens de células T CD8 e Foxp3 positivas/mm² foi de 1,5:1. Análises sobre os valores mínimos e máximos de contagens, médias e medianas são descritos na sequência (Tabela 6.4).

No. Caso	CD8/mm2	Foxp3/mm2	Proporção
1	204,8	163,8	1,2:1
2	78,1	19,2	4,1:1
3	122,7	101,7	1,2:1
4	96,0	104,6	0,9:1
5	157,4	47,1	3,4:1
6	166,1	76,4	2,2
7	82,6	60,1	1,4:1
8	63,1	27,1	2,3:1
9	13,1	38,0	0,3:1
10	70,9	142,9	0,5:1
11	137,4	105,2	1,3:1
12	109,1	88,5	1,2:1
13	166,7	78,0	2,2:1
14	95,0	111,5	0,8:1
15	85,9	90,5	0,9:1
16	209,1	62,9	3,3:1
17	141,9	93,1	1,5:2
18	224,6	53,3	4,2:1
19	87,6	65,4	1,4:1

Quadro 6.5 – Densidade das populações celulares no infiltrado inflamatório do líquen plano oral idiopático

Tabela 6.4 – Mínimos, máximos, médias, medianas e desvios padrão das contagens de células T CD8+ e Foxp3+, com áreas de contagens e células por área no infiltrado inflamatório do líquen plano oral idiopático

	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	DP*
CD8/mm2	22,4	247,7	156,9	200,1	75,5
Foxp3/mm2	2,5	169,8	74	61,3	54

*DP: Desvio padrão.

A relação entre células T CD8+ e Foxp3+ no Grupo 2 apresentou uma fraca dependência entre as variáveis (Coeficiente de Correlação de Spearman, $[r] = 0,200$; $p = 0,412$), conforme exposto no gráfico 6.4. Em 100% dos casos as marcações foram dispersas ao longo do infiltrado inflamatório, localizado na região de lâmina própria.

Gráfico 6.4 – Gráfico de dispersão da relação de células TCD8+/Foxp3+ no infiltrado inflamatório do líquen plano oral idiopático

Concluída esta etapa, as contagens de células T CD8 e Foxp3 positivas por mm^2 foram comparadas aos dados demográficos, padrão histopatológico do infiltrado inflamatório e tipo clínico do líquen plano oral, semelhante à análise efetuada no Grupo 1. Nenhuma das análises apresentou significância.

6.2.3 Análise da exocitose de linfócitos T CD8 e Foxp3 positivos no líquen plano oral idiopático

A análise dos padrões de exocitose de células marcadas pelos anticorpos anti-CD8 e anti-Foxp3 no grupo controle é exposto no quadro 6.6.

No. Caso	CD8/mm2	Foxp3/mm2	Proporção
1	13,7	2,9	4,7:1
2	3,5	0	--
3	5,9	1,9	3,1:1
4	7,1	2,6	2,8:1
5	4,2	2,8	1,5:1
6	3	0,6	5:1
7	1	0	--
8	2,2	0,8	2,6:1
9	0,4	0	--
10	1,1	0	--
11	6,4	1,9	3,4
12	12,4	1,2	10,4:1
13	14,2	1,3	10,9:1
14	2,9	2,7	1,1:1
15	1,6	1,2	1,4:1
16	3,5	2,6	1,4:1
17	11,5	3,1	3,1:1
18	4	0	--
19	1,2	0,4	3:1

Quadro 6.6 – Densidade das populações celulares no epitélio do líquen plano oral idiopático

Células marcadas com o anticorpo anti-CD8, quando comparadas a células T Foxp3 positivas, apresentaram-se em uma proporção de 59,4:1 células por mm². Segundo o Coeficiente de Correlação de Spearman, padrões de exocitose apresentam uma variação moderada em relação às densidades no infiltrado inflamatório, para ambos os grupos celulares (CD8: [r] 0,677 – p 0,001; Foxp3: [r] 0,642 - p 0,003), conforme exposto nos gráficos 6.5 e 6.6.

Gráfico 6.5 – Gráfico de dispersão correlacionando a densidade de células T CD8+ no infiltrado inflamatório e no epitélio do líquen plano oral idiopático

Gráfico 6.6 – Gráfico de dispersão correlacionando a densidade de células T Fxp3+ no infiltrado inflamatório e no epitélio do líquen plano oral idiopático

6.3 Comparação dos resultados entre os Grupos 1 e 2

Os casos do Grupo 1 e do Grupo 2 foram avaliados em conjunto, para o pareamento das características clínicas e demográficas, conforme tabela 6.5.

Tabela 6.5 – Comparação entre os dados demográficos dos Grupos 1 e 2

	Média de Idade	Variação	Cor da pele			Forma clínica	
			Leuco*	Melano**	Feo***	Reticular/Placa	Atrófico/Erosivo
GRUPO 1							
Homens	57,3	46-68	3	1	--	4	
Mulheres	60	50-75	6	--	1	5	
Total	59	46-75	9	1	1	9	
Grupo 2							
Homens	57,6	34-66	5	--	2	3	
Mulheres	45,9	32-62	12	--	--	7	
Total	50,2	32-66	17	--	2	10	
Kruskal-Wallis (p)	0,101	--	0,609		0,116		

*Leuco: Leucoderma, **Melano: Melanoderma; *** Feo: Feoderma.

A densidade de linfócitos T CD8 e Foxp3 positivos presentes no Grupo 1 foi comparada ao Grupo 2 (Tabela 6.6). A análise estatística adotada não apontou significância quando os grupos foram comparados.

Tabela 6.6– Comparação entre as populações celulares dos Grupos 1 e 2

GRUPO	ANÁLISE	CD8/mm ²	FOXP3/mm ²	CD8/FOXP3 mm ²
Grupo 1 (N** = 11)	Média	156,9/mm ²	74,1/mm ²	4,8/mm ²
	DP*	75,5	54,0	6,4
	Mediana	200,1	61,3	2,3
	Mínimo	22,4	2,5	0,7
	Máximo	247,7	169,8	22,7
Grupo 2 (N** = 19)	Média	121,7/mm ²	80,5/mm ²	1,8/mm ²
	DP*	56,0	37,2	1,6
	Mediana	109,1	78,0	1,3
	Mínimo	13,1	19,2	0,4
	Máximo	224,6	163,8	4,2
Kruskal-Wallis (p)		0,162	0,533	0,068

*DP é o desvio padrão; **N representa o número de casos e controles.

A intensidade de infiltrado inflamatório, classificada em discreto, moderado e intenso, também não apresentou valores estatisticamente significantes quando os grupos foram comparados (Kruskal-wallis). Porém os valores relativos foram diferentes no grupo 1 (discreto=18%, moderado=36,4%, intenso=45,5%) e no grupo 2 (discreto=21,1%, moderado=57,9%, intenso=21,1%).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na distribuição de células T marcadas pelos anticorpos anti-CD8 e anti-Foxp3 ao longo do infiltrado inflamatório, localizado na região de lâmina própria. O Coeficiente de Correlação de Spearman demonstra uma fraca dependência entre as variáveis ([r] = 0,300; p = 0,107) como demonstra o gráfico 6.7.

Gráfico 6.7 – Gráfico de dispersão da correlação de células T CD8+ e Foxp3+ no infiltrado inflamatório dos Grupos 1 e 2

Fatores como idade, sexo e cor da pele, não influenciam a relação entre as contagens de células T CD8/Foxp3 positivas por mm^2 (Mann-Whitney test; valores não significativos).

Por outro lado, quando a densidade de células no infiltrado inflamatório é correlacionada a forma clínica lesional de cada grupo, a relação de linfócitos T CD8/Foxp3 por mm^2 (Kruskal-Wallis test; p 0,018) e as contagens de células T CD8 por mm^2 (Kruskal-Wallis test; p 0,034) demonstram ser maiores no Grupo 1 para lesões classificadas como atróficas/erosivas (Tabela 6.7).

A figura 6.1 ilustra as marcações imuno-histoquímicas para os anticorpos anti-CD8 e anti-Foxp3 em ambos os grupos.

Tabela 6.7 - Comparação entre as populações celulares dos Grupos 1 e 2 segundo tipo clínico

TIPO CLINICO atrófico/erosivo	GRUPO 1	GRUPO 2	P*
CD8/mm²	Mínimo – 22,4 Máximo – 247,7 Média – 169,3 Mediana – 209,8 DP - 76,0	Mínimo – 63,1 Máximo – 204,8 Média – 111,9 Mediana – 91,3 DP - 48,7	0,034
Foxp3/mm²	Mínimo – 2,5 Máximo – 169,8 Média – 80,4 Mediana – 61,3 DP - 54,9	Mínimo – 27,1 Máximo – 163,8 Média – 92,1 Mediana – 84,3 DP - 40,7	0,514
CD8/Foxp3 mm²	Mínimo – 1,3 Máximo – 9,0 Média – 3,3 Mediana – 2,3 DP - 2,6	Mínimo – 0,5 Máximo – 2,3 Média – 1,4 Mediana – 1,3 DP - 0,7	0,018
TIPO CLINICO Reticular/placa	GRUPO 1	GRUPO 2	P*
CD8/mm²	Mínimo – 61,8 Máximo – 140,6 Média – 101,2 Mediana – 101,2 DP - 55,7	Mínimo – 13,1 Máximo – 224,6 Média – 132,6 Mediana – 137,4 DP - 64,2	0,480
FoxP3/mm²	Mínimo – 6,2 Máximo – 85,2 Média – 45,7 Mediana – 45,7 DP - 55,9	Mínimo – 19,2 Máximo – 105,2 Média – 67,7 Mediana – 62,9 DP - 30,7	0,346
CD8/FoxP3 mm²	Mínimo – 0,7 Máximo – 22,7 Média – 11,7 Mediana – 11,7 DP - 15,5225	Mínimo – 0,35 Máximo – 4,2 Média – 2,3 Mediana – 1,5 DP - 1,5	0,814

*Kruskal-Wallis (p).

Dados adicionais foram obtidos por meio da análise de exocitose e são expostos na tabela 6.8. Visualmente a exocitose de linfócitos T CD8+ foi concentrada próximo à regiões de apagamento da camada basal. Nenhuma diferença marcante inter-grupos pode ser observada em relação à esta análise.

O Coeficiente de Correlação de Spearman demonstra uma fraca dependência entre as densidades de células T CD8+ e Foxp3+ presentes no epitélio ($[r] = 0,339$; $p = 0,067$), quando os grupos foram comparados (Gráfico 6.8). As contagens de

células T CD8+ e Foxp3+ no infiltrado inflamatório das lesões também não influencia a presença intraepitelial destas populações em ambos os grupos estudados (Mann-Whitney test; valores não significativos).

Tabela 6.8 – Mínimos, máximos, médias, medianas e desvios padrão das contagens de células T CD8+ e Foxp3+, com áreas de contagens e células por área no epitélio

EPITÉLIO	GRUPO 1	GRUPO 2	P*
CD8/mm²	Mínimo – 0,4 Máximo – 14,9 Média – 6,3 Mediana – 4,4 DP** - 4,6	Mínimo – 0,4 Máximo – 14,2 Média – 5,3 Mediana – 3,5 DP** - 4,5	0,414
FoxP3/mm²	Mínimo – 0 Máximo – 4,6 Média – 1,3 Mediana – 0,7 DP** - 1,5	Mínimo – 0 Máximo – 3,1 Média – 1,4 Mediana – 1,2 DP** - 1,6	0,556
CD8/FoxP3 mm²	Mínimo – 0,3913 Máximo – 7,7 Média – 4,0 Mediana – 4,7 DP** - 2,4	Mínimo – 1,0 Máximo – 10,9 Média – 3,9 Mediana – 3,1 DP** - 3,1	0,551

*Kruskal – Wallis (p); **DP: Desvio padrão.

Gráfico 6.8 – Gráfico de dispersão da correlação de células T CD8+ e Foxp3+ no epitélio dos Grupos 1 e 2

Figura 6.1 – Marcação imuno-histoquímica para CD8 e Foxp3. A) Positividade para CD8 no Grupo 1 (100x no original e 400x no detalhe da imagem); B) Células positivas para CD8 no Grupo 2 (100x); C) Foxp3 presente no núcleo de linfócitos no Grupo 1 (100x e 400x no detalhe da imagem); D) Positividade nuclear para Foxp3 no Grupo 2 (100x). Estreptavidina biotina

7 DISCUSSÃO

A principal consequência da infecção crônica de hepatite C é o comprometimento do fígado, entretanto o relato na literatura de diversas manifestações extra-hepáticas sugere que a infecção deva ser abordada como uma doença sistêmica multifacetada.^(12,23,24,42-46)

Seria a infecção de hepatite C, por si só, um fator patogênico determinante para o desenvolvimento de líquen plano? Alguns pesquisadores acreditam nesta teoria, porém, evidências científicas que detalham o comportamento biológico viral em relação ao líquen plano oral falham em comprovar esta hipótese.^(8,9,58,59)

Nossa curiosidade sobre o tema começou após a realização de um levantamento epidemiológico de diversos estudos efetuados no Brasil e no mundo, cuja análise demonstrou resultados heterogêneos sobre a associação.⁽⁵⁾

As variações geográficas, os critérios diagnósticos, tanto para o líquen plano quanto para a infecção de hepatite C, e o próprio desenho dos estudos epidemiológicos contribuem com a gama de resultados exibidos, mesmo assim a literatura científica confirma a forte associação entre o líquen plano e a infecção crônica de hepatite C.^(2,4)

A partir dessa análise primária, decidimos avaliar uma nova casuística pela realização de um estudo epidemiológico próprio.⁽⁶⁾ Observamos que os pacientes com diagnóstico de líquen plano oral do tipo atrófico/erosivo associado ao vírus C, por vezes apresentavam manifestações clínicas atípicas, com um quadro clínico exacerbado e com respostas pioradas à terapêutica proposta.^(6,7)

Frente a essa observação, passamos a questionar se o líquen plano oral associado à infecção crônica de hepatite C poderia ser considerado uma doença diferente do líquen plano oral idiopático ou, pelo menos, apresentar características imunológicas diferenciadas que justificassem as discrepâncias percebidas em nossa amostra.

Instigados por esses dados, houve neste estudo a proposta de se avaliar o infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado à infecção crônica de hepatite C, pela marcação de populações celulares T CD8+ e Foxp3+, comparando-as às populações do líquen plano oral idiopático.

A análise dos resultados não verificou diferenças estatísticas entre os grupos com relação à quantidade das populações celulares estudadas, porém evidencia algumas particularidades que podem responder alguns de nossos questionamentos.

De acordo com nosso estudo, quando as contagens de células T CD8 positivas por mm^2 foram correlacionadas à forma clínica lesional, verificamos que lesões atróficas/erosivas de líquen plano oral associadas ao vírus C (Grupo 1) apresentavam uma densidade maior de linfócitos T CD8+ comparadas às lesões de líquen plano oral idiopático (Grupo 2).

Este resultado nos parece bastante interessante, e acaba por fundamentar o caráter clínico exacerbado apresentado por estas lesões em nossa casuística.^(6,7)

A relação entre as densidades de células T CD8+/Foxp3+ também foi maior para as formas clínicas atróficas/erosivas de líquen associadas ao vírus C (Grupo 1).

O envolvimento de linfócitos T Foxp3+ na patogênese do líquen plano oral idiopático já foi tema de análise na literatura. Tao e colaboradores encontraram uma relação inversa entre as contagens de células T Foxp3+ e a forma clínica do líquen plano oral, na qual os tipos reticulares/hiperqueratóticos apresentaram uma quantidade maior de células T Foxp3+ comparados às formas clínicas erosivas/eritematosas.⁽⁵⁵⁾

Em oposição, estudos que investigam o papel de células T Foxp3+ no contexto de outras doenças, encontraram uma alta frequência desta população celular específica em estágios mais ativos da enfermidade. Como no caso de pacientes com infecção de hepatite C crônica que apresentam altas quantidades de células T CD8+ e Foxp3+ em estágios avançados de fibrose hepática.⁽⁶³⁾

Apesar de não encontrar resultados estatisticamente significantes, um grupo de pesquisadores brasileiros também correlacionou as altas contagens de células T Foxp3+ às formas clínicas mais severas (erosivo) de líquen plano oral idiopático. Segundo os autores, a alta atividade da doença pode induzir o aumento de populações regulatórias com o intuito de controlar uma resposta imune exacerbada.⁽⁶⁴⁾

Em nosso estudo, a média de células T Foxp3+/ mm^2 foi maior para os tipos clínicos de líquen plano oral classificados como atróficos/erosivos nos Grupos 1 e 2 em relação as formas reticular/placa, embora o dado não tenha sido estatisticamente significativo.

Neste sentido, talvez a proposta ideal para a análise da correlação entre linfócitos T Foxp3+ e a forma clínica do líquen plano oral deva ser embasada pela relação CD8+/Foxp3+, visto que a presença e função de células T Foxp3+ é destinada a modular a atividade de células T CD8+,^(34,36,37) responsáveis pelo aparecimento de lesões de líquen plano oral.^(47,48,52)

Outro fator importante diz respeito ao número limitado de amostras incluídas nesta e em outras pesquisas que tentaram correlacionar a quantidade de células T Foxp3+ à forma clínica do líquen plano oral idiopático.^(55,64)

Por se tratar de uma lesão relativamente rara, o número reduzido de exemplares do Grupo 1, especialmente da forma reticular/placa, dificultou a análise estatística dos nossos resultados, sem comprometê-los. Contudo, acreditamos que essa seja uma dificuldade enfrentada por todos os autores que trabalham com esse tipo de lesão.

Nenhuma das análises efetuadas neste estudo constatou uma forte relação de dependência entre as variações de linfócitos T CD8+ e Foxp3+ no infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado ao vírus C (Grupo 1) e no líquen plano idiopático (Grupo 2).

Esta não foi a primeira vez que estudos comparativos analisaram a patogênese do líquen plano oral associado ao vírus C em relação ao líquen plano oral idiopático.^(8,65,66)

Mega e colaboradores afirmam que às lesões associadas ao vírus C apresentam uma distribuição espacial distinta de linfócitos T CD8+, com uma proporção maior de células ao longo do infiltrado na região de lâmina própria, comparadas as lesões de líquen plano oral idiopático.⁽⁶⁵⁾ Contudo, alguns tópicos abordados pelos autores poderiam ser interpretados como possíveis vieses. Primeiro, para os sítios de biópsia selecionados foram excluídas áreas erosivas/ulceradas a fim de evitar modificação histológica do espécime; e segundo, quatro dos pacientes com diagnóstico de líquen plano oral associado ao vírus C desenvolveram as lesões bucais logo após o início da terapia com interferon.

Por se tratar de uma doença polimorfa, inúmeros autores citam na literatura a dificuldade diagnóstica, clínica e histopatológica, do líquen plano oral idiopático e associado ao vírus C.^(48–50,52,53,65) Um relato ilustra o desenvolvimento de lesões bucais, após o início da terapia com interferon, em um paciente com infecção crônica de hepatite C. Vários sítios intra-orais foram afetados, e após o exame

clínico e histopatológico, o diagnóstico final de reação liquenoide por uso de drogas foi efetuado. Todas as lesões desapareceram após a suspensão do uso da medicação.⁽⁶⁷⁾ Por definição, lesões associadas ao uso de medicações são classificadas como reações liquenoides e não devem ser confundidas com o líquen plano oral.

Com a finalidade de evitar erros diagnósticos para lesões de líquen plano oral idiopáticas e associadas ao vírus C incluídas nesta pesquisa, foram excluídas deste estudo amostras com suspeita clínica de reações liquenoides por contato a materiais restauradores ou por uso de drogas.⁽⁶⁾

De acordo com nossa análise, a intensidade do infiltrado inflamatório mostrou-se mais intensa em números relativos no líquen plano associado à hepatite C, ainda que os dados não tenham sido estatisticamente significantes.

Estudos preliminares não encontraram diferenças na severidade do infiltrado inflamatório de pacientes com líquen plano oral idiopático e com hepatite C.^(8,66) Alguns autores chamam a atenção para a profundidade do infiltrado inflamatório de lesões associadas ao vírus C, embora a característica não pareça homogênea para todos os casos.⁽⁶⁵⁾

Ainda que as lesões de líquen plano oral idiopáticas sejam mais frequentes na população em geral do que as lesões de líquen associadas ao vírus C, dois dos estudos comparativos incluídos nesta discussão apresentam um número maior de casos de líquen associados à infecção crônica de hepatite C.^(8,65)

Talvez o dado observado não seja relevante, ou porventura a região geográfica (Japão) em que ambos os estudos foram realizados, contribua com esta particularidade.

Análises adicionais realizadas nesta pesquisa fornecem informações sobre os padrões de exocitose, independente da forma clínica lesional. Células marcadas com o anticorpo anti-CD8 no infiltrado inflamatório do líquen plano oral, migram em direção ao epitélio em uma proporção maior quando comparadas às populações de células T Foxp3+, em ambos os grupos incluídos nesta pesquisa.

Visualmente a exocitose de linfócitos T CD8+ foi concentrada próximo a regiões de apagamento da camada basal. Nenhuma diferença marcante inter-grupos pode ser observada em relação a esta análise.

Segundo a literatura, a migração epitelial de células T CD8+ é especialmente alta em regiões de ruptura da camada basal comparadas às regiões de continuidade do epitélio.⁽⁶⁸⁾

A exocitose de células T Foxp3 apresentou-se menor do que a de células T CD8+. Se considerarmos que populações de linfócitos T CD4+ incluem linfócitos T regulatórios Foxp3+,^(34,36,37) o baixo padrão de exocitose verificado em nossa análise era esperado e também é semelhante aos encontrados em outras publicações.^(53,68)

Da mesma forma que ocorre no infiltrado, a fraca dependência entre as variações de células T CD8+ e Foxp3+ foi verificada no epitélio quando os Grupos 1 e 2 foram comparados.

Inúmeros estudos tentaram identificar diferenças na patogênese do líquen plano oral associado à infecção crônica de hepatite C em relação ao líquen plano oral idiopático, que justifiquem o aparecimento de lesões nesta população.^(8,9,11,58,59,65,69)

O conhecimento adquirido até o momento nos permite afirmar que a replicação viral suportada por queratinócitos não é suficiente para o desenvolvimento de lesões em pacientes com infecção crônica pelo vírus C,^(9,11,58,70) mesmo que atraia ao sítio lesional uma subpopulação linfocitária vírus C específica;⁽⁵⁹⁾ posto que a presença do vírus também foi verificada em amostras de epitélio oral sadio de indivíduos com infecção crônica.^(9,70)

Talvez o líquen plano oral associado à infecção crônica de hepatite C apresente mecanismos patogênicos distintos daqueles sabidamente conhecidos para outras manifestações, e que culminam com um quadro clínico piorado da doença. Por exemplo, no caso da crioglobulinemia mista associada ao vírus C, a comprovada infecção, ou estimulação crônica de linfócitos B, induz à expansão clonal e consequente formação de imunocomplexos circulantes, capazes de aderir à parede dos vasos, ocasionando uma série de sinais e sintomas característicos da desordem. De fato, o comprovado linfotropismo viral, seja na forma de infecção e/ou estimulação, suporta a relação causa/efeito para a crioglobulinemia mista associada ao vírus C.^(20,21,23,45)

Segundo Abbas, a resposta imune humana não pode ser definida como um evento único,

[...] imunidade significa proteção contra doenças, em particular contra doenças infecciosas. As células e moléculas responsáveis pela imunidade formam o

sistema imune, e a sua resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas é chamada de resposta imunológica. Além disso, os mecanismos que normalmente protegem os indivíduos das infecções e eliminam substâncias estranhas são, por si só, capazes de causar dano tecidual e doenças em algumas situações. [...].^(29, p.3)

Dentro deste conceito, estudos sobre imunologia questionam se respostas imunes antivirais poderiam guiar processos autorreativos. Hipotetiza-se que o reconhecimento de patógenos por parte do sistema imune possa resultar na ativação cruzada de células T autorreativas, capazes de desencadear, ou acelerar, processos autoimunes em diferentes órgãos e tecidos. Outra teoria seria a de que células apresentadoras de antígenos seriam ativadas nos arredores do processo inflamatório infeccioso, e que assim passariam a estimular a ativação e proliferação de células T autorreativas por um mecanismo semelhante.⁽⁷¹⁾

Todo este processo é possível visto que receptores de células T são capazes de reconhecer uma ampla variedade de peptídeos próprios e estranhos ao organismo.⁽²⁹⁾ Além do mais, nenhum dos mecanismos acima propostos exclui a possibilidade da doença autoimune ocorrer espacialmente distante do sítio inicial de infecção. Entretanto poucos modelos animais permitem o estudo e a comprovação deste aspecto em particular.⁽⁷¹⁾

Como se vê, estabelecer a relação causa/efeito entre infecção de hepatite C crônica e o desenvolvimento de líquen plano oral não é uma tarefa fácil.

Em uma análise multivariável, três fatores de risco majoritários são relacionados à presença clínica ou biológica de manifestações extra-hepáticas associadas ao vírus C, sendo estas a idade avançada, o sexo feminino e o estágio avançado de fibrose hepática.^(12,24,42,43)

Se levarmos em consideração apenas estes fatores de risco majoritários, verificamos neste estudo que os pacientes do Grupo 1 são potenciais “desenvolvedores” de qualquer tipo de manifestação extra-hepática, além do líquen plano oral. Dos 11 (100%) indivíduos avaliados no Grupo 1, todos tinham idade avançada, acima dos 40 anos. Mais da metade desta amostra era do sexo feminino (64%), e 91% dos pacientes (10 indivíduos) avaliados apresentavam estágios avançados de fibrose hepática.

Embora esses dados sejam consistentes com a literatura científica,^(12,24,42,43) dentro da metodologia utilizada, não demonstram relação alguma com o aparecimento ou exacerbação de lesões de líquen plano oral associadas ao vírus C.

De acordo com nossa análise, o genótipo viral também não apresenta qualquer relação com a patogênese do líquen plano oral associado ao vírus C (Grupo 1).

Se considerarmos que no Brasil há o predomínio do genótipo 1, seguido pelos genótipos 3 e 2 respectivamente,⁽⁷²⁾ nada mais natural que a maior parte dos indivíduos incluídos neste estudo esteja contaminada por este genótipo.

Talvez a heterogeneidade genética populacional influencie tanto o desenvolvimento de líquen plano oral idiopático (HLA-DR1/DRB1*0101) quanto o de líquen plano oral associado ao vírus C (HLA-DR6).^(10,69,73) Nesse quesito, novos estudos brasileiros podem responder de que forma a alta miscigenação da nossa população influencia estes resultados.

Iniciamos esta pesquisa por acreditar que o líquen plano oral associado ao vírus C pudesse ser uma doença diferente e, conseqüentemente, apresentar uma qualidade/quantidade de infiltrado inflamatório diferente daquela observada no líquen plano oral idiopático. Contudo, verificamos que ambas as lesões apresentam frequências similares de células T CD8+ e Foxp3+, porém com algumas particularidades que fundamentam as diferenças clínicas observadas em nossos pacientes.

Talvez ao longo de todos esses anos estivemos analisando a mesma doença “líquen plano” em contextos diferentes, sem nenhuma relação causa/efeito específica de etiopatogênese para sua manifestação em pacientes com infecção crônica pelo vírus C. Por outro lado, esta relação de causa/efeito parece existir quando avaliamos as características e o comportamento clínico de lesões associadas ao vírus C.

Fica claro que os resultados acima descritos contribuem para o nosso amadurecimento e, sobretudo, entendimento da patogenia do líquen plano oral associado à infecção crônica pelo vírus C. Certamente as conclusões aqui obtidas não são respostas plenas, apenas hipóteses frente aos resultados obtidos por esta linha de pesquisa.

8 CONCLUSÕES

Com base na casuística estudada, conclui-se sobre o infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado à infecção crônica de hepatite C:

- Há ausência de correlações estatisticamente significantes entre contagens de células T CD8+ e Foxp3+ expressas no infiltrado inflamatório do líquen plano oral associado ao vírus C (Grupo 1) e no líquen plano oral idiopático (Grupo 2).
- Existe uma maior densidade de linfócitos T CD8+ no infiltrado inflamatório de lesões atróficas/erosivas no líquen plano associado ao vírus C quando comparado as lesões de líquen plano oral idiopático.
- Há uma maior densidade na relação CD8/Foxp3+ no infiltrado inflamatório de lesões atróficas/erosivas no líquen plano associado ao vírus C com relação ao líquen plano oral idiopático.

Referências¹

1. Baccaglini L, Thongprasom K, Carrozzo M, Bigby M. Urban legends series: lichen planus. *Oral diseases*. 2012 Jun 6;1–16.
2. Lodi G, Pellicano R, Carrozzo M. Hepatitis C virus infection and lichen planus: a systematic review with meta-analysis. *Oral diseases*. 2010 Oct;16(7):601–12.
3. Petti S, Rabiei M, De Luca M, Scully C. The magnitude of the association between hepatitis C virus infection and oral lichen planus: meta-analysis and case control study. *Odontology / the Society of the Nippon Dental University*. 2011 Jul;99(2):168–78.
4. Shengyuan L, Songpo Y, Wen W, Wenjing T, Haitao Z, Binyou W. Hepatitis C virus and lichen planus: a reciprocal association determined by a meta-analysis. *Archives of Dermatology*. 2009 Sep;145(9):1040–7.
5. Camargo A, Ortega KL. Análise sobre a associação entre a hepatite C e líquen plano [monografia apresentada ao curso de especialização em Odontologia para Pacientes Portadores de Necessidades Especiais]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2007.
6. Camargo A, Lemos-Júnior CA. Análise do líquen plano oral associado a hepatite C [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2010.
7. Martins GJP, Meurer MI, Grando LJ. Características clínicas dos pacientes com Hepatite C e Líquen plano bucal do Ambulatório de Hepatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina [dissertação de mestrado]. Santa Catarina: Universidade Federal; 2012.
8. Nagao Y, Sata M, Kage M, Kameyama T, Ueno T. Histopathological and immunohistochemical study of oral lichen planus-associated HCV infection. *European Journal of Internal Medicine*. 2000 Oct;11(5):277–82.

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

9. Arrieta JJ, Rodriguez-Inigo E, Casqueiro M, Bartolomé J, Manzarbeitia F, Herrero M, et al. Detection of hepatitis C virus replication by In situ hybridization in epithelial cells of anti-hepatitis C virus-positive patients with and without oral lichen planus. *Hepatology* (Baltimore, Md.). 2000 Jul;32(1):97–103.
10. Carrozzo M, Brancatello F, Dametto E, Arduino P, Pentenero M, Rendine S, et al. Hepatitis C virus-associated oral lichen planus: is the geographical heterogeneity related to HLA-DR6? *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2005 Apr;34(4):204–8.
11. Nagao Y, Sata M, Noguchi S, Seno'o T, Kinoshita M, Kameyama T, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in oral lichen planus and oral cancer tissues. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2000 Jul;29(6):259–66.
12. Dustin LB, Rice CM. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annual Review of Immunology*. 2007 Jan;25:71–99.
13. Diepolder HM. New insights into the immunopathogenesis of chronic hepatitis C. *Antiviral Research*. 2009 Jun;82(3):103–9.
14. Brasil. Ministério da Saúde. [citado 26 agos 2012]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_hepatite_c.pdf.
15. Focaccia R, Da Conceição OJ, Sette H, Sabino E, Bassit L, Nitrini D, et al. Estimated Prevalence of Viral Hepatitis in the General Population of the Municipality of São Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 1998 Dec;2(6):269–84.
16. Thimme R, Binder M, Bartenschlager R. Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. *FEMS Microbiology Reviews*. 2012 May;36(3):663–83.
17. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 1997 Mar 22;349(9055):825–32.
18. Veronesi-Focaccia. *Tratado de infectologia*. 4a. ed. São Paulo: Atheneu; 2010. p. 535–40.

19. Giannini C, Bréchet C. Hepatitis C virus biology. *Cell Death and Differentiation*. 2003 Jan;10 Suppl 1:S27–38.
20. Ferri C, Monti M, La Civita L, Longombardo G, Greco F, Pasero G, et al. Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia. *Blood*. 1993 Dec 15;82(12):3701–4.
21. Zignego AL, Giannini C, Gragnani L. HCV and lymphoproliferation. *Clinical & Developmental Immunology*. 2012 Jan;2012:980942.
22. Revie D, Salahuddin SZ. Human cell types important for hepatitis C virus replication in vivo and in vitro: old assertions and current evidence. *Virology Journal*. 2011 Jan;8:346.
23. Jacobson IM, Cacoub P, Dal Maso L, Harrison SA, Younossi ZM. Manifestations of chronic hepatitis C virus infection beyond the liver. *Clinical gastroenterology and hepatology*. 2010 Dec;8(12):1017–29.
24. Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, Cohen P, Louri I, Loustaud-Ratti V, et al. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. The GERMIVIC. Groupe d'Etude et de Recherche en Medecine Interne et Maladies Infectieuses sur le Virus de l'Hepate C. *Medicine*. 2000 Jan;79(1):47–56.
25. Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009 Jul;119(7):1745–54.
26. Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*. 2001 Aug;75(15):7059–66.
27. Taylor DR, Shi ST, Lai MM. Hepatitis C virus and interferon resistance. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2000 Nov;2(14):1743–56.
28. Rehermann B. Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. *Seminars in Liver Disease*. 2000 Jan;20(2):127–41.
29. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.

30. Pawlotsky J-M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends in Microbiology*. 2004 Feb;12(2):96–102.
31. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T, et al. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2004 Nov 15;173(10):6072–81.
32. Cox AL, Mosbruger T, Mao Q, Liu Z, Wang X-H, Yang H-C, et al. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005 Jun 6;201(11):1741–52.
33. Radziewicz H, Ibegbu CC, Hon H, Osborn MK, Obideen K, Wehbi M, et al. Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific effector CD8+ T cells undergo massive apoptosis in the peripheral blood during acute HCV infection and in the liver during the chronic phase of infection. *Journal of Virology*. 2008 Oct;82(20):9808–22.
34. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International Immunology*. 1998 Dec;10(12):1969–80.
35. Rouse BT, Sarangi PP, Suvas S. Regulatory T cells in virus infections. *Immunological Reviews*. 2006 Aug;212:272–86.
36. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008 May 30;133(5):775–87.
37. Sakaguchi S. Regulatory T cells in the past and for the future. *European Journal of Immunology*. 2008 Apr;38(4):901–37.
38. Manigold T, Racanelli V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *The Lancet Infectious Diseases*. 2007 Dec;7(12):804–13.
39. Smyk-Pearson S, Golden-Mason L, Klarquist J, Burton JR, Tester IA, Wang CC, et al. Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008 Jan 1;197(1):46–57.

40. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, et al. T Cells with a CD4⁺ CD25⁺ Regulatory Phenotype Suppress In Vitro Proliferation of Virus-Specific CD8⁺ T Cells during Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology*. 2005;79(12):7860–7.
41. Rushbrook SM, Ward SM, Unitt E, Vowler SL, Lucas M, Klenerman P, et al. Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8⁺ T cells during persistent hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*. 2005 Jun;79(12):7852–9.
42. Ko HM, Hernandez-Prera JC, Zhu H, Dikman SH, Sidhu HK, Ward SC, et al. Morphologic features of extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *Clinical & Developmental Immunology*. 2012 Jan;2012:740138.
43. Cacoub P, Poynard T, Ghillani P, Charlotte F, Olivi M, Piette JC, et al. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. Multidepartment Virus C. *Arthritis and Rheumatism*. 1999 Oct;42(10):2204–12.
44. Dal Maso L, Franceschi S. Hepatitis C virus and risk of lymphoma and other lymphoid neoplasms: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 2006 Nov;15(11):2078–85.
45. Schamberg NJ, Lake-Bakaar G V. Hepatitis C Virus-related Mixed Cryoglobulinemia: Pathogenesis, Clinical Manifestations, and New Therapies. *Gastroenterology & Hepatology*. 2007 Sep;3(9):695–703.
46. Anderson LA, Engels EA. Hepatitis C virus infection and non-Hodgkin lymphoma: interesting association or causal relationship? *International journal of cancer. Journal International du Cancer*. 2008 Apr 15;122(8):x–xii.
47. Scully C, Carrozzo M. Oral mucosal disease: Lichen planus. *The British journal of Oral & Maxillofacial Surgery*. 2008 Jan;46(1):15–21.
48. Sugerman PB, Savage NW. Oral lichen planus: causes, diagnosis and management. *Australian Dental Journal*. 2002 Dec;47(4):290–7.
49. Eversole LR. Immunopathogenesis of oral lichen planus and recurrent aphthous stomatitis. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. 1997 Dec;16(4):284–94.
50. Carrozzo M, Thorpe R. Oral lichen planus: a review. *Minerva Stomatologica*. 2009 Oct;58(10):519–37.

51. Nico MM, Fernades JD, Lourenço SV. Oral lichen planus. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2011;86(4):633–41.
52. Rad M, Hashemipoor MA, Mojtahedi A, Zarei MR, Chamani G, Kakoei S, et al. Correlation between clinical and histopathologic diagnoses of oral lichen planus based on modified WHO diagnostic criteria. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 2009 Jun;107(6):796–800.
53. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, et al. The pathogenesis of oral lichen planus. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 2002 Jan;13(4):350–65.
54. Scully C, Beyli M, Ferreiro MC, Ficarra G, Gill Y, Griffiths M, et al. Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. *Critical Reviews in Oral Biology and medicine*. 1998 Jan;9(1):86–122.
55. Tao X, Xia J, Chen X, Wang H, Dai Y, Rhodus NL, et al. FOXP3 T regulatory cells in lesions of oral lichen planus correlated with disease activity. *Oral Diseases*. 2010 Jan;16(1):76–82.
56. Figueiredo LC, Carrilho FJ, De Andrade HFJ, Migliari DA. Oral lichen planus and hepatitis C virus infection. *Oral Diseases*. 2002 Jan;8(1):42–6.
57. Femiano F, Scully C. Functions of the cytokines in relation oral lichen planus-hepatitis C. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2005 Jan;10 Suppl 1:E40–4.
58. Carrozzo M, Quadri R, Latorre P, Pentenero M, Paganin S, Bertolusso G, et al. Molecular evidence that the hepatitis C virus replicates in the oral mucosa. *Journal of Hepatology*. 2002 Sep;37(3):364–9.
59. Pilli M, Penna A, Zerbini A, Vescovi P, Manfredi M, Negro F, et al. Oral lichen planus pathogenesis: A role for the HCV-specific cellular immune response. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2002 Dec;36(6):1446–52.
60. 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. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2003 Oct;32(9):507–12.

61. Censo 2010. [citado 29 agosto de 2012]. Disponível em: ibge.gov.br.
62. Morettin P, Bussab W. Estatística básica. 6a. ed. São Paulo: Saraiva; 2010.
63. Sturm N, Thélou M-A, Camous X, Dimitrov G, Ramzan M, Dufeu-Duchesne T, et al. Characterization and role of intra-hepatic regulatory T cells in chronic hepatitis C pathogenesis. *Journal of Hepatology*. 2010 Jul;53(1):25–35.
64. Pereira JS, Monteiro BV, Nonaka CF, Silveira ÉJ, Miguel MC. FoxP3(+) T regulatory cells in oral lichen planus and its correlation with the distinct clinical appearance of the lesions. *International Journal of Experimental Pathology*. 2012 Aug;93(4):287–94.
65. Mega H, Jiang WW, Takagi M. Immunohistochemical study of oral lichen planus associated with hepatitis C virus infection, oral lichenoid contact sensitivity reaction and idiopathic oral lichen planus. *Oral Diseases [Internet]*. 2001 Sep;7(5):296–305.
66. Romero MA, Seoane J, Varela-Centelles P, Diz-Dios P, Otero XL. Clinical and pathological characteristics of oral lichen planus in hepatitis C-positive and -negative patients. *Clinical otolaryngology and Allied Sciences*. 2002 Mar;27(1):22–6.
67. Ojha J, Bhattacharyya I, Islam N, Cohen DM, Stewart CM, Katz J. Xerostomia and lichenoid reaction in a hepatitis C patient treated with interferon-alpha: a case report. *Quintessence International (Berlin, Germany : 1985)*. 2008 Apr;39(4):343–8.
68. Zhou XJ, Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Seymour GJ. Intra-epithelial CD8+ T cells and basement membrane disruption in oral lichen planus. *Journal of oral Pathology & Medicine*. 2002 Jan;31(1):23–7.
69. Carrozzo M, Francia Di Celle P, Gandolfo S, Carbone M, Conrotto D, Fasano ME, et al. Increased frequency of HLA-DR6 allele in Italian patients with hepatitis C virus-associated oral lichen planus. *The British Journal of Dermatology*. 2001 Apr;144(4):803–8.
70. Lazaro P, Olalquiaga J, Bartolomé J, Ortiz-Movilla N, Rodríguez-Iñigo E, Pardo M, et al. Detection of hepatitis C virus RNA and core protein in keratinocytes from patients with cutaneous lichen planus and chronic hepatitis C. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2002 Oct;119(4):798–803.

71. Münz C, Lünemann JD, Getts MT, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nature reviews. Immunology*. 2009 Apr;9(4):246–58.
72. Bassit L, Mendes L, Carrilho FJ, Fonseca L, Peeira A, et al. Genotipagem do vírus da hepatite C (VHC) em 60 pacientes com hepatite crônica (HC-C) submetidos a tratamento com interferon alfa recombinante (INF). *Gastroenterologia endoscopia Digestiva*. 1995;14(4):137.
73. La Nasa G, Cottoni F, Mulargia M, Carcassi C, Vacca A, Pizzati A, et al. HLA antigen distribution in different clinical subgroups demonstrates genetic heterogeneity in lichen planus. *The British Journal of Dermatology*. 1995 Jul;132(6):897–900.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FOU SP

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PROJETO DE PESQUISA

Título: PERFIL INFLAMATÓRIO DO LÍQUEN PLANO ORAL ASSOCIADO À INFECÇÃO DE HEPATITE C CRÔNICA

Área Temática:

Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 06602912.9.0000.0075

Pesquisador: Karem López Ortega

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 115,649

Data da Relatoria: 04/10/2012

Apresentação do Projeto:

O líquen plano (LP) é uma doença mucocutânea inflamatória crônica relativamente comum, que afeta o epitélio pavimentoso estratificado, desencadeando lesões de variadas apresentações clínicas. Estudos preliminares sugerem que linfócitos Tregs, identificados pela marcação de Foxp3, possam participar da patogênese do líquen plano oral idiopático (LPOi) contribuindo com o caráter refratário das lesões. A ação regulatória desta subpopulação linfocitária também pôde ser verificada em amostras de tecido hepático por análise imunoistoquímica, na qual a identificação de CD4+CD25+Foxp3 sugere a supressão de linfócitos T VHC específicos, contribuindo com o dano hepático, progressão e balanço imunológico da infecção.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar se lesões de líquen plano oral associado ao vírus da hepatite C (LPO-VHC) podem ser consideradas uma entidade diferente do líquen plano oral idiopático, por apresentarem um perfil inflamatório específico frente a presença viral, através da identificação da presença do vírus da hepatite C em amostras de tecido de LPOVHC por meio de ensaio de imuno-histoquímico, utilizando-se o anticorpo TORDJI-22.2 e identificar a presença e distribuição de células Tregs e seu possível papel na patogenia do LPO-VHC, utilizando-se os anticorpos anti-Foxp3 e anti-CD8.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos por ser um estudo com blocos de tecidos obtidos em serviços de patologia bucal. Os benefícios são indiscutíveis, por permitir o entendimento de uma possível nova patologia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e sua execução traria uma grande contribuição na caracterização de uma possível nova patologia, cujo entendimento é fundamental na proposta do seu tratamento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados a carta de autorização do material mantido na UFSC e aprovação do comitê de ética de uma pesquisa anterior do Instituto de Infectologia Emílio Ribas. Além da carta de autorização do uso do material mantido no arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP.

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 PAULO

Recomendações:

Segundo Carta Circular nº. 039/2011/CONEP/CNS/GB/MS, de 30 de setembro de 2011, contudo não cabe ao Sistema CEP/CONEP legislar sobre o acesso e USO DO PRONTUÁRIO médico (entenda-se odontológico também), porém cabe determinar o cumprimento do sigilo e da confidencialidade, além de exigir que toda pesquisa envolvendo seres humanos trate os mesmos em sua dignidade, respeite-os em sua autonomia e defenda-os em sua vulnerabilidade, conforme Resolução CNS 196/96, itens III.1.º a 1.º e IV.1.º a 1.º. O CEP-FOUSP solicita Carta de autorização pelo uso de prontuários do responsável pela Instituição, ressaltando o cumprimento destas normativas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 04 de Outubro de 2012

Assinado por:
Marcia Turolla Wanderley
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO B – Autorização para uso dos blocos FOUSP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Patologia Bucal

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins e efeitos legais que, objetivando atender as exigências para obtenção de parecer do Comitê de Ética em Pesquisa, e como supervisora do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, tomei conhecimento do projeto de pesquisa "Perfil Inflamatório Do Líquen Plano Oral Associado À Infecção De Hepatite C Crônica", autorizando a utilização dos casos de número 60424, 58643, 59261, 59835, 62089, 62855/56, 62971/72, 66949, 66690/91/92, 63786, 66271/72, 66343, 66547, 64074/75, 64382/84, 64714, 65461/62, 65564, 65987, 61510, 64509, 63093 e 63289.

São Paulo, 27 de setembro de 2012.

Profa. Dra. Suzana C.O.M. de Sousa
Disciplina Patologia Bucal
Departamento de Estomatologia - FOUSP

ANEXO C – Autorização para uso dos blocos UFSC

**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**

Campus Universitário – Trindade – Fpolis/SC – CEP 88040-370

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins e efeitos legais que, objetivando atender as exigências para obtenção de parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, e como supervisora do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC, tomei conhecimento do projeto de pesquisa “PERFIL INFLAMATÓRIO DO LÍQUEN PLANO ORAL ASSOCIADO À INFECÇÃO DE HEPATITE C CRÔNICA”, autorizando a utilização dos casos de número (PB) 1007, 1220, 870, 1126, 732 e 1123.

Florianópolis, 29 de agosto de 2012

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta, legível como 'Elena Riet Correa Rivero'.

*Profª. Elena Riet Correa Rivero
Departamento de Patologia
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Santa Catarina*

ANEXO D – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa IIER/SP

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE COORDENADORIA DOS SERVIÇOS DE SAÚDE INSTITUTO DE INFECTOLOGIA "EMÍLIO RIBAS" COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Av. Dr. Arnaldo, 185 - Cerqueira César - São Paulo - SP CEP: 01246-900 - TEL: 3095-1406 E-mail: comitedeetica-ier@ig.com.br
---	--

PARECER

PROTOCOLO DE PESQUISA N.º 40/08 PARECER N.º 310/2008	Data da entrada: Data: 17/9/2008
---	-------------------------------------

Título da Pesquisa: "Levantamento epidemiológico e análise do perfil imunohistoquímico do Líquen Oral associado à Hepatite C"

Investigador Principal: Marina de Fátima Rossi Monteiro de Paiva
Autor Principal: Alessandra Rodrigues de Camargo

CONSIDERAÇÕES: O Comitê de Ética em Pesquisa considera respondida a pendência do parecer anterior e Aprova o estudo e seu TCLE.	
(X) APROVADO () APROVADO COM RECOMENDAÇÕES () REPROVADO () COM PENDÊNCIAS- OBS.: a ausência de resposta em 60 dias, acarretará em arquivamento do processo por falta de interesse do pesquisador.	

TEMÁTICA ESPECIAL	☐ SIM	☐ NÃO	
CONEP	☐ SIM	☐ NÃO	
SVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA)	☐ SIM	☐ NÃO

 Dra. Anna Christina Nunes D'Ambrosio
 Comitê de Ética em Pesquisas - I.I.E.R

ANEXO E – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa UFSC

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

PROJETO DE PESQUISA**Título:** Líquen Plano Oral associado a Hepatite C**Área Temática:****Pesquisador:** Lilliane Janete Grando**Versão:** 1**Instituição:** Universidade Federal de Santa Catarina**CAAE:** 02253112.2.0000.0121**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****Número do Parecer:** 34543**Data da Relatoria:** 11/06/2012**Apresentação do Projeto:**

Perfil inflamatório do Líquen Plano Oral (LPO) em pacientes com Hepatite C (IHCC)
Estudo observacional, transversal.
150 sujeitos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:
Verificar a associação entre o Líquen Plano Oral (LPO) e a Hepatite C crônica (IHCC) por meio de reação imunoistoquímica em amostras de biópsias de Líquen Plano Oral (LPO) de pacientes cronicamente infectados.
Objetivos secundários:
1. Analisar a incidência de Líquen Plano Oral (LPO) em uma população específica de pacientes com IHCC do Ambulatório de Hepatologia do HU/UFSC;
2. Identificar a presença do HCV (vírus da hepatite C) em amostras de biópsia de Líquen Plano Oral (LPO);
3. Identificar a presença de subtipos linfocitários específicos ao vírus da hepatite C (CD4+ CD25+ Foxp3) em amostras de Líquen Plano Oral (LPO).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

São relatados alguns riscos, tais como: riscos da biópsia (sangramentos, hematomas -manchas arroxeadas), infecção, e dor após o término da anestesia.
Entre os benefícios, as pesquisadoras relatam o diagnóstico e controle da doença líquen plano Oral (LPO) e poderá também conhecimento dos motivos pelos quais a doença se manifesta.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Descrevem claramente os critérios de inclusão e exclusão dos sujeitos na amostra, mas alguns aspectos metodológicos descritos no relatório do projeto não são coincidentes com os do projeto, como por exemplo, no relatório da pesquisa as autoras afirmam que a coleta de dados se realizada em duas fases, ambas a serem realizadas na UFSC, enquanto que no projeto as autoras afirmam que parte do material armazenado a partir da fase 2 é ficará sob a responsabilidade do autor deste projeto para posterior realização dos ensaios imunoistoquímicos, a serem realizados na Faculdade de Odontologia, na Disciplina de Patologia Bucal, da Universidade de São Paulo e FOU SP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentam todos os Termos de acordo com a legislação vigente

Recomendações:

Esclarecer onde será realizada a fase 2 do processo de coleta de dados na UFSC ou na FOU SP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Favorável a aprovação com recomendação.

Situação do Parecer:

Aprovado

ANEXO F – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FOUSP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR 333684
Protocolo 28/10

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o Projeto de pesquisa "**Levantamento epidemiológico e análise do perfil imunoistoquímico do líquen plano oral associado à hepatite C**", de responsabilidade da Pesquisadora Alessandra Rodrigues de Camargo, sob orientação do Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Júnior.

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

São Paulo, 19 de maio de 2010.

Prof. Dra. Marcia Turcila Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária, "Anacleto de Salles Oliveira" CEP 05508-000
São Paulo – SP - Diretoria Telefax (011)3091-0932/3043 - 3091-7850 - Compras (011) 3091-7825
Impressão 05/05/2010