Elisa Raquel Martins da Costa Marques

Manifestações orais do lúpus eritematoso:
padrão das citocinas do infiltrado inflamatório

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
Obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Marcello Menta Simonsen Nico

São Paulo

2009

Dedicatória

Dedicatória

Ao meu marido, Telmo, pelo seu enorme amor e dedicação a mim, pelo incentivo e apoio incondicional a todos os meus sonhos e pela satisfação com conquistas minhas mais do que com as próprias.

Aos meus filhos, Gustavo e Giulia, pelo carinho, incentivo e compreensão pelas frequentes ausências.

À minha mãe, Lourdes, por ter me ensinado a prezar a busca pelo conhecimento e por sua dedicação, estímulo e presença, com seu amor incondicional, em todos os momentos da minha vida.

Ao meu pai, Jarbas, pelos bons momentos que convivemos.

Ao meu irmão, Jarbas Eduardo, antes de tudo um amigo, grande incentivador do meu crescimento profissional.

Aos meus cunhados, Thiers, Simone e Maria Alice, que tornam a minha família ainda melhor.

Agradecimentos

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcello Menta S. Nico, por sua condução firme, segura e participativa, com contribuições e ensinamentos valiosos em todos os momentos do desenvolvimento deste estudo, a quem aprendi a admirar e respeitar por sua sabedoria e dedicação. Agradeço pelo privilégio de ter trabalhado ao seu lado.

À Prof^a. Dra. Sílvia Vanessa Lourenço, pela profissional dedicada, solícita, participativa, um exemplo a ser admirado e seguido. Devo, principalmente ao seu incentivo, apoio, ajuda e ensinamentos, a realização deste estudo.

À Prof^a. Dra. Miriam Nacami Sotto, pela confiança, incentivo e ajuda para que este estudo pudesse ser realizado.

À Prof^a. Dra. Maria Aparecida Constantino Vilela, profissional brilhante, generosa com a qual tive o privilégio de conviver no Ambulatório de Colagenoses do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

À Prof^a. Dra. Bogdana Victoria Kadunk, pelo incentivo e apoio ao meu progresso profissional e acadêmico, tornando possível a realização deste estudo. Agradeço pela compreensão, conforto e carinho no longo período de realização deste projeto.

À Dra Ada Regina Trindade Almeida, grande amiga, profissional competente, pelo apoio, carinho e ensinamentos.

À Dirce Mary Lima, por sua dedicação incondicional, amizade e apoio nos momentos mais difíceis.

À Ana Maria Gonçalves Silva, por suas orientações preciosas durante a realização das reações.

Ao Ricardo, Fábio, Sabrina, Fernanda, Elaine e Cristina pela ajuda, apoio e ensinamentos.

À Dona Eli Maria, pela eficiência e competência na resolução de nossas dúvidas.

Aos funcionários do Departamento de Dermatologia e dos Laboratórios de Imunofluorescência e de Histopatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos amigos Walter, Chinobu, Celso, Jackeline, Nilton, Selma, Denise, Suzana, Alessandra, Miguel, residentes e funcionários do Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo, pelo apoio, carinho e compreensão nas minhas ausências para a realização deste estudo.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	06
3 REVISÃO DA LITERATURA	08
3.1 Manifestações cutâneas do lúpus eritematoso	09
3.1.1 Lúpus eritematoso cutâneo agudo	10
3.1.2 Lúpus eritematoso cutâneo subagudo	11
3.1.3 Lúpus eritematoso cutâneo crônico	12
3.2 Envolvimento mucoso no lúpus eritematoso	14
3.2.1 Manifestações oculares	14
3.2.2 Manifestações nasais	15
3.2.3 Manifestações vaginais	15
3.2.4 Lúpus eritematoso oral	16
3.2.4.1 Lúpus eritematoso oral agudo	16
3.2.4.2 Lúpus eritematoso oral subagudo	17
3.2.4.3 Lúpus eritematoso oral crônico	18

3.3 Histopatologia das lesões orais	20
3.4 Imunofluorescência direta das lesões orais	22
3.5 Etiopatogenia do lúpus eritematoso	23
3.5.1 Fatores genéticos	24
3.5.2 Envolvimento hormonal	26
3.5.3 Autoanticorpos	27
3.5.4 Radiação ultravioleta	27
3.6 Radiação ultravioleta e lúpus eritematoso	28
3.6.1 Radiação ultravioleta e a formação de autoanticorpos	28
3.6.2 Radiação ultravioleta e apoptose	30
3.7 Citocinas	32
3.8 Interleucinas	36
3.8.1 Interleucina 4	36
3.8.2 Interleucina 5	37
3.8.3 Interleucina 6	38
3.8.4 Interleucina 10	39
3.8.5 Interleucina 12	40
3.8.6 Fator de necrose tumoral alfa	41
3.8.7 Interferon gama	43
3.9 Radiação ultravioleta e citocinas	45
3.9.1 Radiação ultravioleta, interleucina 10 e interleucina 12	45

3.9.2 Radiação ultravioleta, interleucina 1 alfa e fator de necrose tumoral alfa	46
3.9.3 Radiação ultravioleta, quimiocinas e interferon gama	47
3.10 Citocinas na patogênese do lúpus eritematoso	48
3.10.1 Interferon gama	48
3.10.2 Fator de necrose tumoral alfa	50
3.10.3 Interleucina 12	53
3.10.4 Interleucina 10	55
3.10.5 Interleucina 6	57
3.10.6 Interleucina 5	58
3.10.7 Interleucina 4	59
3.11 Desequilíbrio das citocinas no lúpus eritematoso	60
3.11.1 Estudos em células mononucleares	60
3.11.2 Estudos em lesões cutâneas	61
4 MÉTODOS	63
4.1 Casuística	64
4.2 Aprovação do Comitê de Ética	64
4.3 Classificação das lesões orais	65
4.4 Histopatologia	65
4.5 Imunofluorescência direta	66
4.5 Imuno-histoquímica	67

5 RESULTADOS	70
5.1 Análise das informações clínicas	71
5.2 Análise do aspecto histológico das lesões orais	72
5.3 Análise da imunofluorescência direta das lesões orais	72
5.4 Análise imuno-histoquímica das lesões orais	75
5.5 Análise das citocinas Th1	77
5.5.1 Interferon gama	77
5.5.2 Fator de necrose tumoral alfa	78
5.5.3 Interleucina 12	79
5.6 Análise das citocinas Th2	80
5.6.1 Interleucina 10	80
5.6.2 Interleucinas 5 e 6	81
5.6.3 Interleucina 4	82
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES	99
8 INFERÊNCIAS	101
9 ANEXOS	103
10 REFERÊNCIAS	108
Apêndice	

Listas

Lista de abreviaturas

APC	célula apresentadora de antígeno
C	complemento
CAPPesp	Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CK	citoqueratinas
CSF	fator estimulador de colônia
et al.	e outros
F	feminino
GF	fator de crescimento
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	hematoxilina eosina
ICAM 1	moléculas de adesão intracelular
Ig	imunoglobulina
IFN	interferon
IL	interleucina
LE	lúpus eritematoso
LEC	lúpus eritematoso cutâneo
LECA	lúpus eritematoso cutâneo agudo
LECC	lúpus eritematoso cutâneo crônico

LECSA	lúpus eritematoso cutâneo subagudo
LED	lúpus eritematoso discoide
LES	lúpus eritematoso sistêmico
LP	líquen plano
M	masculino
MHC	complexo de histocompatibilidade
NK	“Natural Killer”
PAS	ácido periódico de <i>Schiff</i>
PCR-TR	técnica da reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa
PGE2	prostaglandina E2
ROS	espécie oxigênio reativa
TBS	tampão trizma base
TGF	fator de crescimento transformador
TNF	fator de necrose tumoral
UV	ultravioleta
VCAM 1	molécula de adesão celular vascular
ZMB	zona da membrana basal

Lista de símbolos

°C	graus Celsius
μ	micrômetro
n	número de amostras
nm	nanômetros
α	alfa
γ	gama
KD	kilodalton
+	positivo
-	negativo
X	vezes

Lista de tabelas

Tabela 1 - Anticorpos e protocolos
utilizados

Anexo B

Tabela 2 - Informações clínicas e aspectos
Imuno-histoquímicos da expressão das
citocinas nas lesões orais de LE.

Anexo C

Tabela 3 - Aspectos da imunofluorescência
direta das lesões orais de LE

Anexo D

Lista de Figuras

Figura 1- Exemplos clínicos de lesões orais de lúpus eritematoso	73
Figura 2- Aspectos histopatológicos e de imunofluorescência de lesões orais de LE	74
Figura 3- Expressão das citocinas nas lesões orais de LE	76
Figura 4- Representação gráfica da expressão de IFN- γ na área não exposta (mucosa intraoral) e exposta (semimucosa)	77
Figura 5- Representação gráfica da expressão de TNF- α na área não exposta (mucosa intraoral) e exposta (semimucosa)	78
Figura 6- Representação gráfica da expressão de IL-12 na área não exposta (mucosa intraoral) e exposta (semimucosa)	79

Figura 7- Representação gráfica da expressão de IL-10
na área não exposta (mucosa intraoral)
e exposta (semimucosa) 80

Figura 8- Representação gráfica da expressão
de IL-5 e IL-6 na área não exposta (mucosa intraoral)
e exposta (semimucosa) 81

Figura 9- Representação gráfica da expressão de IL-4
na área não exposta (mucosa intraoral)
e exposta (semimucosa) 82

Resumo

Marques ERM. *Manifestações orais do lúpus eritematoso: padrão das citocinas do infiltrado inflamatório*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 122p.

INTRODUÇÃO: Lúpus eritematoso (LE) é uma doença inflamatória crônica, autoimune. A presença de citocinas do tipo 1 nas lesões cutâneas discoides sugere que estas sejam críticas para a indução, desenvolvimento e manutenção destas manifestações. As citocinas do tipo 2 em combinação com Interferon- γ local podem estar relacionadas com a fisiopatologia do lúpus cutâneo. O perfil das citocinas ainda é desconhecido nas lesões orais do LE. **MÉTODOS:** Foram investigadas e comparadas as expressões das citocinas Th1 e Th2, representadas por IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ), de 29 biopsias de LE de mucosa intraoral (área não exposta ao sol) e semimucosa labial (área exposta) por meio da técnica de imuno-histoquímica. **RESULTADOS:** O infiltrado inflamatório das lesões de LE foi fortemente positivo para IFN- γ (97%) e TNF- α (90%), ambas citocinas Th1. Interleucina 10 (IL-10), citocina Th2, foi fortemente expressa. Outras citocinas foram apenas moderadamente positivas. O padrão de citocinas foi semelhante nas lesões orais do LE na mucosa intraoral (área não exposta) e na semimucosa labial (área exposta). **CONCLUSÕES:** As lesões orais de LE estão associadas tanto a citocinas Th1 quanto a citocinas Th2, caracterizadas por expressão forte de IFN- γ , TNF- α e IL-10. Além disso, os achados sugerem que apesar da radiação ultravioleta estar envolvida na indução das lesões de LE, os mecanismos de formação das lesões podem ser similares nas áreas expostas e não expostas ao sol.

Descritores: 1.Lúpus eritematoso 2.Manifestações bucais 3.Citocinas

Summary

Marques ERM. *Oral lesions in lupus erythematosus – cytokines profiles of inflammatory infiltrate* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009. 122p.

Lupus erythematosus (LE) is a chronic inflammatory disease, autoimmune. Presence of type 1 cytokines in cutaneous discoid lesions suggests that they may be critical for induction, development and maintenance of these manifestations. Type 2 cytokines in combination with local interferon γ (IFN- γ) are thought to be related to the physiopathology of cutaneous LE. Cytokines profiles are still unknown in oral LE lesions. **Material and Methods:** Expression of Th1 and Th2 cytokines (including IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, tumor necrosis factor α (TNF- α) and IFN- γ) was investigated and compared in 29 biopsies of intra-oral (sun-protected) and labial lesions (sun-exposed) of LE using immunohistochemistry. **Results:** Inflammatory infiltrate of LE lesions was strongly positive for IFN- γ (97%) and TNF- α (90%), both Th1 type cytokines. Interleukin-10, a Th2 cytokine was also strongly expressed. Other cytokines were only mildly positive. Cytokines patterns were similar in intra-oral (sun-covered) and labial (sun-exposed) LE lesions **Conclusions:** Oral LE lesions are associated with both type 1 and type 2 cytokines, characterized by stronger expression of IFN- γ , TNF- α and IL-10. These findings suggest that although ultraviolet light is involved in the induction of LE lesions, mechanisms of lesions formation may be similar in sun-exposed as well as sun-covered areas.

Descriptors: 1.lupus erythematosus 2.oral manifestations 3.cytokines

1. Introdução

1. Introdução

O lúpus eritematoso (LE) é uma doença inflamatória crônica autoimune, de causa desconhecida, caracterizada por um largo espectro de manifestações de evolução variável (Antonovych, 1995; Jensen, 1999; Jiménez et al., 2005).

O LE é mais frequente no sexo feminino entre a segunda e a terceira década de vida, podendo, no entanto, ocorrer em qualquer idade em ambos os sexos (Antonovych, 1995; Jensen, 1999; Nath et al., 2004).

É considerada por muitos autores uma doença espectral, podendo acometer múltiplos órgãos (LE sistêmico) ou confinar-se apenas na pele (LE cutâneo) (Antonovych, 1995; Jensen, 1999; Jiménez et al., 2005).

Dentre os vários órgãos envolvidos, a pele é um dos locais mais frequentes e suas manifestações podem ocorrer em qualquer estágio da doença, sendo, às vezes, a lesão cutânea a primeira manifestação da doença (Sontheimer et al., 1997).

As lesões cutâneas do LE são classificadas em específicas (diagnósticas) e não específicas (não diagnósticas) (Gillian e Sontheimer, 1981), sendo as primeiras subdivididas em agudas, subagudas e crônicas, de acordo com suas características clínicas e histológicas vistas apenas no LE (Sontheimer, 2004; Specker et al., 2005; Lee, 2008). As lesões específicas podem estar presentes tanto nas formas cutâneas como nas formas sistêmicas do LE (Jiménez et al., 2005).

O envolvimento mucoso no LE pode estar presente nas diferentes apresentações da doença, sendo sua prevalência incerta por ser, em geral, subestimado nas diversas séries de casos. Há descrição de lesões nas mucosas oral, conjuntival, nasal, vaginal e perianal (Burge et al., 1989).

Na literatura, a frequência das manifestações orais é variável (Orteu et al., 2001). Burge et al. (1989) encontraram de 9% a 45% no LES, de 3% a 20% no LE cutâneo crônico, e, recentemente, Lourenço et al. (2006) encontraram 11,9% de lesões orais em 188 doentes de LE.

As lesões da mucosa oral apresentam-se de diversas formas e sua descrição varia muito em diversos trabalhos. Nico et al. (2008), recentemente, correlacionaram as lesões orais com as lesões cutâneas do LE, classificando-as em crônicas, subagudas e agudas, concluindo que as manifestações orais representam o análogo mucoso do LE cutâneo.

A manifestação mais comum da forma oral crônica do LE é a lesão discoide, caracterizada por lesão eritematosa bem delimitada, arredondada ou irregular, de superfície atrófica ou ulcerada com estrias radiadas brancas e telangiectasias localizadas mais comumente na mucosa jugal. A forma oral subaguda do LE apresenta-se como placa eritematosa bem delimitada levemente deprimida. É forma bastante rara, já que o LE subagudo caracteriza-se pela fotossensibilidade, sendo incomum lesões intraorais. Já a forma oral aguda compreende diversas apresentações clínicas, como máculas eritematosas ou eritemato purpúricas no palato e erosões ou ulcerações na mucosa (Nico et al., 2008).

A causa do LE permanece ainda desconhecida, e sua etiopatogenia é considerada um evento multifatorial com o envolvimento de fatores genéticos, hormonais e exógenos que influenciam o sistema imune, levando a numerosas anormalidades imunorregulatórias (Duarte, 2004; Herndon et al., 2005; Herrmann et al., 2000; Costner e Sontheimer, 2003). A patogênese das lesões cutâneas específicas do LE, desde a sequência dos eventos que iniciam a resposta imune até o desenvolvimento das lesões cutâneas, também ainda não foi bem estabelecida (Duarte, 2004). Acredita-se que os mecanismos que levam ao LE resultem de um desequilíbrio entre as respostas humoral e celular, e nesse cenário, as citocinas desempenham um papel importante (Werth, 2007).

As citocinas são um grupo heterogêneo de pequenas proteínas (8-80 KD de peso molecular) mediadoras e reguladoras tanto da resposta inata como da específica. São sintetizadas por diversos tipos de células em resposta a estímulos inflamatórios ou antigênicos. Agem localmente sobre outras células ou sobre aquelas que a produziram, podendo até mesmo influenciar células distantes por meio de citocinas secretadas na circulação (Abbas et al., 2000; Schwarz, 2008; Vasconcelos, 2009). Sua nomenclatura não é unificada, mas tradicionalmente são classificadas de acordo com o fenótipo das células que a produziram, em geral os linfócitos (Husband et al., 1999; Dean et al., 2000). Conforme essa classificação, são consideradas citocinas Th1 ou Th2 aquelas produzidas por linfócitos T “helpers”, que se diferenciaram em Th1 ou Th2 respectivamente. São chamadas de citocinas Th1 o interferon γ (IFN- γ), a interleucina (IL) 2 (IL-2) e o fator de necrose

tumoral alfa (TNF- α). A IL-12, produzida por macrófagos apresentadores de antígenos, é uma forte promotora de citocinas Th1 (Toro et al., 2000; Dean et al., 2000; Vasconcelos, 2009). As citocinas Th2 são representadas principalmente pelas IL- 4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Toro et al., 2000; Dean et al., 2000).

Diversos estudos sugerem um desequilíbrio da produção de citocinas Th1 e Th2 no LE (Singh, 1992a; Singh, 1992b; Linker-Israeli, 1992; Richaud-Patin et al., 1995; Dean et al., 2000; Csiszar et al., 2000; Theofilopoulos et al., 2001; Rahman, 2003; Aringer et al., 2003; Kalsi et al., 2004; Herndon et al., 2005).

Alguns autores sugerem predomínio da resposta Th1 (Toro et al., 2000), enquanto outros defendem uma resposta Th2 (Stein et al., 1997).

Os estudos sobre a participação das citocinas nas lesões cutâneas de LE são pouco frequentes (Stein et al., 1997; Toro et al., 2000; Wenzel et al., 2005). Na literatura não foram encontrados relatos da participação de citocinas nas lesões orais de LE, o que nos motivou a realizar este trabalho.

2. Objetivos

2. Objetivos

1. Identificar o perfil das seguintes citocinas no infiltrado inflamatório das lesões orais do LE:

- IL-4
- IL-5
- IL-6
- IL-10
- IL-12
- TNF- α
- IFN- γ

2. Comparar o perfil das citocinas das lesões mucosas intraorais (não expostas ao sol) com o das lesões da semimucosa labial (expostas ao sol).

3. Revisão da Literatura

3. Revisão da literatura

3.1 Manifestações cutâneas do lúpus eritematoso

As manifestações tegumentares estão entre as mais frequentes, e muitas vezes o sistema tegumentar é o único afetado (Sontheimer et al., 1997). Aparecem em 72% a 90% dos doentes com LES, podendo ocorrer em qualquer estágio da doença, sendo a primeira manifestação da forma sistêmica em 23% a 28% dos casos (Sontheimer et al., 1997; Jiménez et al., 2005; Lin et al., 2007).

As lesões cutâneas do LE podem ser classificadas em específicas (diagnósticas) e não específicas (não diagnósticas) (Gillian e Sontheimer, 1981). As lesões não específicas podem ser vistas em doentes de LE, assim como em outras doenças (Sontheimer, 2004). São consideradas lesões não específicas: vasculite, fenômeno de Raynaud, telangiectasias periungueais, livedo racemoso, alopecia não cicatricial e a calcinose cutânea, entre outras (Sontheimer, 2004).

As lesões cutâneas específicas apresentam quadro clínico e histopatológico característico somente visto no LE (Crowson e Magro, 2001; Sontheimer, 2004). São subdivididas em agudas, subagudas e crônicas (Sontheimer, 2004; Specker et al., 2005; Lee, 2008).

Qualquer uma destas formas pode aparecer tanto em doentes com LE confinado à pele (LE cutâneo) quanto em pacientes com a forma sistêmica

(LES), que, neste caso, recebe a denominação de LE sistêmico com lesão cutânea do tipo crônica, subaguda ou aguda (Jiménez et al., 2005).

3.1.1 Lúpus eritematoso cutâneo agudo (LECA)

As manifestações cutâneas agudas se caracterizam por eritema, que pode ser localizado (eritema malar ou em asa de borboleta ou mariposa) ou generalizado (Sontheimer, 2004; Kuhn et al., 2005). Desaparece sem deixar cicatrizes ou despigmentações ou se torna confluyente e hiperqueratótica, acompanhada de edema facial (Kuhn et al., 2005). As lesões cutâneas agudas podem estar associadas à alopecia difusa, telangiectasias periungueais, alterações cuticulares e ulcerações superficiais na mucosa oral e nasal (Kuhn et al., 2005).

O LECA ocorre mais em mulheres (6:1) na segunda e terceira década de vida e representa 20% a 60% dos doentes (Kuhn et al., 2005). Pode estar associado ao antígeno de histocompatibilidade HLA-DR2 e DR3, e a presença de casos familiares e em gêmeos sugere um componente genético (Duarte, 2004).

As lesões cutâneas agudas estão fortemente associadas à forma sistêmica do LE, podendo preceder as manifestações multissistêmicas por semanas ou meses (Kuhn et al., 2005).

3.1.2 Lúpus eritematoso cutâneo subagudo (LECSA)

O LECSA foi caracterizado clínica e imunologicamente por Sontheimer, Thomas e Gilliam em 1979. É clinicamente constituído por fotossensibilidade e por lesões papulo-escamosas (psoriasiforme) e/ou anulares (anulares policíclicas) simétricas em áreas fotoexpostas (Sontheimer, 2004; Duarte, 2004; Specker et al., 2005; Lee, 2008). Em geral, acometem as regiões superiores do tronco e dos membros (Sontheimer, 2004). Evoluem sem deixar cicatrizes atróficas, mas podem levar a hipopigmentação pós-inflamatória (Sontheimer, 2004). As duas formas de lesões podem coexistir no mesmo doente (Sontheimer, 2004).

O LECSA acomete mais frequentemente mulheres brancas de meia idade e pode estar associado a comprometimento interno em 50% dos casos (Sontheimer, 2004; Duarte, 2004). Manifestações extracutâneas como as do sistema músculo-esquelético, como artralguas e artrites, são frequentemente observadas, podendo haver envolvimento renal e do sistema nervoso central (Sontheimer, 2004; Specker et al., 2005).

O LECSA está associado aos antígenos de histocompatibilidade HLA B8 e HLA-DR3 e com a produção de autoanticorpos Ro/SS-A e La/SS-B (Sontheimer, 2004; Duarte, 2004; Specker et al., 2005; Lee, 2008).

A forma clínica do LECSA caracteriza o LE neonatal e também está associada à deficiência congênita da fração C2 e C4 do complemento (Duarte, 2004; Specker et al., 2005). Outras doenças reumatológicas, como

a síndrome de Sjogrn e a artrite reumatoide, podem ocorrer associadas ao LECSA (Sontheimer, 2004; Specker et al., 2005; Lee, 2008).

3.1.3 Lpus eritematoso cutneo crnico (LECC)

A manifestao cutnea mais comum do LECC a leso discoide (lpus eritematoso discoide - LED) (Duarte, 2004; Lin et al., 2007; Lee, 2008).

As leses ativas so caracterizadas por ppulas ou placas eritematosas, com escamas aderentes foliculares e rolhas crneas, que evoluem para cicatrizes atrficas e despigmentao (hipopigmentao central e hiperpigmentao perifrica) (Duarte, 2004; Jimnez et al., 2005; Lin et al., 2007). No couro cabeludo, frequentemente evoluem com alopecia cicatricial (Lee, 2008).

O LED localiza-se, principalmente, na face, no couro cabeludo e nas orelhas (forma localizada), e menos frequentemente, atinge reas abaixo do segmento ceflico (forma disseminada) (Duarte, 2004; Lin et al., 2007; Lee, 2008).

O carcinoma de clulas escamosas pode se desenvolver em leses discoides de longa durao (Lee, 2008).

Doentes com leses discoides sem manifestaes sistmicas podem apresentar artralgias (Lee, 2008), e aproximadamente 5% a 10% doentes com LED desenvolvem LES, sendo esse risco maior na forma disseminada da doena (Lee, 2008).

O LED hipertrófico ou verrucoso é uma variante incomum do LED e caracteriza-se por aspecto intensamente queratósico das lesões discoides (Lee, 2008). Ocorre nas áreas extensoras dos braços, na face e na parte superior do tronco (Duarte, 2004; Lee, 2008). Essa forma atinge com mais frequência indivíduos acima de 40 anos, quando a possibilidade de doença sistêmica é menor (Duarte, 2004).

Outras manifestações cutâneas do LECC incluem o lúpus túmido, o lúpus profundo e o lúpus com lesões semelhantes ao eritema pérmio (chilblain lupus) (Lee, 2008).

3.2. Envolvimento mucoso no lúpus eritematoso

A prevalência do envolvimento mucoso no LE é incerta, e como suas manifestações podem ser pouco sintomáticas, acredita-se que sejam um tanto subestimadas nas diversas séries de casos (Burge et al., 1989). Os achados clínicos da mucosa são pouco documentados e, em geral, não é feita a distinção entre lesões agudas ou crônicas (Burge et al., 1989).

As manifestações mucosas podem acometer qualquer uma das formas de LE. Burge et al. (1989), em estudo com 121 pacientes com lúpus eritematoso (LE), encontraram achados clínicos de envolvimento mucoso em 21% dos pacientes com LES e 24% dos pacientes com LECC.

Diversas mucosas podem ser acometidas. Há relato de lesões nas mucosas oral, conjuntival, nasal, vaginal e perianal.

3.2.1 Manifestações oculares

A prevalência de lesões oculares externas no LE não está bem documentada. Episclerite é associada à inflamação mediada por imunocomplexos e vasculites e pode estar presente em doenças como a artrite reumatoide ou a granulomatose de Wegener associadas ao LES (Burge et al., 1989). O envolvimento crônico da pálpebra e conjuntiva é visto unicamente no LE (Burge et al., 1989). O envolvimento simétrico do terço externo da pálpebra inferior com eritema e edema predomina precocemente, mas mais tarde há formação de cicatrizes com perda permanente dos cílios

(Burge et al., 1989). Inicialmente, as lesões conjuntivais são placas eritematosas edematosas bem definidas, mas pode haver progressão para cicatrizes conjuntivais (Burge et al., 1989). As lesões conjuntivais respondem a corticoides tópicos, mas assim como as demais lesões mucosas, podem recidivar (Burge et al., 1989).

3.2.2 Manifestações nasais

O septo nasal pode também estar envolvido no LE (Burge et al., 1989). A perfuração do septo nasal no LES foi descrita pela primeira vez em 1969, e ulcerações e perfurações são usualmente associadas a exacerbações agudas e atividade da doença (Burge et al., 1989). Placas eritematosas persistentes, crostas ou cicatrizes do septo nasal anterior podem estar presentes no LECC, mas a patogênese destas lesões é desconhecida.

3.2.3 Manifestações vaginais

A prevalência de envolvimento mucoso-genital em pacientes com LE é desconhecida (Burge et al., 1989). A inflamação vulvo-vaginal pode estar presente no LES, mas é necessário o diagnóstico diferencial com infecções por cândida, que são bastante comuns. As lesões ulceradas agudas específicas no LES são mais comuns na doença ativa (Burge et al., 1989). As lesões crônicas podem ocorrer na vulva no LECC, mas na maioria das vezes, passam despercebidas (Burge et al., 1989).

3.2.4 Lúpus eritematoso oral

Na literatura, a frequência de manifestações orais varia de 9% a 45% no LES e de 3% a 20% no LECC (Jonsson et al., 1984; Burge et al., 1989; Orteu et al., 2001). Lourenço et al. (2006), em estudo com 188 pacientes de LE, encontraram 11,9% de lesões orais. Mais recentemente, em estudo com 46 pacientes com lesões orais, Lourenço et al. (2007) demonstraram uma prevalência maior das lesões orais no LEC (73,9%) que no LES (26,1%).

Uma grande variedade de termos clínicos pouco objetivos tem sido empregada na descrição das lesões mucosas orais (Orteu et al., 2001; Nico et al, 2008). Termos como “lesões orais discoides”, “queilite lúpica”, “placas ulcerativas”, “placas em favo de mel”, “lesões líquen-plano símile”, entre outros, são empregados, não havendo uniformidade entre os trabalhos.

Recentemente, Nico et al. (2008) correlacionaram as lesões orais com as lesões cutâneas do LE, classificando-as em lesões agudas, subagudas e crônicas, com o intuito de se obter uniformidade na classificação dessas manifestações.

3.2.4.1 Lúpus eritematoso oral agudo

As lesões correspondem àquelas do LE cutâneo agudo, podendo, no entanto, estar presentes na ausência dessas. Podem se apresentar como máculas eritematosas circunscritas ou difusas, máculas eritêmato-purpúricas, erosões ou ulcerações com distribuição simétrica ou assimétrica

pela mucosa. Lesões aftoides e bolhosas, hemorragias e gengivites também fazem parte desse espectro (Nico et al., 2008). O palato duro é o local de predileção (Burge et al., 1989). O conceito clássico de que as lesões ulceradas orais representem indício de vasculite local e sistêmica, sugerindo uma pior prognose, foi contestado por Jorizzo et al. (1992), quando esses demonstraram que essas lesões representam, de fato, lesões específicas de LE (mucosite de interface ulcerada) sem implicações prognósticas.

3.2.4.2 Lúpus eritematoso oral subagudo

A lesão oral subaguda caracteriza-se por manchas eritematosas arredondadas, bem demarcadas e levemente deprimidas, mais comuns no palato (Nico et al., 2008). As lesões dos lábios apresentam-se como placas eritematosas descamativas, mal-delimitadas no vermilião (Nico et al., 2008). As manifestações intraorais subagudas são raras, pois a forma subaguda do LE caracteristicamente surge em áreas fotoexpostas (Nico et al., 2008).

3.2.4.3 Lúpus eritematoso oral crônico

A manifestação mais comum da forma oral crônica do LE é a lesão discoide. Caracteriza-se por lesão eritematosa, bem delimitada, arredondada ou irregular, de superfície atrófica ou ulcerada com estrias radiadas brancas e telangiectasias (Burge et al., 1989; Nico et al., 2008). Variantes da forma crônica oral são as lesões queratóticas, verrucosas e em “favo de mel” (Nico et al., 2008). O aspecto “em favo de mel” ocorre em lesões de longa duração e representa um quadro cicatricial. Os lábios podem apresentar lesões discoides bem delimitadas ou difusas que, em geral, ultrapassam o limite do vermilião (Nico et al., 2008).

Lesões mucosas crônicas discoides ocorrem, predominantemente, na mucosa bucal, no processo alveolar, na mucosa labial e na borda do vermilião, e embora sejam descritas tanto na forma sistêmica como na forma crônica, Burger et al. (1989) encontraram essas lesões mais frequentemente no LECC. Seu diagnóstico diferencial deve ser feito com líquen plano e leucoplasia (Plemons et al., 1999; Orteu et al., 2001). Têm uma duração média de 4,2 anos e podem ser assintomáticas em 50% a 80% dos doentes (Orteu et al., 2001). A dor é variável (Nico et al., 2008). Podem ocorrer acompanhadas de lesões cutâneas, porém sua manifestação mucosa exclusiva não é rara (Nico et al., 2008).

Em um estudo prospectivo com 66 doentes com lesões discoides orais seguidas por 6 anos, essas foram o primeiro sinal de doença em 40% dos

doentes com LES, e 24% dos doentes com lesão oral isolada desenvolveram LE cutâneo discoide (Orteu et al, 2001).

3.3 Histopatologia das lesões orais

O LE mucoso se caracteriza histopatologicamente como uma mucosite de interface com hiperqueratose, hiperplasia epitelial alternada com atrofia, alterações da maturação epitelial, vacuolização da camada basal, espessamento da membrana basal (evidenciado pela reação histoquímica de PAS – ácido periódico de *Schiff*) e infiltrado linfo-histiocitário superficial e profundo da lâmina própria, que pode ser focal, intersticial, perivascular ou em faixa justa epitelial. Essas mesmas características comumente estão presentes em outras doenças, exigindo diagnose diferencial apurada (Antonovych, 1995; Callen, 1997; Lee e Ackerman, 1997; Orteu et al., 2001).

Há diferenças histológicas significativas entre LE oral e líquen plano (LP) oral, determinadas por Schiodt em 1984 e confirmadas por Karjalainen et al. em 1989. As características histológicas das lesões orais de LE se diferenciam do LP pela presença de vacuolização de queratinócitos, depósito PAS positivo subepitelial por deposição de imunoglobulinas, edema na parte superior da lâmina própria, espessamento PAS positivo nas paredes dos vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório perivascular ou profundo intenso (Karjalainen et al., 1989). No líquen plano, há cones epiteliais em “dente de serra”, degeneração hidrópica da camada basal mais intensa e destruição focal ou disseminada da membrana basal pelo infiltrado inflamatório, que se apresenta com aspecto liquenoide superficial, com predomínio de linfócitos. As reações liquenoides a drogas diferenciam-se do LE pela presença de células necróticas na camada suprabasal e pela

destruição disseminada da membrana basal pelo infiltrado inflamatório liquenoide linfocítico, com presença de eosinófilos (Karjalainen et al., 1989).

Estudos imuno-histoquímicos de lesões orais de LE mostram alterações na maturação epitelial determinada pela expressão alterada de citoqueratinas. Lourenço et al., em 2006, demonstraram a presença das citoqueratinas (CK) 1, CK 5/6, CK14 e CK16 em 26 casos de LE oral, indicando processo de diferenciação, hiperproliferação e ativação de queratinócitos, respectivamente. Sugere-se que essa expressão seja estimulada pelo aumento de citocinas (Lourenço et al., 2006). Recentemente, Lourenço et al. (2007) estudaram os componentes do infiltrado inflamatório de lesões orais de 46 doentes. Demonstraram, por estudos de imuno-histoquímica, o predomínio de linfócitos T, principalmente dos subtipos CD3+ e CD4+, seguidos por CD8+ no infiltrado inflamatório das lesões orais do LE.

3.4 Imunofluorescência direta das lesões orais

O diagnóstico histopatológico da lesão oral do LE pode ser incrementado pelo exame de imunofluorescência direta. As imunoglobulinas (Ig) IgA, IgM, IgG e o complemento C3 podem ser encontrados depositados na zona da membrana basal (ZMB) das lesões orais de LE, de forma focal ou contínua, com padrões variados tais como o homogêneo, o fibrilar, o linear e o granuloso (Orteu et al., 2001; Sampaio e Rivitti, 2007; Lourenço et al., 2007). Depósitos de IgG e IgA são os mais específicos para as lesões orais discoides, e os depósitos de IgM mostram maior sensibilidade (Orteu et al., 2001). As lesões orais de LE demonstram, comumente, reatividade para IgM e C3, no entanto, Lourenço et al. (2007) relataram predominância de IgG com ou sem C3 em um padrão linear.

A imunofluorescência direta auxilia no diagnóstico diferencial das lesões orais de LE e líquen plano (Burge et al., 1989; Orteu et al., 2001; Lourenço et al., 2007). O depósito de imunorreagentes na ZMB pode ser demonstrado no LES (em 100% da mucosa lesada e em 75% da não lesada) e no LE discoide (em 73% da mucosa lesada). Raramente está presente no líquen plano (4%) e na leucoplasia (3%) (Orteu et al., 2001). A presença da banda lúpica (depósito conjunto de IgA, IgG, IgM e complemento C3 na ZMB) pode ser pesquisado pelo teste da banda lúpica, método importante para o diagnóstico do LES (Sampaio e Rivitti, 2007).

3.5 Etiopatogenia do lúpus eritematoso

A causa do LE permanece ainda desconhecida. Sua etiopatogenia é considerada multifatorial, envolvendo fatores genéticos, hormonais e exógenos, que influenciam o sistema imune em múltiplos níveis, levando às numerosas anormalidades imunorregulatórias (Duarte, 2004; Herndon et al., 2005; Herrmann et al., 2000; Costner e Sontheimer, 2003).

A patogênese das lesões cutâneas específicas do LE, desde a sequência dos eventos que iniciam a resposta autoimune até o desenvolvimento das lesões cutâneas, permanece desconhecida (Lee, 2008). No entanto, acredita-se que diversos estímulos, tais como drogas, metais pesados, solventes orgânicos, traumas cutâneos, vírus, bactérias e a radiação ultravioleta (UV), tenham grande participação na formação de uma fase de autoimunidade em indivíduos suscetíveis geneticamente. Esta fase é caracterizada pelo aparecimento de células T autorreativas, que perdem sua capacidade de autotolerância (Herndon et al., 2005). Dentre esses estímulos, a genética e os fatores ambientais têm um papel importante na iniciação e na perpetuação da resposta autoimune, tanto no LES (Lee, 2008) quanto no LE cutâneo (Kuhn et al., 2006; Werth, 2007; Lin et al., 2007; Kuhn, 2008; Furukawa, 2009).

Com o crescente conhecimento do processo inflamatório do LE, tem-se uma nova percepção do papel da indução da radiação ultravioleta nas citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão. Diversos estudos demonstram que a apoptose, a necrose, os autoanticorpos, as

células dendríticas plasmocitoides, as células T, as células B e as alterações vasculares têm participação no processo de indução das lesões cutâneas do LE (Werth, 2007).

3.5.1 Fatores genéticos

A importância da herança genética na etiopatogenia do LE se observa pelo maior risco de desenvolvimento da doença em irmãos de portadores de LE (20 vezes maior) e pela maior incidência de LES em gêmeos monozigóticos (25% a 57%) que em dizigóticos (2% a 9%) (Herndon et al., 2005; Sestak et al., 2005).

Múltiplos genes contribuem para a suscetibilidade do desenvolvimento do LES. Lócus gênicos presentes no braço longo do cromossomo 1 humano estão associados ao LES, assim como outros que codificam moléculas que estão envolvidas em diversos mecanismos tais como: a) apoptose (ex.: Fas e Fas ligante); b) ativação e regulação de células B (ex.: Fc receptores, tais como Fc γ RIIA, Fc γ RIIIA); c) ativação e proliferação de células T (ex.: IL-2); d) recrutamento de monócitos (ex.: TNF- α); e) proliferação celular (ex.: p21); f) componentes de complementos (C) (ex.: receptores de C1, C2 e proteína C1q); g) produção de citocinas (ex.: IL-2, IL-10, IFN) (Nath et al., 2004; Herndon et al., 2005; Sestak et al., 2005; Lee, 2008).

Suárez et al., em 2005, em um estudo com 248 pacientes, demonstraram que o aumento de genótipos promotores de TNF α representa um significativo fator de risco para o LES e que a interação de IL10 e TNF α

influencia na suscetibilidade para LED e no surgimento de autoanticorpos específicos em paciente com LES (Suárez et al., 2005).

Recentemente, foi encontrado um polimorfismo do alelo do gene humano promotor de TNF- α na posição -308 (Werth et al., 2000). O alelo comum (“selvagem”) -308G, também chamado de alelo TNF1, é observado em 80% dos caucasianos e em 92% dos negros americanos. Já o alelo (polimorfismo) -308 A é raro e é chamado de alelo TNF 2 (Werth et al., 2000).

O TNF- α -308 A (TNF2) está associado ao aumento da produção de TNF- α . A presença deste promotor está associada com o maior risco de LES em negros americanos, de LECSA fotossensíveis e LE cutâneo neonatal (Lin, 2007).

A relação do TNF2 com LECSA foi observada por Werth et al. em 2000. Em um estudo com 21 doentes com LECSA e 20 doentes com LED, demonstrou-se que o TNF2 é mais frequente nos indivíduos com LECSA que em indivíduos com LED. Porém, esta associação (TNF2 e LECSA) somente ocorre na presença de HLA-DR3 (Werth et al, 2000). Isso se deve ao fato de TNF2 estar fortemente ligado ao HLA-A1, HLA-B8 e HLA-DR3. Por sua vez, o HLA-DR3 está relacionado com a presença de anticorpos anti-Ro e anti-La, o que determina a fotossensibilidade (Rosenbaum et al., 2005; Duarte, 2004).

Recentemente, observou-se associação da perniose lúpica familiar (“chilblain lupus”) com o locus gênico localizado no cromossomo 3p (Werth, 2007). Segundo Werth, essas observações levam a acreditar que a

predisposição para os subtipos do LE cutâneo esteja relacionada com diferentes genes (Werth, 2007).

Outra associação genética com LE cutâneo é a deficiência de C1q. Há evidências de que C1q se ligue a células apoptóticas e participe da limpeza dos queratinócitos apoptóticos. A sua deficiência genética determina acúmulo de células apoptóticas, que participam da indução da autoimunidade. A deficiência de C2 e C4 está associada ao LECSA (Werth, 2007; Lin et al., 2007).

3.5.2 Envolvimento hormonal

A alta incidência no sexo feminino (9:1) em idade fértil e a maior probabilidade de agravamento da doença durante a gestação sugerem a atuação hormonal na etiopatogenia do lúpus (Duarte, 2004).

O estradiol aumenta a ligação dos anticorpos anti-Ro e anti-La com queratinócitos irradiados, sugerindo uma ligação da prevalência do LE em mulheres (Rosenbaum et al., 2005).

O estrógeno teria um efeito direto no desenvolvimento de autoanticorpos, como sugerem estudos utilizando camundongos "lúpus-prone" tratados com tamoxifeno, os quais apresentaram diminuição dos anticorpos IgG3 anti-DNA e antiproteínas nucleares e redução da proteinúria e da mortalidade (Rosenbaum et al, 2005).

3.5.3 Autoanticorpos

Existe uma associação importante dos autoanticorpos com o LE.

Experimentalmente, a nefrite lúpica pode ser reproduzida em camundongos por meio da injeção de autoanticorpos anti-DNA (Tsao et al., 1992).

Há autoanticorpos relacionados às lesões cutâneas do LE, como anti-DNA dupla hélice (anti-dsDNA), anti-SSB/La e anti-SSA/Ro (Lin et al., 2007). As lesões cutâneas agudas de LE estão relacionadas ao anti-dsDNA (Wysenbeek et al., 1992; Lee, 2008). O autoanticorpo anti-Ro está fortemente relacionado com a fotossensibilidade, com as lesões cutâneas subagudas do LE e com o lúpus neonatal, podendo estar presente, ainda, em um grande número de doentes com lesões cutâneas crônicas (Lee et al., 1994; Lee, 2005; Lin et al., 2007; Lee, 2008).

3.5.4 Radiação ultravioleta

Diversos estudos têm demonstrado tanto *in vivo* quanto *in vitro* os efeitos deletérios da radiação ultravioleta nos pacientes com LE (Norris et al., 1997; Sontheimer et al., 1997). Os diferentes espectros, tanto UVA quanto UVB, têm um importante papel na iniciação e na exacerbação das lesões cutâneas do LE (Lehmann et al., 1990; Kuhn et al., 2001; Lee, 2008) e potencializam sintomas sistêmicos da doença (Lin et al., 2007).

3.6 Radiação ultravioleta e lúpus eritematoso

Na literatura, diversos trabalhos demonstram que a radiação ultravioleta é um importante mecanismo de indução da lesão de LE (Norris et al., 1997; Rosenbaum et al., 2005; Werth, 2007; Lin et al., 2007; Kuhn et al., 2008). Acredita-se que sua ação ocorra por meio da indução da apoptose, da formação de autoanticorpos e da indução de mediadores inflamatórios (Caciola-Rosen et al., 1997; Bijl et al., 2006; Werth, 2007; Kuhn et al., 2008).

3.6.1 Radiação ultravioleta e a formação de autoanticorpos

A ligação entre a radiação ultravioleta e a indução de autoimunidade é explicada por um modelo centrado na apoptose (Caciola-Rosen et al., 1994; Norris et al., 1997). Segundo Norris et al. (1997), a apoptose é um mecanismo importante na formação de autoanticorpos no LE.

Caciola-Rosen et al., em 1994, demonstraram que após a ação da radiação ultravioleta, queratinócitos crescidos em cultura entram em um processo de apoptose (morte celular programada), programa bioquímico central no qual há condensação nuclear, contração citoplasmática e seus componentes celulares são “envelopados” (Caciola-Rosen et al., 1994 e 1997). Durante este processo, as estruturas intracelulares são translocadas para a superfície da célula, dando origem a dois grupos de debris ou corpos

apoptóticos (os pequenos e os grandes), permitindo sua detecção pelo sistema imune (Caciola-Rosen et al., 1994 e 1997; Norris et al., 1997; Rosenbaum et al., 2005). Os pequenos são constituídos principalmente de fragmentados de RNA, de ribossomos e da ribonucleoproteína Ro. Os grandes contêm DNA, antígenos Ro e La e pequenas ribonucleoproteínas nucleares (Caciola-Rosen et al., 1994). Modificações oxidativas provocam união dessas diferentes moléculas, transformando-as em autoantígenos (Caciola-Rosen et al., 1994). Os restos apoptóticos e autoantígenos são, então, fagocitados pelas células dendríticas e macrófagos locais e sofrem modificações estruturais, produzindo epítomos que ligam-se a moléculas dos complexos de histocompatibilidade (MHC) classe I e II (Rosenbaum et al., 2005). Esses autoantígenos modificados ativam células T autorreativas, as quais, auxiliadas por células B, reconhecedoras de autoantígenos nucleares, resultam na produção de autoanticorpos pelas células B. Os imunocomplexos e/ou autoanticorpos daí resultantes depositam-se em vários órgãos, causando danos (Herrmann et al., 2000; Costner e Sontheimer, 2003; Duarte, 2004; Herndon et al., 2005; Lin et al., 2007).

3.6.2 Radiação ultravioleta e apoptose

Tanto a radiação ultravioleta A (UVA) (de 320nm a 400 nm) quanto a UVB (de 290nm a 320 nm) são indutoras de apoptose na epiderme (Rosenbaum et al., 2005). Porém, a UVB é considerada a mais potente, pois não penetra profundamente nas camadas da epiderme, sendo absorvida fortemente pelo DNA e pelas proteínas (Bijl et al., 2006).

Queratinócitos basais são relativamente resistentes a apoptose. Porém, queratinócitos suprabasais são mais vulneráveis à apoptose induzida pela radiação ultravioleta (Lin et al., 2007). Os queratinócitos suprabasais apoptóticos são chamados de “sunburn cells”, e sua presença, assim como testes para a detecção de fragmentos de DNA, evidenciam a apoptose (Rosenbaum et al., 2005).

O mecanismo da apoptose induzida pela radiação ultravioleta é bastante complexo e inclui: a) dano direto ao DNA (Bijl et al., 2006; Lin et al., 2007); b) aumento de mediadores (tais como citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa e beta (TNF- α e β), interleucina 1 (IL-1) e interferon gama (IFN- γ) (Norris et al., 1997); c) ativação de ligantes de receptores de morte de membrana como Fas e FasL (Bijl et al., 2006; Lin et al., 2007); d) formação de ROS (espécie oxigênio reativa) (Bijl et al., 2006; Lin et al., 2007); e) aumento da expressão da proteína p53 (supressor tumoral que se encontra aumentado em resposta ao dano do DNA induzido pela radiação ultravioleta) (Werth, 2007); f) mecanismos celulares citotóxicos (linfócitos T citotóxicos e células “Natural Killer” - NK) (Werth, 2007).

Em condições normais, o sistema imune apresenta mecanismos para remover esses restos apoptóticos e manter a homeostase. Porém, no LE há um acúmulo de células apoptóticas (Norris et al., 1997; Lin et al., 2007). Não se sabe ao certo se esse desequilíbrio se deve ao aumento da produção de células apoptóticas ou à diminuição da eliminação destas ou a ambos os eventos (Lin et al., 2007). Mas acredita-se que o aumento de material pró-inflamatório oriundo das células mortas funciona como um fator importante no desenvolvimento das lesões cutâneas do LE (Bijl et al., 2006).

Além de promover a apoptose e a formação de neo-antígenos, a radiação ultravioleta induz e modula o aumento de mediadores inflamatórios como as citocinas (Norris et al., 1997; Rosenbaum et al., 2005; Werth, 2007; Lin et al., 2007; Kuhn et al., 2008).

3.7 Citocinas

Descritas pela primeira vez em 1975, as citocinas são um grupo heterogêneo de mediadores protéicos tanto da imunidade inata como da específica (Abbas et al., 2000; Schwarz, 2008). São pequenas proteínas (8-80 KD de peso molecular) sintetizadas, em geral em resposta a estímulos inflamatórios ou antigênicos, e que atuam localmente de maneira parácrina (ação sobre células próximas), autócrinas (na própria célula que a produziu) ou endócrina (em célula distante), ligando-se aos receptores de alta afinidade nas células alvo (Abbas et al., 2000; Schwarz, 2008; Vasconcelos, 2009).

Tipos celulares diferentes podem produzir as mesmas citocinas, e estas, individualmente, podem atuar sobre muitos tipos celulares. As ações de diferentes citocinas são muitas vezes redundantes e exercem influência nas ações de outras citocinas (Abbas et al., 2000).

Após a ligação das citocinas aos receptores, ocorre a indução de uma cascata de eventos que causa inibição ou ativação da transcrição de genes controlados por elas (Vasconcelos, 2009). As células podem responder a ação das citocinas de várias formas: proliferação e diferenciação, inibição do crescimento, apoptose, quimiotaxia (migração orientada das células), quimiocinese (migração aleatória de células), resistência à infecção viral, promoção de adesão intercelular e regulação da adesão à matriz extracelular (Vasconcelos, 2009).

São conhecidas até o momento mais de 200 citocinas humanas. Consideram-se como citocinas as interleucinas (IL-1 a IL-22), os interferons (IFN), os fatores estimuladores de colônias (CSF), os fatores de necrose tumoral (TNF), os fatores de crescimento (GF) e as quimiocinas (Schwarz, 2008). A nomenclatura das citocinas não é unificada e elas podem ser classificadas de acordo com suas principais ações (Abbas et al., 2000; Sampaio e Rivitti, 2007). Abbas et al. (2000) classificam as citocinas em três grupos, a seguir:

Grupo 1 - consiste de citocinas que medeiam a imunidade inata e inclui as:

- a) citocinas virais (Interferon tipo 1, IL-15, IL-12);
- b) citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6 e quimiocinas);
- c) citocinas regulatórias (IL-10).

A fonte celular predominante dessas moléculas são os fagócitos mononucleares.

Grupo 2 – em grande parte, derivadas dos linfócitos T estimulados por antígenos, e medeia e regula a imunidade específica. Inclui:

- a) IL-2 – principal fator de crescimento das células T;
- b) IL-4 – maior regulador da síntese da IgE;
- c) fator de crescimento transformador beta (TGF- β), que inibe a resposta dos linfócitos;

- d) interferon gama (IFN- γ) – principal ativador dos fagócitos mononucleares;
- e) linfotóxina – ativador dos neutrófilos;
- f) IL-5 – ativador dos eosinófilos.

Por meio das ações dessas e de outras citocinas efetoras, a resposta imune específica é capaz de focalizar e intensificar a resposta da imunidade inata.

Grupo 3 – (agrupadas como fatores estimuladores de colônia) consiste de citocinas derivadas de células do estroma da medula óssea e das células T, as quais estimulam o crescimento dos precursores da medula óssea, proporcionando, assim, uma fonte adicional de leucócitos inflamatórios (ex.: ligante do C-Kit e a IL-7), que exercem papel central na linfopoiese.

A classificação das citocinas pode ser também baseada no fenótipo da célula T que lhe deu origem e tem propósitos fundamentalmente didáticos. Três subgrupos de linfócitos T CD4⁺ são identificados em ratos e humanos: células Th1, Th2 e Th0 (Toro et al., 2000). Além destes, são descritos em humanos os subtipos Th3 e Th17, caracterizados por expressões de citocinas e funções efetoras distintas (Dean et al., 2000; Bettelli et al., 2007; Oukka, 2008; Vasconcelos, 2009).

Em resposta à estimulação antigênica, as células Th1 secretam interleucina 2 (IL-2), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interferon gama (IFN- γ), e promovem a imunidade mediada por células (Toro et al., 2000).

As células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, favorecem a imunidade humoral e induzem a produção de anticorpos (Toro et al., 2000).

As Th0 são capazes de secretar ambas as citocinas, Th1 e Th2, e estimular a diferenciação tanto para Th1 como para Th2 (Toro et al., 2000).

Os subgrupos Th1 e Th2 são capazes de regular um ao outro, pois a secreção de IFN gama pelas células Th1 pode inibir a proliferação de células Th2 e, em contraste, a secreção de IL-10 pelas células Th2 pode inibir as células Th1 (Toro et al., 2000). Níveis elevados de IL-10 aumentam a ativação e a diferenciação de células B e inibem a geração da resposta Th1 (Toro et al., 2000).

A IL-12 e o fator de necrose tumoral (TNF) alfa secretados pelos macrófagos apresentadores de antígenos são fortes promotores de citocinas do tipo Th1 (Toro et al., 2000).

3.8 Interleucinas

3.8.1 Interleucina 4 (IL-4)

Identificada em 1982, a IL-4 tem aproximadamente 20 KD e pertence ao grupo das citocinas mediadoras e reguladoras da imunidade específica (Husband et al., 1999; Abbas et al., 2000). O gene de IL-4 é encontrado junto a um grupo de genes de citocinas localizados no cromossomo 5 humano (Husband et al., 1999).

A IL-4 é sintetizada por linfócitos T (CD4+ e CD8+), principalmente Th2 (Husband et al., 1999). Porém, também pode ser produzida por outras células, como queratinócitos, eosinófilos, mastócitos, basófilos e células NK (Husband et al., 1999; Vasconcelos, 2009).

A IL-4 exerce importantes ações sobre diversos tipos celulares, tais como linfócitos T e B, macrófagos, mastócitos, monócitos, fibroblastos, células endoteliais e do sistema nervoso central (Abbas et al., 2000; Vasconcelos, 2009).

É necessária para a produção de IgE e IgG4 e constitui um fator de crescimento e diferenciação de células T e B, predominantemente Th2. Tem a capacidade de estimular a expressão da molécula-1 de adesão celular vascular (VCAM-1) nas células endoteliais, resultando em aumento da

ligação dos linfócitos, monócitos e eosinófilos na parede dos vasos. Constitui um fator de crescimento para mastócitos (Abbas et al., 2000).

A IL-4 induz a expressão de antígenos MHC classe I e II, e nos macrófagos, inibe a liberação de IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e $\text{TNF}\alpha$ (Sampaio e Rivitti, 2007). É inibida pelo $\text{INF-}\gamma$ (Sampaio e Rivitti, 2007).

3.8.2 Interleucina 5 (IL-5)

É classificada por Abbas et al. (2000) como uma citocina mediadora e reguladora da imunidade específica. Tem aproximadamente 20 KD e é produzida pela subpopulação Th2 das células T CD4+, eosinófilos e mastócitos ativados (Husband et al., 1999; Abbas et al., 2000; Vasconcelos, 2009).

A IL-5 promove o crescimento e a diferenciação de eosinófilos e ativa eosinófilos maduros (Abbas et al., 2000). Determina a proliferação e a secreção de imunoglobulinas pelas células B ativadas, e em sinergia com outras citocinas, como IL-2 e IL-4, estimula o crescimento e a diferenciação da linhagem de células B (Husband et al., 1999; Abbas et al., 2000).

É inibida pelo $\text{IFN-}\gamma$ e IL-10 (Abbas et al., 2000; Sampaio e Rivitti, 2007).

3.8.3 Interleucina 6 (IL – 6)

IL-6 é uma citocina Th2 com múltiplos efeitos em diversos sistemas, incluindo regulação do sistema imune (Linker-Israeli, 1992). Age no desenvolvimento e na ativação dos linfócitos B, sendo que sua principal função é a promoção de imunoglobulinas produzidas por células B ativadas (Herndon et al., 2005).

Pertencente ao grupo de citocinas mediadoras e reguladoras da imunidade natural, a IL-6 tem o peso de 26 KD. É secretada por muitos tipos celulares, dependendo do estímulo apropriado. Pode ser produzida pelos linfócitos T e B, monócitos, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, osteoblastos, células musculares, condrócitos, células endoteliais e hepatócitos (Husband et al., 1999). Atua não só sobre o sistema imune como também sobre o sistema neural, endócrino, hepático e hematológico (Husband et al., 1999).

É secretada em resposta a diversos estímulos, tais como vírus, bactérias, traumas e outras citocinas, como IL-2 e IL-4, mas, principalmente, por TNF e IL-1 (Abbas et al., 2000).

Está envolvida na patogenia de diversas doenças, como a psoríase, a artrite reumatoide e o sarcoma de Kaposi e apresenta-se em níveis elevados no LES (Abbas et al., 2000; Sampaio e Rivitti, 2007).

3.8.4 Interleucina 10 (IL- 10)

Descrita em 1989 por Mosmann et al., a IL-10 é uma citocina de 18 KD cujo gene é locado no cromossomo 1. É produzida por linfócitos T (principalmente Th2), células B, monócitos, eosinófilos, mastócitos, células de langerhans, macrófagos ativados e queratinócitos em condições fisiológicas (Husband, 1999; Abbas et al, 2000; Weiss et al., 2004). Sua produção se eleva na presença de endotoxinas, TNF- α e catecolaminas (Weiss et al., 2004).

Produce efeitos imunossupressores e imunoestimuladores (Weiss et al., 2004). Nos linfócitos Th1, suprime a síntese de suas citocinas, diminuindo as respostas mediadas por células (Weiss et al., 2004). Nos linfócitos B, aumenta a proliferação e a produção de anticorpos (Weiss et al., 2004; Sampaio e Rivitti, 2007). Nos macrófagos, inibe a função da ativação das células T. Ainda nos macrófagos, diminui a produção de TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (Abbas et al., 2000; Weiss et al., 2004).

3.8.5 Interleucina 12 (IL-12)

A IL-12 é uma importante reguladora de outras citocinas, com um papel determinante na promoção da resposta Th1 (Werth et al., 2003). Inicialmente, foi identificada como derivada do macrófago ativador da função citolítica das células NK. Atualmente, é conhecida como uma potente indutora da produção de IFN- γ pelas células T e NK (Abbas et al., 2000). As principais fontes de IL-12 ativas parecem ser os fagócitos mononucleares, células dendríticas ativadas e células B (Abbas et al., 2000; Vasconcelos, 2009).

A IL-12 liga-se a receptores presentes nas células T CD4+ estimuladas por antígenos e promove sua diferenciação em células Th1, que auxiliam a imunidade mediada por fagócitos (Abbas et al., 2000). Potencializa as funções citolíticas das células NK e das células T CD8+ ativadas (Abbas et al., 2000). Estimula também, indiretamente, a transcrição dos genes de citocinas liberadas por Th1, principalmente IFN- γ (Abbas et al., 2000). O IFN- γ produzido pelas células Th1 inibe a produção de células Th2, promovendo a predominância das células Th1 (Abbas et al., 2000).

A IL-12 proporciona uma importante ligação entre a imunidade específica e a imunidade adaptativa (Abbas et al., 2000).

3.8.6 Fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α)

TNF- α é uma proteína de aproximadamente 17 KD, contendo 157 aminoácidos, determinada por um único gene localizado no cromossomo 6 humano (Abbas et al., 2000; Gómez et al., 2004). Os maiores produtores de TNF- α são as células da linhagem dos monócitos e macrófagos. Porém, sua produção pode ocorrer por outras células, como linfócitos T, neutrófilos e células endoteliais, queratinócitos, dendrócitos, células NK, mastócitos, basófilos, células da microglia e certas células tumorais, em diferentes circunstâncias (Abbas et al., 2000; Gómez et al., 2004).

As ações do TNF- α são dependentes de sua quantidade. Quando produzido em pequena quantidade, age localmente como um regulador dos leucócitos e células endoteliais (Abbas et al., 2000). Induz as células endoteliais vasculares a expressarem receptores de superfície, como as moléculas de adesão, tornando-as aderentes a leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos). Em pequenas quantidades também ativa leucócitos inflamatórios e induz diversas células a secretarem quimiocinas que participam do recrutamento leucocitário. Desta forma o TNF- α contribui para o acúmulo de leucócitos em locais de inflamação (Abbas et al., 2000).

De forma aguda, estimula o sistema imune, mas após exposição prolongada, TNF- α em quantidade excessiva induz imunossupressão (Gómez et al., 2004). Quando produzido em maiores quantidades, o TNF- α

entra na corrente sanguínea. Nestes casos, o TNF- α funciona como pirógeno endógeno, atua sobre fagócitos mononucleares e talvez sobre as células endoteliais vasculares, para estimular a secreção de IL-1 e IL-6 na circulação (Abbas et al., 2000). Altos níveis de TNF- α geram sintomas sistêmicos que incluem febre e síntese de proteínas de fase aguda, assim como caquexia, trombose intravascular e choque (Gómez et al., 2004).

TNF- α tem diferentes efeitos nos linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas, assim como no processo de morte celular programada (apoptose) (Aringer et al., 2003). Age na interação entre as células, contribuindo de forma importante no tipo de resposta imune (Aringer et al., 2003).

Nos linfócitos T ativados, TNF- α promove estímulo, resultando em maior ativação e proliferação dessas células. No entanto, a exposição crônica a TNF- α leva a perda reversível do complexo de receptores de superfície dos linfócitos T, tornando-os menos responsivos (Aringer et al., 2003).

Para os linfócitos B, TNF- α é fator de crescimento, e aqueles aumentam a produção de TNF- α de maneira autócrina. TNF- α também age sobre linfócitos B indiretamente por meio da indução da produção de IL-6, a qual exerce múltiplos efeitos sobre o desenvolvimento e a ativação dos linfócitos B (Aringer et al., 2003).

Para as células dendríticas, TNF- α constitui um fator de ativação e maturação (Aringer et al., 2003).

TNF- α age também induzindo IFN- γ , citocina com papel importante no LE (Aringer et al., 2003).

Na pele inibe a proliferação epidérmica de queratinócitos e melanócitos, diminui o número de células apresentadoras de antígenos, acentua o efeito imunossupressor da radiação UVB, estimula a síntese de colágeno e induz a produção de moléculas de adesão (ICAM-1) (Sampaio e Rivitti, 2007).

3.8.7 Interferon gama (IFN- γ)

O IFN- γ é a mais importante citocina pró-inflamatória produzida pelas células Th1 (Abbas et al., 2000). É produzida predominantemente por células T CD4+ (Th0 e Th1), células T CD8+ e células NK (Husband et al., 1999). Sua transcrição é diretamente iniciada em resposta a antígenos e é potencializada pela IL-2 e IL-12 (Abbas et al., 2000). A principal ação de IFN- γ é promover reações inflamatórias ricas em macrófagos. Para que isto ocorra promove diversas ações que incluem a ativação de fagócitos mononucleares, a mediação da ativação de macrófagos pelas células T, a diferenciação de linfócitos T, ativação de neutrófilos e o estímulo à atividade citolítica das células NK (Abbas et al., 2000). Nas células endoteliais, o IFN- γ promove a adesão de linfócitos T CD4+ e potencializa muitas das ações do TNF- α sobre estas células, contribuindo para a formação da resposta inflamatória. O IFN- γ pode facilitar tanto a resposta imune humoral quanto a celular e isto é definido por ações do IFN- γ na fase de reconhecimento da resposta imune, através da indução do aumento da expressão das

moléculas da classe I e II do MHC (Abbas et al., 2000). O IFN- γ inibe as reações ricas em eosinófilos dependentes da IgE. Isto é resultante de sua ação inibitória sobre diversos efeitos de IL-4, como a indução por IL-4 de IgG₁ e IgE (Husband et al., 1999).

Sua produção excessiva participa da indução da autoimunidade (Sampaio e Rivitti, 2007).

3.9 Radiação ultravioleta e citocinas

A radiação ultravioleta altera a expressão de citocinas na pele, promovendo apoptose e inflamação. Embora os produtos finais da apoptose sejam similares, os mecanismos de indução entre UVA (de 320nm a 400 nm) e UVB (de 290nm a 320 nm) são diferentes. UVA e UVB induzem diferentes grupos de mediadores inflamatórios e, portanto, têm diferentes impactos na resposta imune e inflamatória (Rosenbaum et al., 2005).

3.9.1 Radiação ultravioleta, interleucina 10 e interleucina 12

UVA e UVB elevam os níveis tanto de IL-10 quanto de IL-12, porém, UVB produz mais IL-10 e UVA1 produz mais IL-12 (Kondo et al., 1998; Rosenbaum et al., 2005).

A IL-10 produzida pelos queratinócitos irradiados induz tolerância e imunossupressão local e sistêmica por promover uma resposta celular do tipo Th2 (Shreedhar et al., 1998). Enk et al. (1993) estudaram os efeitos de IL-10, obtida de queratinócitos irradiados, sobre as células de Langerhans e observaram que IL-10 bloqueia a apresentação de antígenos para células Th1, mas não interfere na apresentação de antígenos para o clone de células Th2. Além disso, observaram que IL-10 torna a população de células Th1 tolerante à estimulação antigênica (Enk et al., 1993).

IL-12 promove uma resposta do tipo Th1 (Rosenbaum et al., 2005) e pode reverter a imunossupressão e a tolerância promovida pela IL-10 induzida pela radiação ultravioleta (Rosenbaum et al., 2005). IL-12 tem participação no controle da apoptose induzida pela radiação ultravioleta por meio da inibição do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Werth et al., 2003).

3.9.2 Radiação ultravioleta, interleucina 1 alfa e fator de necrose tumoral alfa

As primeiras citocinas liberadas pelos queratinócitos em resposta à UVB são a IL-1 e TNF- α . O TNF- α e a IL-1 α são responsáveis por:

a) aumentar a produção de TNF- α por queratinócitos de uma maneira autócrina; b) aumentar a expressão de moléculas de adesão, tanto nos queratinócitos como nas células endoteliais (moléculas de adesão intracelular-1 (ICAM-1), E-selectina e moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1)). Essas moléculas de adesão causam recrutamento local de células inflamatórias (Rosenbaum et al., 2005; Werth, 2007; Lin et al., 2007). Rosenbaum et al., em 2005, relataram estudos em que observaram aumento da expressão de moléculas de adesão intracelular-1 (ICAM-1), moléculas de histocompatibilidade classe II (HLA-DR), E-selectina e moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1) nas peles lesadas de pacientes com LECSA, LE discoide e lúpus eritematoso tímido.

O aumento de TNF- α em resposta à radiação ultravioleta leva ao aumento de células apoptóticas, o que sobrecarrega a limpeza dos debris

apoptóticos, podendo levar ao desenvolvimento dos autoanticorpos (Rosenbaum et al., 2005).

O aumento de $\text{TNF-}\alpha$ induzido pela radiação ultravioleta leva, também, ao aumento de mediadores inflamatórios. O $\text{TNF-}\alpha$, além de estar envolvido na mediação da reação inflamatória local na epiderme, pode entrar na circulação e causar efeitos sistêmicos (Werth, 2007).

$\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\alpha$ são chamadas de citocinas primárias, pois em uma segunda fase, são capazes de aumentar outras citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 , prostaglandinas E_2 (PGE_2), IL-8 e o fator de crescimento de colônia de granulócitos e monócitos pelos queratinócitos. Estas moléculas são fatores coestimuladores que levam ao aumento da resposta inflamatória e autoimune (Werth, 2007; Lin et al., 2007).

3.9.3 Radiação ultravioleta, quimiocinas e interferon gama

UVA e UVB modificam a produção de quimiocinas (CXCL1 , CXCL2 , CCL17 , CXCR3 , CXCL9 , CXCL10 , CXCL11) expressas, preferencialmente, na junção dermo-epidérmica e áreas perianexiais (Rosenbaum et al., 2005). Na presença de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$, os queratinócitos irradiados por UVB aumentam a expressão de quimiocinas, que por sua vez aumentam o recrutamento de células inflamatórias (Werth, 2007).

3.10 Citocinas na patogênese do lúpus eritematoso

3.10.1 IFN- γ

O papel do IFN- γ no desenvolvimento do LES foi previamente documentado pelo aparecimento precoce da doença em modelos animais, depois de repetidas injeções de IFN- γ recombinante. O tratamento destes animais, quando jovens, com anticorpos anti-IFN- γ inibia o aparecimento da doença (Csiszár et al., 2000).

O envolvimento do IFN- γ na nefrite lúpica é demonstrado em estudos em camundongos geneticamente modificados (Haas et al., 1998; Dean et al., 2000).

Em humanos, há evidências do papel do IFN- γ no LES (Linker-Israeli, 1992).

Csiszár et al., em 2000, demonstraram expressão aumentada de IFN- γ em células mononucleares obtidas de pacientes com LES. Relataram a expressão aumentada de IFN- γ no soro de pacientes com síndrome nefrítica e a relação entre a produção aumentada de IFN- γ e a severidade da doença (Csiszár et al., 2000).

Kalsi et al., em 2004, relataram a relação da duração do LES com IFN- γ , demonstrando que esta citocina está associada com a fase inicial da doença.

No LE cutâneo, Stein et al., em 1997, demonstraram que a presença de IL-5 associada à produção local de IFN- γ estão relacionadas com sua fisiopatologia (Stein et al., 1997).

Toro et al. observaram a relação de citocinas tipo I, representadas por IFN- γ e IL-2, com LE discoide (Toro et al., 2000).

Em 2005, Rosenbaum et al. relataram que queratinócitos sob ação de radiação ultravioleta e na presença de IFN- γ aumentam a expressão de quimiocinas que estão envolvidas no recrutamento de células inflamatórias.

Lin et al. (2007) relataram a participação de IFN- γ na promoção da apoptose por meio do estímulo à proteína p53 (supressor tumoral) e aos linfócitos T citotóxicos e células “Natural killer” (Lin et al., 2007).

O IFN- γ induz a maturação das células dendríticas imaturas em eficientes células apresentadoras de antígenos, ativando-as de maneira autócrina. Na presença de maciça apoptose e falha dos mecanismos de limpeza das células apoptóticas, células dendríticas são recrutadas e transformadas em eficientes células apresentadoras de antígenos que, na presença de IFN- γ , são ativadas. Este evento pode ser responsável pela quebra na tolerância de autoantígenos e pela ativação do sistema imune (Rosenbaum et al., 2005).

Células dendríticas plasmocitoides são eficientes produtoras de IFN- γ . Um grande número de células dendríticas plasmocitoides produtoras de IFN- γ é encontrado nas lesões cutâneas de LE (Rosenbaum et al., 2005).

3.10.2 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

O envolvimento do TNF- α na patogênese do LE é descrito em diversos trabalhos e passou a ter maior evidência após a introdução da terapia anti-TNF- α (Singh, 1992a; Singh, 1992b; Aringer, 2003; Rahman, 2003). O TNF- α está aumentado no sangue e nos rins de doentes com LES (Dean et al., 2000; Aringer et al., 2003). Observa-se expressão aumentada de TNF- α nos glomérulos em todas as formas de nefrite lúpica, e o grau de expressão de TNF- α tem relação com a atividade da doença renal. Isso sugere envolvimento do TNF- α no processo inflamatório e destrutivo da doença. Especula-se que macrófagos estimulados por complexos imunes presentes no LE induzam maior produção de TNF- α , e este, por sua ação pró-inflamatória, leve a inflamação e destruição (Aringer et al., 2003).

Há estudos utilizando bloqueadores de TNF- α no LES (Uppal et al., 2009). No entanto, a experiência com estes compostos é limitada (Schneider et al., 2005). Segundo Aringer et al. (2003), doentes com LE com comprometimento renal apresentam melhora da proteinúria após tratamento com bloqueadores de TNF- α (infliximab). Bloqueadores de TNF- α , tais como anticorpos humanizados (infliximab), anticorpos humanos (adalizumab) e a fusão de proteínas como TNF- α R e Ig (etanercept), são usados com sucesso para tratamento da psoríase, assim como de doenças autoimunes, como artrite reumatoide e doença de Crohn (Schneider et al., 2005). Porém, há relatos de doentes portadores dessas doenças que desenvolvem anticorpos antinucleares, anticorpos anti-dsDNA (IgM) e síndrome “lúpus

like” durante a terapia anti-TNF- α (Williams et al., 2009). Tanto anticorpos quanto o quadro clínico somente desaparecem após o término do tratamento (Aringer et al., 2003). Experimentos em animais sugerem que a administração de anti-TNF- α pode predispor ao desenvolvimento de LES em humanos (Rahman, 2003).

A capacidade dos bloqueadores de TNF- α de induzir formação de anticorpos e síndrome “lúpus like”, ao mesmo tempo em que diminuem a doença renal, pode ser explicada pela ação dupla do TNF- α no LE. Por um lado, induz inflamação e destruição, e por outro, modula a resposta imune, por meio da ação sobre as várias células (linfócitos T, B, células dendríticas) e a apoptose (Aringer et al., 2003).

Acredita-se que o TNF- α esteja envolvido em diversos mecanismos de indução da lesão de LE. O TNF- α tem papel importante na indução da apoptose causada pela radiação ultravioleta por meio do estímulo à proteína p53, linfócitos T citotóxicos e células “Natural Killer” (Aringer et al., 2003; Werth, 2007; Lin et al., 2007). Durante o processo de apoptose, o TNF- α induz a translocação de antígenos Ro e La intracelulares para a superfície da célula, levando à formação de autoimunidade (Rosenbaum et al., 2005).

Neste cenário, TNF- α aumenta o processo inflamatório e a resposta autoimune por meio da ativação e da maturação de células dendríticas, essenciais na regulação da resposta imune e implicadas na autoimunidade do LE (Aringer et al., 2003; Lin et al., 2007). TNF- α induz quimiocinas e moléculas de adesão intercelulares, como ICAM-1, e de adesão vascular, como VCAM-1, as quais recrutam células inflamatórias, contribuindo para

aumentar ainda mais o processo inflamatório e a injúria tecidual (Rosenbaum et al., 2005; Lin et al., 2007). O TNF- α também induz IFN- γ , citocina com papel importante no LE (Aringer et al., 2003).

A descoberta de polimorfismos no gene promotor de TNF- α aumenta sua importância na patogênese do LE. Doentes que apresentam uma variante no locus -308 A desse gene têm expressão aumentada de TNF- α . Observa-se uma relação entre esses doentes e a frequência de LES e LE subagudo (Werth et al., 2000; Suárez et al., 2005; Werth et al., 2007).

A expressão aumentada de TNF- α é demonstrada por Richaud-Patin et al. (1995) no LES e por Toro et al. (2000) nas lesões cutâneas de LED.

3.10.3 Interleucina 12 (IL-12)

Segundo Rosenbaum et al. (2005), a IL-12 inibe a IL-10 induzida pela radiação ultravioleta. Acredita-se que, desta forma, IL-12 promova a reversão da tolerância e imunossupressão sistêmica induzida por IL-10 (Rosenbaum et al., 2005). Dean et al. (2000) relataram que a produção de IL-12 é diminuída em monócitos de pacientes com LES. Especulam que a diminuição da produção de IL-12 pode ser atribuída à expressão aumentada de IL-10 observada no LES (Dean et al., 2000; Rahamn, 2003; Min et al., 2001).

A IL-12 é uma potente indutora da produção de IFN- γ pelas células T e NK (Abbas et al., 2000). Isso pode explicar os achados de Tucci et al. em 2008. Em estudo com 150 casos de LES, esses autores observaram aumento de IL-12 no soro e na urina somente nos 52 doentes com nefrite lúpica, quando comparados com controles ou doentes com LES sem essa manifestação (n=98). Concluíram que IL-12 pode ser responsável por um desequilíbrio das citocinas para uma resposta do tipo Th1 ao induzir a produção de IFN- γ nesses casos, sendo uma boa indicadora da atividade e severidade da inflamação glomerular (Tucci et al., 2008). Esses achados contrastam com os resultados de Min et al. (2001), que observaram relação da nefrite lúpica com a diminuição de IL-12 e IFN- γ . Em estudo com 40 doentes com LES, encontraram expressão diminuída de IL-12 na cultura de mononucleares obtidos de 17 doentes com nefrite lúpica (Min et al., 2001).

IL-12 parece controlar a apoptose induzida pela radiação ultravioleta. Tanto UVA como UVB induzem IL-12 (Rosenbaum et al., 2005) e IL-12 causa supressão do TNF- α no seu gene promotor (Werth et al., 2003). TNF- α , por sua vez, aumenta a apoptose induzida pela radiação (Rosenbaum et al., 2005). Especula-se que por meio da inibição de TNF- α , IL-12 pode inibir a apoptose.

A IL-12 parece também promover a sobrevivência de queratinócitos irradiados pela radiação ultravioleta, provavelmente aumentando a atividade de enzimas reparadoras de DNA (Rosenbaum et al., 2005; Werth et al., 2007).

Trabalhos recentes sugerem melhora do LE após aplicação de UVA1 (Lin et al., 2007). UVA1 induz a produção de IL-12. Especula-se que os efeitos benéficos de UVA1 no LE ocorreriam pela ação de IL-12 por meio da inibição de TNF- α e a reparação do DNA dos queratinócitos irradiados (Rosenbaum et al., 2005; Werth et al., 2003; Werth, 2007).

3.10.4 Interleucina 10 (IL-10)

Segundo Rahman (2003), há muitas evidências do papel da IL-10 no LES: a) presença de níveis elevados de IL-10 no soro de doentes com LES; b) melhora do LES em animais modelos após aplicação de anticorpo anti-IL-10; c) estudos utilizando anticorpo anti-IL-10 monoclonal endovenoso obtido em murinos mostram melhora clínica de pacientes com LES.

Richaud-Patin et al. (1995) e Csiszár et al. (2000) encontraram expressão aumentada de IL-10 no LES.

Dean et al. (2000) relataram que títulos séricos de IL-10 têm correlação positiva com títulos do anticorpo anti-dsDNA no LES.

Kalsi et al., em 2004, demonstraram a elevação de IL-10, tanto na fase inicial quanto na tardia do LES.

No entanto, em relação ao LE cutâneo não há um consenso. Stein et al. (1997) encontraram expressão positiva para IL-10 em 10 das 19 biópsias cutâneas de LE, porém, Rosenbaum et al. (2005) relataram ausência de correlação do aumento de IL-10 com LE cutâneo.

As alterações no sistema imune observadas no LES podem ser caracterizadas por uma hiperatividade dos linfócitos B e por uma diminuição da resposta imune celular. Esta última se deve tanto a uma disfunção dos linfócitos T “helpers” como das células apresentadoras de antígenos (Weiss et al., 2004). IL-10 é um importante indutor da diferenciação de células B assim como inibe a função de células T “helpers” e de células apresentadoras de antígenos (Weiss et al., 2004). Acredita-se que essa

alteração imunológica do LES tenha relação com o aumento de IL-10 (Weiss et al., 2004).

O aumento de IL-10 no LE é atribuído à sua produção aumentada por células B, monócitos e células T (Rahman, 2003; Csiszár, 2000; Dean, 2000). Por sua vez, o aumento de IL-10 ocasiona uma hiperatividade de linfócitos B que resulta em aumento de imunoglobulinas e síntese de autoanticorpos (Csiszár, 2000).

O possível mecanismo de ação de IL-10 no LES tem relação importante com o balanço entre IL-10 e IL-12 (Rahman, 2003). Tratamentos com anticorpos anti-IL-10 recombinantes revertem a produção deficiente de IL-12 por mononucleares obtidos de doentes com LES. Este achado sugere que a produção baixa de IL-12 observada em doentes com LES pode ser atribuída ao excesso de produção de IL-10 que ocorre na doença (Dean, 2000).

A expressão aumentada de IL-10 pode também afetar a produção de outras citocinas no LES (Csiszár, 2000). Segundo Csiszár et al., o aumento de IL-10 inibe a produção de IL-4 e estimula a produção de IFN- γ pelas células T. Nos macrófagos, diminui a produção de TNF, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (Abbas et al., 2000; Weiss et al., 2004).

Nos queratinócitos, a radiação ultravioleta (UVA e UVB) induz a produção de IL-10. A IL-10 produzida pelos queratinócitos irradiados induz imunossupressão sistêmica e tolerância, por promover resposta Th2 (Rosenbaum et al., 2005). Durante a apoptose causada pela radiação ultravioleta, as células responsáveis por fagocitar os restos apoptóticos,

como os macrófagos, promovem aumento de IL-10, resultando na diminuição da resposta inflamatória. IL-10 inibe a maturação de células dendríticas. Essas células, ao assimilarem material apoptótico, promovem a produção de IL-10 (Rosenbaum et al., 2005).

Alguns autores defendem a existência de um controle genético da IL-10 (Suárez et al., 2005; Weiss et al., 2004; Dean et al., 2000). Polimorfismos presentes na região promotora de IL-10 estão relacionados com LES e com o aumento da produção de IL-10.

3.10.5 Interleucina 6 (IL-6)

Herndon et al. (2005) relataram aumento de IL-6 no fluido cérebro-espinhal de doentes com envolvimento do sistema nervoso central e sua flutuação de acordo com a atividade do LE.

Segundo Linker-Israeli (1992) e Richaud-Patin et al. (1995), mononucleares obtidos de pacientes com LES, expressam aumento de IL-6, porém, sem correlação com atividade da doença.

Dean et al. (2000) relataram que a concentração de IL-6 está aumentada no plasma de pacientes com nefrite lúpica e em espécimes de biopsias renais obtidas de 19 pacientes com nefrite lúpica. Ainda segundo Dean et al. (2000), IL-6 está implicada no desenvolvimento da doença cardiopulmonar em suas várias manifestações, como pericardites, pneumonite lúpica e hipertensão pulmonar.

Na pele, a radiação ultravioleta induz apoptose e a produção de citocinas, como IL-1 e TNF- α . Estas citocinas estimulam a produção de IL-6, que, juntamente com outras citocinas, induzem uma cascata de eventos inflamatórios que participam da formação da lesão de LE (Werth, 2007; Lin et al., 2007). Dean et al. (2000) relataram a presença de IL-6 em 14 de 26 espécimes de biopsias cutâneas obtidas de doentes com vários tipos de LE, com maior presença nas células basais da epiderme, independentemente da forma do LE. Embora IL-6 participe da formação dessas lesões, seu exato mecanismo continua desconhecido.

3.10.6 Interleucina 5 (IL-5)

Stein et al. (1997) demonstraram a expressão aumentada de IL-5 em 16 das 19 espécimes de LE cutâneo. Sugeriram, em seu estudo, que IL-5 combinada com a produção local de IFN- γ pode estar relacionada com a patofisiologia do LE cutâneo.

3.10.7 Interleucina 4 (IL-4)

No LE, IL-4 está geralmente diminuído ou ausente.

Horwitz et al. (1994) observaram expressão diminuída de IL-4 em células mononucleares de pacientes com LES.

Csiszár et al. (2000) demonstraram expressão diminuída de IL-4 em mononucleares de 15 pacientes com LES.

Stein et al. (1997), em estudo com 19 espécimes de LE cutâneo, observaram ausência de IL-4 em todas as lesões.

Toro et al. (2000), em estudo com 8 amostras de LE discoide, encontraram expressão negativa para IL-4 em todas as lesões.

Acredita-se que a diminuição ou ausência de IL-4 no LE se deva ao efeito inibitório de IFN- γ sobre IL-4 demonstrado por Parronchi et al. (1992).

3.11 Desequilíbrio das citocinas no lúpus eritematoso

Diversos estudos sugerem um desequilíbrio da produção de citocinas no LE (Singh, 1992a, Singh, 1992b; Linker-Sraeli, 1992; Richaud-Patin et al., 1995; Dean et al., 2000; Csiszár et al., 2000; Theofilopoulos et al., 2001; Rahman, 2003; Aringer et al., 2003; Kalsi et al., 2004; Herndon et al., 2005). Alguns autores defendem o predomínio de uma resposta do tipo Th1 no LE (Toro et al., 2000; Baechler et al., em 2004; Wenzel et al. em 2005), enquanto outros defendem uma resposta do tipo Th2 (Richaud-Patin et al., 1995; Barcellini et al., 1996; Stein et al., 1997). Os trabalhos existentes na literatura pesquisaram citocinas no soro, em culturas de mononucleares ou, em menor número, em lesões cutâneas de LE.

3.11.1 Estudos em células mononucleares

Richaud-Patin et al. em 1995, estudaram a expressão dos genes de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α em células mononucleares de 17 doentes com LES, com doença ativa ou não, por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (PCR-TR). Observaram aumento da expressão de IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α , sugerindo um predomínio da resposta Th2.

Barcellini et al., em 1996, estudaram a expressão de IL-2, IL-6, IL-10 e IFN- γ em cultura de células mononucleares de doentes com LES ativo.

Observaram o aumento da expressão de citocinas IL-6, IL10 sem correlação com a atividade da doença, defendendo uma resposta Th2.

Baechler et al., em 2004, estudaram a participação do IFN- α no LES. Concluíram que os níveis séricos de IFN- α e a expressão de seus genes são elevados nos pacientes com LES, defendendo uma resposta Th1.

3.11.2 Estudos em lesões cutâneas.

Há poucos relatos do perfil das citocinas nas lesões cutâneas do LE.

Em 1997, Stein et al. estudaram citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ) de lesões cutâneas de 19 pacientes com LE (9 LED, 2 LECSA, 8 LES) por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (PCR-TR). Determinaram que a expressão do padrão de RNAm das citocinas nas lesões cutâneas de LE não varia com os diferentes subtipos de LE, títulos de anticorpos nucleares ou magnitude da inflamação. Encontraram a presença, principalmente, de IL-5 mRNA nas lesões cutâneas do LE e sugeriram que citocinas Th2 combinadas com a produção local de IFN γ podem estar relacionadas com a fisiopatologia das lesões cutâneas (Stein et al., 1997).

Toro et al., em 2000, estudaram as citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4, TNF- α e IL-1 β de 11 biopsias de lesões cutâneas discoides e sugeriram que o lúpus eritematoso discoide (LED) está associado à citocinas Th1, caracterizadas pela expressão de IL-2 e IFN γ , e que estas (citocinas do tipo1) teriam papel crítico na indução, no desenvolvimento e na manutenção do LED.

Wenzel et al., em 2005, confirmaram a presença de IFN tipo1 (IFN- α /IFN- β) (por imuno-histoquímica) nas biopsias cutâneas de 21 pacientes com LE com manifestação exclusivamente cutânea, defendendo uma resposta Th1.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre o perfil das citocinas nas lesões orais do LE, o que nos motivou a realizar o presente trabalho.

4. Métodos

4. Métodos

4.1 Casuística

Foram selecionados, dos arquivos do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), espécimes de biopsia de lesões orais de 29 doentes com diagnóstico clínico e histopatológico de lúpus eritematoso (LE), sem restrição de gênero ou faixa etária, com ou sem tratamento, acompanhados nos Ambulatórios de Colagenoses e de Estomatologia do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de 1997 a 2008.

Dados como sexo, raça, idade, localização e apresentação clínica das lesões orais do LE foram incluídos na análise.

4.2 Aprovação do Comitê de Ética

Este projeto está de acordo com os princípios da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi submetido a análise do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesp da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), tendo sido aprovado em 14 de fevereiro de 2007. A carta de aprovação encontra-se anexada (Anexo A , página 104).

4.3 Classificação das lesões orais

As 29 lesões orais foram classificadas clinicamente em lesões agudas, subagudas e crônicas, de acordo com seu aspecto clínico-morfológico e, em casos duvidosos, segundo analogia com lesões cutâneas presentes no mesmo doente. Foram consideradas lesões crônicas aquelas com aspecto típico, frequentemente descritas como “discoides”, “queratóticas”, “verrucosas”, em “favo de mel” e “ulcerada crônica”; lesões subagudas – lesões mucosas bem demarcadas, arredondadas, eritematosas, levemente deprimidas, em doentes com LE cutâneo subagudo típico; lesões agudas – lesões com aspecto típico descrito frequentemente como “purpúrico”, “erodido”, “aftoide” ou “bolhoso”, comumente afetando doentes com envolvimento sistêmico grave.

Posteriormente, as 29 lesões orais foram subdivididas em lesões de mucosa intraoral (não expostas ao sol), obtidas da mucosa jugal, do palato e da mucosa labial (n=23), e lesões de semimucosa (expostas ao sol), obtidas sempre do vermilião do lábio inferior (n=6).

4.4 Histopatologia

Os espécimes das biopsias realizadas para confirmação e documentação do diagnóstico de LE dos 29 casos incluídos no estudo foram analisados morfolologicamente à microscopia óptica. Os espécimes estudados foram processados histologicamente, embebidos em parafina e,

posteriormente, cortes de 5µm foram preparados em lâminas de vidro e corados em hematoxilina/eosina (HE) e ácido periódico de *Schiff* (PAS), para análise histológica dos espécimes.

4.5 Imunofluorescência direta

O exame de imunofluorescência direta foi realizado em todos os espécimes biopsiados. As amostras de lesões de mucosa oral foram transportadas acondicionadas em meio de Michel, armazenadas com crioprotetor e colocadas em freezer a -20°C, para posterior corte em criostato a -20°C, em fragmentos de espessura de 4µ. Os cortes obtidos foram colocados em lâmina silanizada (3 cortes por lâmina) e receberam o conjugado constituído por uma anti-imunoglobulina humana produzida em animal imunizado e associada a um fluorocromo = conjugado FITC diluído em Azul de Evans. Foram utilizados conjugados anti-humanos anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA e anti-C3 (marca Sigma Aldrich). Sob temperatura ambiente, os cortes permaneceram com o conjugado por 30 minutos, em câmara úmida no escuro, para a formação do imunocomplexo. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em TBS (tampão trizma base com cloreto de cálcio) pH 7,5 por 20 minutos e montadas com glicerina tamponada (pH 8,5) e lâmina de vidro. Foram mantidas no escuro e sob refrigeração até o momento da leitura em microscópio de fluorescência HBO 50w (filtro CB12) marca Carl Zeiss, com oculares de 10x e objetivas de 16x e 40x, acoplado a uma câmara fotográfica, para registro dos resultados.

4.5. Imuno-histoquímica

Foi analisado o perfil das citocinas do infiltrado inflamatório dos 29 espécimes de lesão oral de LE. Fragmentos de 3 μ m foram cortados para a realização da técnica imuno-histoquímica da estreptavidina-biotina peroxidase para IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ), cujo protocolo é descrito a seguir.

Protocolo:

Os cortes de 3 μ m foram desparafinizados em banho de xilol a 60°C por 30 minutos e dois banhos de xilol a temperatura ambiente por 5 minutos cada. Em seguida, os espécimes foram re-hidratados por meio de banhos em cadeia descendente de etanol 100% e 95%, e, por fim, foram imersos em solução de hidróxido de amônio 10% com álcool 95% por 10 minutos, para a remoção dos pigmentos formólicos.

Após lavagem em água corrente, os cortes foram mergulhados em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos, para bloquear a peroxidase endógena tecidual.

Após nova lavagem em água corrente, procedeu-se a recuperação dos sítios antigênicos e a posterior incubação com o soro primário diluído em solução de 1% BSA (Sigma) em Tris-EDTA pH 9,0, ácido cítrico pH 6,0 ou em tripsina (20 mg) em 100 ml de PBS. As informações específicas sobre a recuperação antigênica e sobre cada anticorpo utilizado estão descritas no Anexo B, Tabela 1.

Após essa etapa, os cortes foram imersos em duas soluções de PBS pH 7,4, por 5 minutos cada, e depois incubados com os reagentes, para revelação da reação imuno-histoquímica, também descritos no Anexo B, Tabela 1.

Seguiu-se, então, a imersão dos cortes em duas soluções de PBS pH 7,4.

Para a reação de revelação final, os espécimes foram incubados por 3 minutos em solução contendo o agente cromogênico 3'3 diaminobenzidina – DAB (Sigma) na concentração de 60mg em 100 ml de PBS, ativada por 2 ml de peróxido de hidrogênio 10%.

Os cortes foram posteriormente lavados em água corrente e água destilada e contra-corados com hematoxilina de Carazzi por 2 minutos. Em seguida, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis, diafinizados em três banhos de xilol e montados com resina permount, para o exame ao microscópio óptico.

Análise imuno-histoquímica das mesmas citocinas foi realizada em 3 espécimes de mucosa de indivíduos saudáveis obtidas por meio de cirurgia dentária. Em todas as reações, foram realizados controles negativos utilizando solução de tampão no lugar do anticorpo primário durante a etapa de incubação dos espécimes. Controles positivos foram realizados de acordo com a recomendação do fabricante.

O método de avaliação da expressão das citocinas foi semiquantitativo, sendo utilizada a seguinte classificação: 0: negativo; +: fraca expressão ou

até 20%; ++: moderada expressão ou até 60%; e +++: forte expressão ou mais de 60%.

5. Resultados

5. Resultados

5.1 Análise das informações clínicas

Informações sobre idade, sexo, raça, envolvimento da doença (LE agudo, subagudo, crônico), localização das lesões orais e seus aspectos clínicos estão resumidos no Anexo C, Tabela 2. Exemplos ilustrativos das lesões orais de LE são vistos na Figura 1.

A análise dos prontuários dos 29 doentes estudados neste trabalho mostrou predomínio do sexo feminino (n=23, 79%), em relação ao sexo masculino (n=6, 21%), com idade variando de 13 a 57 anos. Houve predomínio do acometimento de caucasianos (n=11, 55%), seguido de pardos (n=6, 30%) e negros (n=3, 15%).

As lesões orais localizaram-se, principalmente, na mucosa jugal (n=13, 46%), seguida pelo palato (n=7, 25%) e lábios (n=8, 29%). Quando comparamos lesões localizadas em áreas não expostas (mucosa intraoral) e lesões localizadas em áreas expostas (semimucosa), houve predomínio da localização não exposta ao sol (n=22) em relação à exposta (n=6).

A forma clínica oral mais frequente foi a forma crônica discoide (n=22, 78%), seguida pela aguda (n=5, 18%) e subaguda (n=1, 4%). A forma crônica discoide predominou em todas as localizações, tanto na mucosa jugal (n=12, 92%) como no palato (n=4, 57%) e lábios (n=6, 75%). Quando comparamos área não exposta (mucosa intraoral) e área exposta

(semimucosa), a forma clínica crônica discoide foi predominante em ambas (n=17, 77% e n=5, 83%, respectivamente).

5.2 Análise do aspecto histológico das lesões orais

O aspecto histológico predominante em todos os espécimes de lesões orais correspondeu a mucosite de interface com processo inflamatório superficial, profundo e perivascular. Nos casos de lesões agudas, o infiltrado inflamatório difuso misto, composto por linfócitos e neutrófilos, foi predominante. Esses aspectos são vistos na Figura 2. Espessamento da membrana basal epitelial e vascular, focal ou contínuo, está demonstrado nas secções coradas por PAS.

5.3 Análise da imunofluorescência direta das lesões orais

A imunofluorescência direta realizada nos 29 espécimes demonstrou padrão predominantemente granular, com depósito principalmente de IgM e, eventualmente, de IgG, IgA ou C3 na zona da membrana basal.

Figura 1- Exemplos clínicos de lesões orais de lúpus eritematoso

A,B,C: Lesões discoides intraorais (áreas cobertas)

D: Lesão discoide extensa no vermilião superior e inferior (áreas expostas)

Figura 2: Aspectos histopatológicos e de imunofluorescência direta de lesões orais de LE. A: Mucosite com infiltrado inflamatório liquenoide e perivascular. (hematoxilina e eosina, aumento original 40X). B: Visão aproximada do infiltrado inflamatório de interface: degeneração vacuolar de queratinócitos basais e corpos coloides. (hematoxilina e eosina, aumento original 400X). C: Infiltrado inflamatório perivascular associado ao espessamento da parede dos vasos. (hematoxilina e eosina, aumento original 250X). D: Imunofluorescência direta mostrando depósitos lineares de IgG ao longo da membrana basal.

5.4 Análise imuno-histoquímica das lesões orais

Todos os resultados da análise imuno-histoquímica das citocinas das lesões orais de LE estão resumidos no Anexo C, Tabela 2, e ilustrados na Figura 3.

Em relação às citocinas Th1, obtivemos reações imuno-histoquímicas positivas para IFN- γ em 97% e TNF- α em 90%. A reação imuno-histoquímica para IL-12 mostrou positividade fraca eventualmente.

Em relação às citocinas Th2, obtivemos reação imuno-histoquímica positiva para IL-10 em 90% dos espécimes com expressão forte e positiva para IL-4 em apenas alguns espécimes com expressão fraca. A reação imuno-histoquímica para IL-6 e IL-5 mostrou positividade com expressão forte em 100% das amostras. Porém, demonstrou positividade também nos controles normais.

Figura 3: Expressão das citocinas nas lesões orais do LE. A: Expressão moderada de IL-4 no infiltrado liquenoide (A1) e expressão forte desta citocina no aspecto intersticial do lóbulo da glândula mucosa salivar (A2). (aumento original 40X e 400X, respectivamente). B e C: Expressão moderada e escassa de IL-5 e IL-6 no infiltrado inflamatório das lesões orais de LE, respectivamente. (aumento original 400X). D e E: Expressão de IL-10: expressão forte desta interleucina no infiltrado liquenoide (D). Visão aproximada da expressão de IL-10 no citoplasma das células inflamatórias das lesões orais de LE (E). (aumento original 40X e 400X). F: Expressão muito fraca de IL-12 no infiltrado inflamatório das lesões orais de LE. (aumento original 400X). G: Presença forte de TNF- α em poucas células inflamatórias das lesões orais de LE. (aumento original 400X). H: Expressão forte e difusa de IFN- γ no infiltrado inflamatório das lesões orais de LE. (aumento original 400X).

5.5 Análise das citocinas Th1

5.5.1 Interferon gama (IFN- γ)

A reação imuno-histoquímica para IFN- γ foi positiva em 28 dos 29 espécimes de lesões orais com expressão forte. Quando comparamos lesões orais expostas e não expostas, a reação imuno-histoquímica para IFN- γ foi positiva em 22 (96%) das 23 lesões intraorais (não expostas ao sol) e em 6 (100%) das 6 lesões das semimucosas (lesões expostas ao sol) (Figura 4).

Figura 4 – Representação gráfica da expressão de IFN- γ na área não exposta (mucosa intraoral) e na área exposta (semimucosa)

5.5.2 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

A reação imuno-histoquímica para TNF- α mostrou positividade em 26 dos 29 espécimes com expressão forte. Quando comparamos lesões orais expostas e não expostas, a reação imuno-histoquímica para TNF- α foi positiva em 20 (87%) das 23 lesões intraorais (não expostas ao sol) e em 6 (100%) das 6 lesões das semimucosas (lesões expostas ao sol) (Figura 5).

Figura 5 – Representação gráfica da expressão de TNF- α na área não exposta (mucosa intraoral) e na área exposta (semimucosa)

5.5.3 Interleucina 12 (IL-12)

A reação imuno-histoquímica para IL-12 mostrou positividade em apenas 12 dos 29 espécimes, e nestes sua expressão foi fraca. Quando comparamos lesões orais expostas e não expostas, a reação imuno-histoquímica para IL-12 foi positiva em apenas 8 (35%) das 23 lesões intraorais (não expostas ao sol) e em 4 (67%) das 6 lesões das semimucosas (lesões expostas ao sol) (Figura 6).

Figura 6 – Representação gráfica da expressão de IL-12 na área não exposta (mucosa intraoral) e na área exposta (semimucosa)

5.6 Análise das citocinas Th2

5.6.1 Interleucina 10 (IL-10)

A reação imuno-histoquímica para IL-10 mostrou positividade com expressão forte em 25 dos 29 espécimes. Quando comparamos lesões orais expostas e não expostas, a reação imuno-histoquímica para IL-10 foi positiva em 20 (87%) das 23 lesões intraorais (não expostas ao sol) e em 5 (83%) das 6 lesões das semimucosas (lesões expostas ao sol) (Figura 7).

Figura 7 – Representação gráfica da expressão de IL-10 na área não exposta (mucosa intraoral) e na área exposta (semimucosa)

5.6.2 Interleucinas 5 e 6 (IL-5 e IL-6)

IL-5 e IL-6 foram positivas em todos os espécimes (100%) e com expressão forte. Estas citocinas foram positivas também nos controles normais.

Quando comparamos a expressão das citocinas IL-5 e IL-6 nas lesões intraorais (áreas não expostas) e nas lesões semimucosas (áreas expostas), observamos positividade de 100% em ambas (n=23 e n=6, respectivamente) (Figura 8).

Figura 8 – Representação gráfica da expressão de IL-5 e IL-6 na área não exposta (mucosa intraoral) e na área exposta (semimucosa)

5.6.3 Interleucina 4 (IL-4)

A reação imuno-histoquímica para IL-4 mostrou positividade em somente 7 das 29 espécimes, e nestas a expressão foi fraca. Quando comparamos lesões orais expostas e não expostas, a reação imuno-histoquímica para IL-4 foi positiva em apenas 6 (26%) das 23 lesões intraorais (não expostas ao sol) e em apenas 1 (17%) das 6 lesões das semimucosas (lesões expostas ao sol) (Figura 9).

Figura 9 – Representação gráfica da expressão de IL-4 na área não exposta (mucosa intraoral) e na área exposta (semimucosa)

Em resumo, as citocinas Th1 representadas por IFN- γ e TNF- α foram predominantemente positivas nos 29 espécimes, tanto nas lesões das áreas não expostas como das áreas expostas. No entanto, para IL-12 a expressão foi predominantemente negativa na maioria dos casos. Porém, quando se comparam lesões intraorais e semimucosas, a expressão foi negativa apenas nas lesões intraorais.

As citocinas Th2 representadas por IL-10, IL-6 e IL-5 foram positivas na maioria dos espécimes, tanto nas áreas não expostas como nas áreas expostas. Porém, IL-4 teve expressão predominantemente negativa na maioria dos espécimes, tanto nas áreas não expostas como nas áreas expostas.

6. Discussão

6. Discussão

Dentre os vários elementos envolvidos na patogênese do LE, as citocinas parecem ter papel de destaque. Diversos estudos sugerem um desequilíbrio da produção de citocinas no LE (Singh, 1992a; Singh, 1992b; Linker-Israeli, 1992; Richaud-Patin et al. 1995; Dean et al., 2000; Csiszár et al., 2000; Theofilopoulos et al., 2001; Rahman, 2003; Aringer et al., 2003; Kalsi et al., 2004; Herndon et al., 2005). Porém, os trabalhos existentes na literatura pesquisam citocinas no soro e em culturas de células mononucleares do sangue periférico. Poucos são realizados em lesões cutâneas de LE (Stein et al., 1997; Toro et al., 2000). Até o momento, não há estudos avaliando citocinas nas lesões orais de LE. Portanto, comparamos nossos resultados com os achados destes estudos.

Alguns autores propõem o predomínio de uma resposta inflamatória do tipo Th1 no LE (Toro et al., 2000; Baechler et al., 2004; Wenzel et al., 2005) enquanto outros defendem uma resposta do tipo Th2 (Richaud-Patin et al., 1995; Barcellini et al., 1996; Stein et al., 1997).

As evidências de predomínio da resposta do tipo Th1 são: a) presença de expressão aumentada de citocinas Th1, como IFN tipo 1, IFN- γ e IL-2, nas lesões cutâneas de LE (Toro et al., 2000; Wenzel et al., 2005); b) ausência ou diminuição da expressão de uma importante citocina Th2, representada por IL-4, nas lesões cutâneas e em monócitos de doentes com LE (Horwits et al., 1994; Toro et al., 2000; Csiszár et al., 2000); c) ausência

de consenso quanto à importância de IL-10 na fisiopatologia do LE (Rosenbaum et al., 2005).

Os autores que defendem uma resposta Th2 se baseiam em evidências que demonstram: a) produção aumentada de autoanticorpos em pacientes com LE, o que resulta em inflamação e envolvimento de órgãos internos (Stein et al., 1997; Richaud-Patin et al., 1995; Csiszár et al., 2000; Kalsi et al., 2004); b) expressão positiva de IL-5 (citocina Th2) em lesões cutâneas de LE (Stein et al., 1997); c) expressão aumentada de IL-6, outra citocina Th2, no fluido cerebrospinal de pacientes com comprometimento do SNC, no soro de pacientes com comprometimento cardiopulmonar ou renal e em biopsias cutâneas de pacientes com LE (Linker-Israeli, 1992; Dean et al., 2000); d) expressão aumentada de IL-10, tanto em lesões cutâneas quanto no soro de pacientes com LE (Stein et al., 1997; Rahman, 2003; Weiss et al., 2004).

Nossos resultados demonstraram expressão aumentada tanto de citocinas Th1, representadas por IFN- γ e TNF- α , quanto de citocinas Th2, representadas por IL-10, IL-6 e IL-5.

Outros autores também observaram expressão aumentada para os dois grupos de citocinas. Richaud-Patin et al. (1995), embora defendessem uma resposta do tipo Th2, encontraram em seu trabalho, aumento tanto de citocinas Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) quanto de Th1(TNF- α). Csiszár et al. (2000) demonstraram aumento tanto de citocina Th1, representada por IFN- γ , como de Th2, representada por IL-10. Stein et al. (1997), embora também

defendessem uma resposta Th2 (representada por IL-5), demonstraram a ação local de IFN- γ .

Baseado nestes estudos e em nossos resultados, sugerimos que na patogênese do LE oral possa haver a participação tanto de citocinas Th1 como de Th2. Especulamos que o desequilíbrio entre estes grupos de citocinas, e não a ação isolada de apenas um deles, deflagre alterações que resultam na indução das lesões.

Interferon gama (IFN- γ)

No presente trabalho, encontramos expressão positiva para IFN-gama em 28 dos 29 casos. Como não há na literatura trabalhos sobre citocinas nas lesões orais, comparamos nossos resultados com estudos utilizando soro, cultura de mononucleares de sangue periférico e espécimes de lesões cutâneas obtidos de pacientes com LE. Segundo Nico et al. (2008), as lesões orais do LE apresentam correlação com as lesões cutâneas, permitindo sua comparação.

Nossos resultados estão de acordo com os achados de Toro et al. (2000) e Stein et al. (1997), que observaram aumento da expressão de IFN- γ em lesões cutâneas, e com os resultados de Linker-Israeli (1992) e Kalsi et al. (2004), que observaram aumento de IFN- γ no soro de doentes com manifestações sistêmicas do LE.

O interferon gama (IFN- γ) é uma citocina Th1 com função pró-inflamatória relevante. Na literatura, IFN- γ é implicado na nefrite lúpica em

camundongos e na patogênese do LE em humanos tanto nas formas com manifestação cutânea exclusiva como nas formas com manifestações sistêmicas (Linker-Israeli, 1992; Stein et al., 1997; Haas et al., 1998; Toro et al., 2000; Kalsi et al., 2004).

O IFN- γ tem participação importante na indução do LE por aumentar a produção de autoanticorpos e aumentar a resposta inflamatória. O aumento da produção de autoanticorpos é resultante da ação estimuladora do IFN- γ sobre a apoptose induzida pela radiação ultravioleta (Norris et al., 1997; Rosembaum et al., 2005; Lin et al., 2007). O aumento da resposta inflamatória se deve à ação de IFN- γ sobre queratinócitos e macrófagos, induzindo-os a produzir quimiocinas. Estas quimiocinas, expressas na junção dermo-epidérmica e nas áreas perianexiais, recrutam leucócitos que promovem o aumento da resposta inflamatória. Isto sugere que o IFN- γ tem um importante papel imunomodulador no LE (Rosenbaum et al., 2005).

Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

TNF- α é também uma citocina Th1. No presente trabalho, TNF- α apresentou expressão positiva no infiltrado inflamatório em 26 dos 29 espécimes de lesões orais de LE. A importância do papel do TNF- α no LE foi relatada por autores como Aringer et al. (2003) e Rahman et al. (2003). Ambos relataram a ação pró-inflamatória e imunomoduladora dessa citocina, demonstrando sua ação dupla no LE. Por um lado, TNF- α age aumentando o processo inflamatório e destrutivo, principalmente na nefrite lúpica, e por

outro, demonstra uma ação imunorreguladora, agindo de forma diferente sobre linfócitos T, B, células dendríticas e apoptose (Aringer et al., 2003; Rahman, 2003). O TNF- α passou a ter papel de destaque na patogênese do LE após introdução da terapia anti-TNF- α , quando alguns doentes com artrite reumatoide, doença de Crohn ou psoríase tratados com essas drogas vieram a apresentar síndrome “lúpus like” e presença de anticorpos anti-DNA dupla hélice (Aringer et al., 2003; Rahman, 2003). A demonstração da relação do polimorfismo do gene promotor de TNF- α no locus -308 A com LES e LECSA realçou sua importância (Werth et al., 2000, Suárez et al., 2005; Werth et al., 2007).

Richaud-Patin et al. (1995) encontraram aumento de TNF- α em mononucleares de 17 pacientes com LES, com ou sem atividade, e Toro et al. (2000) demonstraram a presença elevada de TNF- α em espécimes de biopsias de LE discoide. Nossos achados são compatíveis com estes resultados.

Interleucina 12

Demonstramos a presença de IL-12 em apenas 12 dos 29 casos estudados de LE oral. Além de pouco presente, a expressão de IL-12 foi fraca nesses poucos casos positivos.

A IL-12 é considerada uma citocina promotora de resposta Th1 e reguladora de outras citocinas (Werth et al., 2003). Por meio dessa regulação, age sobre vários mecanismos da resposta imune: estimula

apoptose, induzindo IFN- γ ; ao mesmo tempo inibe apoptose, inibindo TNF- α ; inibe IL-10, revertendo a imunossupressão e a tolerância causada por ela, permitindo a maturação de células dendríticas (Abbas et al., 2000; Werth et al., 2003; Rosenbaum et al., 2005).

No LE, além de interferir nos mecanismos expostos acima, acredita-se que esteja envolvida na promoção da sobrevivência dos queratinócitos irradiados pela radiação ultravioleta, por aumentar a atividade de enzimas reparadoras do DNA (Werth et al., 2007).

Na literatura, os achados em relação a IL-12 no LE são controversos. Dean et al. (2000) relataram diminuição de IL-12 no soro de pacientes com LES. Na nefrite lúpica, Min et al. (2007) demonstraram diminuição da expressão de IL-12 em mononucleares, enquanto Tucci et al. (2008) demonstraram aumento de IL-12 tanto no soro quanto na urina dos doentes, relacionando-o com a atividade e gravidade da doença.

Trabalhos recentes demonstram a ação benéfica da aplicação de UVA1 em algumas formas fotossensíveis de LE cutâneo (Lin et al., 2007). UVA1 é um forte indutor de IL-12. Embora o mecanismo continue desconhecido, especula-se que a melhora se deva à ação de IL-12, por reparar o DNA dos queratinócitos e inibir a ação do TNF- α (Werth et al., 2003; Rosenbaum et al., 2005; Werth et al., 2007).

Encontramos IL-12 em poucos casos de LE oral. É possível que a expressão diminuída se deva ao balanço entre IL-12 e IL-10. Assim como foi relatado por Dean et al. em 2000 e Rahman et al. em 2003 e observado por Min et al. em 2007, nossos achados sugerem que a diminuição de IL-12

esteja relacionada à elevação de IL-10. Acreditamos que IL-10 seja responsável por um efeito inibidor sobre IL-12, diminuindo sua expressão.

Interleucina 10

A IL-10 é uma importante citocina Th2. É implicada na fisiopatologia do LE por sua ação indutora da diferenciação de linfócitos B, promovendo hiperatividade desta célula e consequente aumento de autoanticorpos. Tem ação sobre linfócitos T “helpers” e células apresentadoras de antígenos, inibindo-as. A hiperatividade de linfócitos B e a diminuição da resposta imune celular são características presentes no LES.

Autores como Richaud-Patin et al. (1995), Csiszár et al. (2000) e Kalsi et al. (2004) demonstraram aumento de IL-10 no LES. Embora Rosenbaum et al. (2005) tivessem relatado ausência de relação do aumento de IL-10 com LE cutâneo, Stein et al. (1997) demonstraram expressão aumentada de IL-10 em amostras cutâneas de LE.

No presente trabalho, encontramos expressão positiva para IL-10 em 25 das 29 amostras de lesões orais. Nossos achados são concordantes com os resultados daqueles autores.

Observamos em nosso trabalho a expressão aumentada de IFN- γ e a expressão diminuída tanto de IL-4 quanto de IL-12. Segundo Csiszár et al. (2000), a expressão aumentada de IL-10 pode afetar a produção de outras citocinas no LES. Ainda segundo esse autor, IL-10 estimula o aumento de IFN- γ , inibe IL-4 e regula IL-12. Isto indica que IL-10 tem um papel

fundamental na regulação dessas citocinas, sendo provavelmente responsável pela indução do processo inflamatório por meio de IFN- γ .

A radiação ultravioleta induz a produção de IL-10 pelos queratinócitos irradiados (Rosenbaum et al., 2005, Werth, 2007; Kuhn et al., 2008). A IL-10 produzida por estes queratinócitos induz tolerância e imunossupressão local e sistêmica (Shreedhar et al., 1998). Segundo Enk et al. (1993), células de Langerhans tratadas com IL-10 obtida de queratinócitos irradiados deixam de apresentar antígenos para células Th1. A IL-10 ainda torna a população de células Th1 tolerante à estimulação antigênica. Porém, IL-10 não interfere na apresentação de antígenos para o clone de células Th2 (Enk et al., 1993). A IL-10, portanto, seria responsável pela inibição da resposta celular (resposta Th1) e pelo aumento da resposta Th2, resultando em uma hiperatividade de células B (Weiss et al., 2004).

Interleucina 5 e 6

As citocinas IL-5 e IL-6 têm a importante função de promover a produção de imunoglobulinas por células B ativadas (Herndon et al., 2005).

A elevação de IL-6 é observada em pacientes com diversas manifestações do LES, como nefrite lúpica, complicações do sistema cardiopulmonar (Dean et al., 2000) e complicações do sistema nervoso central (Herndon et al., 2005). Espécimes cutâneos de pacientes com LE também apresentam elevação de IL-6 (Dean et al., 2000).

A IL-5 está presente em cortes cutâneos de LE estudados por Stein et al. (1997).

Nossos resultados demonstraram expressão positiva intensa para IL-5 e IL-6 em todos os espécimes de LE oral. Obtivemos expressão positiva para IL-5 e IL-6 também nos controles normais. Por termos seguido corretamente os protocolos e obtido repetidamente os mesmos resultados, não acreditamos em erro técnico. Especulamos que esse achado se deva à presença de algum grau de processo inflamatório existente nas amostras de controles normais, por se tratar de espécimes colhidos de mucosa oral na região do triângulo posterior, sabidamente local frequente de processo inflamatório. Apesar das justificativas, não consideramos os resultados de IL-5 e IL-6 nos nossos resultados finais.

Interleucina 4

Obtivemos expressão positiva para IL-4 em somente 7 das 29 lesões orais. Sua expressão nestes poucos espécimes foi também fraca. Nossos resultados estão de acordo com os achados de Stein et al. (1997) e Toro et al. (2000) em lesões cutâneas de LE, onde IL-4 encontra-se ausente. Também são concordantes com os trabalhos de Horwits et al. (1994) e Csiszár et al. (2000), onde IL-4 está diminuída em cultura de mononucleares obtidos de pacientes com LES.

A expressão diminuída, ou às vezes ausente, de IL-4 em nossos espécimes orais pode ser explicada por meio dos achados de Parronchi et

al. Em 1992, Parronchi et al. demonstraram o efeito inibidor de IFN- γ sobre IL-4. Em nosso estudo, IFN- γ apresentou expressão aumentada. Acreditamos que a expressão diminuída de IL-4 encontrada em nosso trabalho seja resultante da inibição provocada pelo aumento de IFN- γ .

Subtipos do LE

Stein et al. (1997) determinaram que a expressão das citocinas nas lesões cutâneas de LE não variava com os diferentes subtipos de LE ou com a magnitude da inflamação. Wenzel et al. (2007) referiram que proteínas induzidas por IFN tipo I refletiam a distribuição histológica característica do infiltrado inflamatório nos diferentes subtipos de LE cutâneo.

Em nosso estudo, não observamos diferenças nas citocinas estudadas quando comparamos os grupos agudo, subagudo e crônico do LE oral. Ressaltamos que o grupo subagudo é representado por apenas um doente por se tratar de uma forma pouco frequente de LE oral. No entanto, percebemos que a disposição das citocinas se fez acompanhando o infiltrado inflamatório característico de cada grupo.

Esses achados corroboram a corrente de pensamento na qual as diferentes apresentações de LE muco-cutâneo representam graus variáveis da intensidade da inflamação e da resposta do hospedeiro ao mesmo processo patológico, sendo a classificação dessas lesões fundamentalmente artificial, apesar de seu valor didático (Lee e Ackerman, 1997; Nico et al., 2008).

Não notamos diferenças em relação à expressão das citocinas quando comparamos doentes com manifestação cutâneo-mucosa exclusiva e doentes com manifestações sistêmicas.

Influência da radiação ultravioleta

Neste estudo, comparamos o perfil das citocinas das lesões orais do LE localizadas na mucosa intraoral (área coberta) com o da semimucosa do lábio inferior (área exposta). Como é sabido, os diferentes comprimentos de onda da radiação ultravioleta (UVB, de 290 nm a 320 nm, e UVA de 320 nm a 400 nm) podem induzir respostas anormais da pele e lesões cutâneas em doentes com LE (Kuhn et al., 2001; Lehmann et al., 1990), além de agravar e potencializar quadros sistêmicos da doença (Lehmann et al., 1990; Kuhn et al., 2001; Lin et al., 2007).

A ligação entre fotossensibilidade e indução da autoimunidade pode ser explicada por um modelo centrado na apoptose. A radiação ultravioleta é um importante indutor de apoptose em queratinócitos. Tanto a indução da apoptose quanto a limpeza das células apoptóticas são influenciadas geneticamente e resultam em um aumento das células apoptóticas.

A apoptose parece ser um mecanismo importante na formação dos autoanticorpos no LE cutâneo (Bijl et al., 2006; Werth, 2007; Kuhn et al., 2008). Casciola-Rosen et al. (1994 e 1997) demonstraram que durante o processo de apoptose, antígenos intracelulares são translocados para a superfície da célula, dando origem a grupos denominados debris ou corpos

apoptóticos. Os corpos apoptóticos partem do núcleo e se ligam a Ro/SSA, La/SSB e outros materiais nucleares. Estes corpos apoptóticos associados a antígenos são, então, fagocitados, “envelopados” e apresentados a linfócitos, estimulando uma resposta autoimune.

Além de promover a morte celular e a geração de autoantígenos, a radiação ultravioleta também induz e modula mediadores da resposta inflamatória e autoimune, tais como as citocinas (Lin et al., 2007).

UVA e UVB induzem a expressão de IL-10 e IL-12. IL-10 induz imunossupressão e tolerância, promovendo resposta Th2, além de inibir a maturação de células dendríticas. IL-12 promove uma resposta Th1 e pode reverter a imunossupressão e tolerância induzida pela IL-10 (Rosenbaum et al., 2005). A IL-12 também exerce um importante papel no controle da apoptose mediada pela radiação ultravioleta por meio da supressão de TNF- α (Werth et al., 2003). Ultravioleta B induz o aumento de IL-1 α e TNF- α (“citocinas primárias”) na epiderme (Norris et al., 1997), o que resulta no aumento da produção de TNF- α pelos queratinócitos de uma maneira autócrina. TNF- α leva ao aumento da apoptose e de mediadores inflamatórios. TNF- α , IL-1 α e IFN- γ induzem a maturação de células dendríticas imaturas em eficientes células apresentadoras de antígenos (APCs). Estas APCs são também responsáveis pela indução da imunidade. (Rosenbaum et al., 2005).

TNF- α e IL-1 α induzem, em uma segunda fase, a produção de outras citocinas, tais como IL-6, prostaglandinas E2 (PGE₂), IL-8 e fator de crescimento de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF), as quais são

fatores coestimuladores, iniciando uma cascata de eventos inflamatórios que culminam na indução da lesão de LE (Lin et al., 2007).

Diversos estudos demonstram que a radiação ultravioleta induz a expressão de citocinas (Rosenbaum et al., 2005; Lin et al., 2007; Werth, 2007; Kuhn et al., 2008). No entanto, nossos resultados não revelaram diferenças na expressão de citocinas quando comparamos áreas não expostas (mucosa intraoral) com áreas expostas ao sol (semimucosa de lábio inferior).

Observamos expressão positiva para as citocinas Th1 representadas por IFN- γ e TNF- α tanto na mucosa intraoral (sem exposição solar) quanto na semimucosa (com exposição solar).

Notamos expressão negativa para IL-12 na maioria dos espécimes de LE oral, porém, quando comparamos área exposta (semimucosa) e não exposta (mucosa intraoral), notamos predomínio da expressão negativa apenas na mucosa intraoral (área não exposta), e não na semimucosa (área exposta ao sol). Especulamos que talvez essa diferença se deva ao estímulo da radiação ultravioleta nessas áreas, induzindo a produção de IL-12. Ressaltamos que o grupo formado pela semimucosa contém um pequeno número de espécimes (n=6).

Em relação às citocinas Th2, representadas por IL-10, IL-6 e IL-5, observamos expressão positiva tanto na área exposta (semimucosa) quanto na área sem exposição (mucosa intraoral), não havendo diferenças das citocinas entre as duas áreas. Salientamos que IL-10 mostrou padrão exatamente igual nas duas áreas (expostas e não expostas).

Obtivemos expressão negativa para IL-4 em ambas as áreas (expostas e não expostas).

Dessa forma, observamos padrão semelhante de expressão de citocinas entre a mucosa intraoral (área coberta) e a semimucosa (área exposta).

Estes achados sugerem que, embora a radiação ultravioleta exerça papel importante na indução da atividade do LE, os mecanismos intrínsecos de formação de lesões mucocutâneas parecem ser similares nas áreas expostas e não expostas ao sol após o desencadeamento do processo (por múltiplas causas, entre elas a radiação UV). Tal similaridade na gênese das lesões cutâneas e mucosas corrobora as proposições sobre a identidade clínica e histopatológica entre elas no LE (Nico et al., 2008).

7. Conclusões

7. Conclusões

1. Tanto citocinas da resposta do tipo Th1, representadas por IFN- γ e TNF- α , quanto citocinas da resposta do tipo Th2, representadas por IL-10, são expressas nas lesões orais de lúpus eritematoso.

2. O padrão de expressão das citocinas da mucosa intraoral (não exposta ao sol) e do vermilião labial (exposta ao sol) é fundamentalmente o mesmo.

8. Inferências

8. Inferências

O mecanismo de formação das lesões intraorais (área coberta) do lúpus eritematoso parece ser o mesmo das lesões cutâneas (área exposta).

A radiação ultravioleta é considerada importante indutor de atividade da doença. Porém, após o desencadeamento do processo, esse provavelmente é propagado para outras áreas do organismo, independentemente da exposição solar.

9. Anexos

Anexo A

Carta aprovação CAPPesp.

Anexo B - Tabela 1: Anticorpos e protocolos utilizados

Soro Primário	Clone	Procedência	Recuperação Antigênica	Título	Kit de revelação
IL-4	Policlonal AF-204-NA	RD System	Tripsina 1% em PBS à 37°C	1:40	LSAB
IL-5	Monoclonal 9906	RD System	Ácido Cítrico pH 6.0 à 95°C	1:50	Polímero
IL-6	Policlonal Ab6672	Abcam	Tris-EDTA, pH9.0 à 95°C	1:750	Polímero
IL-10	Policlonal AF-217-NA	RD System	Tripsina 1% em PBS à 37°C	1:10	LSAB
IL-12	Monoclonal C11.5	Abcam	Tris-EDTA, pH9.0 à 95°C	1:50	Polímero
TNF-alfa	N19 1350	Santa Cruz	Tripsina 1% em PBS, temperatura ambiente	1:30	LSAB
IFN-gama	mab 285 25718 111	RD System	Tris-EDTA, pH9.0 à 95°C	1:30	Polímero

Anexo C - Tabela 2: Informações clínicas e aspectos imunohistoquímicos da expressão das citocinas nas lesões orais de LE

Caso	Sexo/ idade	raça	LE	Aspectos clínicos das lesões mucosas	Local das lesões orais	TH2				TH1		
						IL-4	IL-5	IL-6	IL-10	IL-12	TNF- α	IFN- γ
M												
1	F/30	Caucasiano	LES	Aguda	Palato	0	++	+++	++	0	0	+++
2	F/36	Caucasiano	LES	Aguda	Mucosa jugal	0	++	++	++	0	++	+
3	M/33	Pardo	LES	Aguda	Lábio	0	++	+	+	+	+++	++
4	F/22	Caucasiano	LES	Aguda	Palato	0	++	++	0	+	++	+
5	F/14	Caucasiano	LES	Subaguda	Palato	0	++	++	+	0	++	0
6	F/48	Caucasiano	LEC	Crônica discóide	Mucosa jugal	0	++	+++	+++	+	+	++
7	F/41	Pardo	LES	Crônica discóide	Mucosa jugal	++	++	++	+++	0	+++	+
8	F/27	—	LES	Crônica discóide	Mucosa jugal	+	++	+++	+++	+	++	+++
9	F/27	Negro	LES	Crônica discóide	Mucosa jugal	+	++	+++	++	0	0	+++
10	F/34	Pardo	LES	Crônica discóide	Lábio	0	++	+++	0	0	++	+
11	F/34	—	LES	Crônica discóide	Palato	0	++	+++	++	0	+	+++
12	F/38	Caucasiano	LES	Crônica discóide	Palato	0	++	+	++	0	+	++
13	F/37	Pardo	LEC	Crônica discóide	Palato	+	+++	++	++	0	++	++
14	F/26	—	LEC	Crônica discóide	Mucosa jugal	0	++	++	+	0	+	++
15	F/43	Caucasiano	LEC	Crônica discóide	Mucosa jugal	0	++	++	++	+	+	++
16	F/29	Negro	LEC	Crônica discóide	Mucosa jugal	++	++	+++	+++	++	+	+++
17	M/40	Caucasiano	LE	Crônica discóide	Mucosa jugal	0	++	++	+	+	0	++
18	M/13	—	LEC	Crônica discóide	Mucosa jugal	+	++	++	++	0	+	+
19	M/39	Caucasiano	LEC	Crônica discóide	Mucosa jugal	0	++	++	++	+	++	++
20	F/29	Pardo	LES	Crônica discóide	Mucosa jugal	0	++	+++	+	0	+++	+
21	F/43	—	LE	Crônica discóide	Mucosa jugal	0	++	++	+	0	+	++
22	F/19	—	LEC	Crônica discóide	Palato	0	++	+	0	0	++	+
23	F/25	—	LE	—	Mucosa jugal	0	++	++	++	0	+	+++
SM												
24	F/21	Caucasiano	LES	Aguda	Lábio	0	++	++	+	+	+	++
25	F/51	Caucasiano	LEC	Crônica discóide	Lábio	0	+++	++	+	0	++	+++
26	F/33	—	LES	Crônica discóide	Lábio	0	++	++	0	+	+	++
27	M/38	Negro	LEC	Crônica discóide	Lábio	+	+++	++	++	+	+	+++
28	F/57	Pardo	LEC	Crônica discóide	Lábio	0	++	++	++	0	++	+++
29	M/53	—	LEC	Crônica discóide	Lábio	0	++	+++	++	++	++	+++
CS												
1					Trigono retro-molar	0	+	+	0	0	0	+
2					Trigono retro-molar	0	+	+	0	0	+	0
3					Trigono retro-molar	0	+	+	0	0	0	0

M, mucosa; SM, semimucosa; CS, mucosa oral normal-controles saudáveis; —, Informações não disponíveis

Anexo D - Tabela 3: Aspectos da imunofluorescência direta das lesões orais de LE

Caso	Imunofluorescência Direta
M	
Caso 1	Presença de fluorescência granulosa, moderada e contínua na ZMB para anti-IgM.
Caso 2	Não foi possível realizar.
Caso 3	Presença de fluorescência granulosa, discreta, contínua na ZMB para anti-C3
Caso 4	—
Caso 5	Presença de fluorescência granulosa intensa contínua na ZMB para anti- IgM e anti- C3 e moderada para anti- IgG
Caso 6	Ausência de fluorescência específica.
Caso 7	Ausência de fluorescência específica
Caso 8	Ausência de fluorescência específica
Caso 9	Ausência de fluorescência específica
Caso 10	Presença de fluorescência granulosa, moderada, contínua na ZMB para anti- IgG,IgM,IgA,C3
Caso 11	Ausência de fluorescência específica
Caso 12	—
Caso 13	Presença de fluorescência dos núcleos dos queratinócitos epidérmicos para IgG, granulosa contínua moderada na ZMB para IgM e corpos citóides fluorescentes na derme papilar
Caso 14	Presença de fluorescência linear contínua intensa na ZMB para IgG,IgA e C3.
Caso 15	Presença de fluorescência granulosa, moderada, contínua na ZMB e corpos fluorescentes na derme papilar para anti-IgM
Caso 16	Ausência de fluorescência específica.
Caso 17	Ausência de fluorescência específica.
Caso 18	Presença de fluorescência granulosa, grosseira, contínua, moderada na ZMB para anti-IgM
Caso 19	Presença de fluorescência homogênea, moderada, descontínua na ZMB para anti-IgG; Presença de corpos citóides fluorescentes na derme papilar para IgM e IgA
Caso 20	Ausência de Imunofluorescência específica.
Caso 21	—
Caso 22	—
Caso 23	Presença de fluorescência granulosa, discreta e contínua na ZMB e corpos citóides fluorescentes na derme papilar para anti-IgM.
SM	
Caso 24	Ausência de fluorescência específica.
Caso 25	Presença de fluorescência homogênea, intensa, contínua na ZMB para anti-IgM.
Caso 26	Presença de fluorescência granulosa, discreta, focal na ZMB e corpos citóides fluorescentes na derme papilar para anti-IgM e Anti-IgA
Caso 27	Presença de fluorescência homogênea, moderada, descontínua na ZMB anti-IgG e anti- C3;Fluorescência granulosa, descontínua,discreta na ZMB e corpos citóides fluorescentes na dermepapilar Anti- IgM.
Caso 28	Presença de fluorescência granulosa, moderada e contínua na ZMB para anti-IgM e IgA.
Caso 29	Presença de fluorescência homogênea, intensa, contínua na ZMB e corpos citóides fluorescentes na derme papilar para Anti- IgM.

M,mucosa; SM, semimucosa; — , informação não disponível

10. Referências

10. Referências

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular*, 3ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.247-9.

Antonovych TT. *Pathology of systemic lupus erythematosus*. Washington DC: American Registry of Pathology and Armed Forces Institute of Pathology; 1995.

Aringer M, Smolen JS. SLE - Complex cytokine effects in a complex autoimmune tumor necrosis factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(4):172-7.

Baechler EC, Gregersen PK, Behrens TW. The emerging role of interferon in human systemic lupus erythematosus. *Current Opinion in Immunology*. 2004;16:801–7.

Barcellini W, Rizzard GP, Borghi MO, Nicoletti F, Fain C, Del Papa N. In vitro type-1 and type-2 cytokine production in systemic lupus erythematosus: lack of relationship with clinical disease activity. *Lupus*. 1996;5(2):139-45.

Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th 17: The third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(6):652-7.

Bijl M, Kallenberg CGM. Ultraviolet light and cutaneous lupus. *Lupus*. 2006;15:724-7.

Burge SM, Frith PA, Juniper RP, Wojnarowska F. Mucosal involvement in systemic and chronic cutaneous lupus erythematosus. *Br J Dermatol*. 1989; 121: 727-41.

Callen JP. Oral manifestations of collagen vascular disease. *Sem Cutan Med Surg*. 1997;16(4):323-7.

Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med*. 1994;179(4):1317-30.

Casciola-Rosen L, Rosen A. Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: a potencial mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in LE. *Lupus*. 1997;6(2):175-80.

Costner MI, Sontheimer RD. Lupus Erythematosus. In: Freedberg IM, Elizen AZ, Wolf K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI. eds. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 6 ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2003. p.1677-93.

Crowson NA, Magro C. The cutaneous pathology of lupus erythematosus: a review. *J Cutan Pathol*. 2001;28:1-23.

Csiszár A, Nagy GY, Gergely P, Pozsonyi T, Pócsik É. Increased interferon-gamma (IFN- γ), IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clinical & Experimental Immunology*. 2000;122(3):464-70.

Dean GS, Tyrrell-Price J, Crawley E, Isenberg DA. Cytokines and systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2000;59(4):243-51.

Duarte AA. *Colagenoses e a Dermatologia*. São Paulo: ed. do autor; 2004. p.13-17.

Enk AH, Angeloni V, Udey MC, Katz SI. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10: a role for IL-10 in induction of tolerance. *J. Immunol*. 1993;151(5):2390-8.

Furukawa F, Muto M. Ethnic differences in immunogenetic features and photosensitivity of cutaneous lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res*. 2009;301:111-5.

Gillian JN, Sontheimer RD. Distinctive cutaneous subsets in the spectrum of lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol*. 1981;4:471-5.

Gómez D, Correa PA, Gómez LM, Cadena J, Molina JF, Anaya JM. Th1/Th2 cytokines in patients with systemic lupus erythematosus: is tumor necrosis factor α protective? *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2004;33(6):404-13.

Haas C, Ryffel B, Hir ML. IFN- γ receptor deletion prevents autoantibody production and glomerulonephritis in lupus-prone (NZB x NZW) F1 mice. *J Immunol*. 1998;160:3713-18.

Herndon MT, Tsokos GC. What in Autoimmunity: Basic Mechanisms and Concepts. In Kuhn A, Lehmann P, Ruzicka T (eds). *Cutaneous Lupus Erythematosus*. Berlin:Springer-Verlag; 2005. p.8-17.

Herrmann M, Voll RE, Kalden JR. Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Immunology Today*. 2000;21(9):424-6.

Horwitz DA, Wang H, Gray JD. Cytokine gene profile in circulating blood mononuclear cells from patients with Systemic Lupus Erythematosus: increased interleukin-2 but not interleukin-4 mRNA. *Lupus*. 1994;3(5):423-8.

Husband AJ, Beagley KW, Mcghee JR. Mucosal Cytokines. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, Mcghee JR. *Mucosal Immunology*. 2th ed. San Diego: Academic Press; 1999. p.541-5.

Jensen JL. Oral and ocular sicca symptoms and findings are prevalent in systemic lupus erythematosus. *J Oral Pathol Med*. 1999;28:317-22.

Jiménez S, Cervera R, Ingelmo M, Font J. The Epidemiology of Lupus Erythematosus. In: Kuhn A, Lehmann P, Ruzicka T. (eds). *Cutaneous Lupus Erythematosus*. Berlin:Springer-Verlag; 2005. p.33-44.

Jonsson R, Heyden G, Westberg NG, Nyberg G. Oral mucosal lesions in systemic lupus erythematosus: a clinical, histopathological and immunopathological study. *J Rheumatol*. 1984;11(1): 38-42.

Jorizzo JL, Salisbury PL, Rogers III RS, Goldsmith SM, Shar GG, Callen JP, Wise CM, Semble EL, White WL. Oral lesions in systemic lupus erythematosus: do ulcerative lesions represent a necrotizing vasculitis? *J Am Acad Dermatol*. 1992;27:389-94.

Kalsi JK, Grossman J, kim J, Sieling P, Gjertson DW, Reed EF, Ebling FM, Linker-Israeli M, Hahn BH. Peptides from antibodies to DNA elicit cytokine releases from peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus: relation of cytokine pattern to disease duration. *Lupus* 2004;13:490-500.

Karjalainen TK, Tomich CE. A histopathologic study of oral mucosal lupus erythematosus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1989;67:547-54.

Kondo S, Jinbow K. Dose-Dependent Induction of IL-12 But Not IL-10 from Human Keratinocytes After Exposure to Ultraviolet Light A *Journal of Cellular Physiology.* 1998;177:493–8.

Kuhn A, Sonntag M, Richter-Hintz D, Oslislo C, Megahed M, Ruzicka T, Lehmann P. Phototesting in lupus erythematosus: a 15 year experience. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45:86-95.

Kuhn A, Sontheimer R, Ruzicka T. Clinical Manifestations of Cutaneous Lupus Erythematosus. In: Kuhn A, Lehmann P, Ruzicka T. eds. *Cutaneous Lupus Erythematosus.* Berlin:Springer-Verlag; 2005. p.59-92.

Kuhn A, Krammer PH, Kolb-Bachofen V. Pathophysiology of cutaneous lupus erythematosus-novel aspects. *Rheumatology.* 2006;45:iii14-iii16.

Kuhn A, Bijl M. Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Lupus*. 2008;17:389-93.

Lee LA, Roberts CM, Frank MB, McCubbin VR, Reichlin M. The autoantibody response to Ro/SSA in Cutaneous Lupus Erythematosus. *Arch Dermatol*. 1994;130:1262-8.

Lee LA. Transient autoimmunity related to maternal autoantibodies: neonatal lupus. *Autoimmunity Reviews*. 2005;4:207-13.

Lee LA. Lupus Erytematosus. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP. *Dermatology*. 2a ed. Spain: Mosby Elsevier; 2008. p.561-74.

Lee SS, Ackerman AB. Lupus dermatitis is an expression of systemic lupus erythematosus. *Dermatopathol Pract Concept*. 1997; 3(4):346-7.

Lehmann P, Holzle E, Kind P, Goerz G, Plewig G. Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation. *J Am Acad Dermatol*. 1990;22(2):181-87.

Lin JH, Dutz JP, Sontheimer RD, Werth VP. Pathophysiology of cutaneous Lupus Erythematosus. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2007;33:85-106.

Linker-Israeli M. Cytokine Abnormalities in Human Lupus. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1992;63(1):10-2.

Lourenço SV, Sotto MN, Vilela MAC, Carvalho FRG, Rivitti EA, Nico MMS. Lupus erythematosus: clinical and histopathological study of oral manifestations and immunohistochemical profile of epithelial maturation. *J Cutan Pathol*. 2006;33:657-62.

Lourenço SV, Carvalho FRG, Boggio P, Sotto MN, Vilela MAC, Rivitti EA, Nico MMS. Lupus erythematosus: clinical and histopathological study of oral manifestations and immunohistochemical profile of the inflammatory infiltrate. *J Cutan Pathol*. 2007;34:558-64.

Min DJ, Cho ML, Cho CS, Min SY, Kim WU, Yang SY, Min JK, Hong YS, Lee SH, Park SH, Kim HY. Decreased production of interleukin-12 and interferon- γ is associated with renal involvement in systemic lupus erythematosus. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 2001;30:159-63.

Nath SK, Kilpatrick J, Harley JB. Genetics of human systemic lupus erythematosus: the emerging picture. *Current Opinion in Immunology*. 2004;16:794–800.

Nico MMS, Vilela MAC, Rivitti EA, Lourenço SV. Oral lesions in lupus erythematosus: correlation with cutaneous lesions. *Eur J Dermatol.* 2008; 18(4):376-81.

Norris DA, Whang K, David-Bajar K, Bennion SD. The influence of ultraviolet light on immunological cytotoxicity in the skin. *Photochem Photobiol.* 1997;65(4):636-46.

Orteu CH, Buchanan JAG, Hutchison I, Leigh IM, Bull RH. Systemic lupus erythematosus presenting with oral mucosal lesions: easily missed ? *British Journal of Dermatology.* 2001;144:1219-23.

Oukka M. Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(3):iii26-iii29.

Parronchi P, De Carli M, Manetti R, Simonelli C, Sampognaro S, Piccinni MP, Macchia D, Maggi E, Del Prete G, Romagnani S. IL-4 and IFN (α and γ) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J Immunol.* 1992;149:2977-83.

Plemons JM, Gonzales TS, Burkhart NW. Vesiculobullous diseases of the oral cavity. *Periodontology 2000.* 1999;21:158-75.

Rahman A. Cytokines in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(4):160-4.

Richaud-Patin Y, Alcocer-Varela J, Llorente L. High levels of TH2 cytokine gene expression in systemic lupus erythematosus. *Rev Invest Clin.* 1995;47:267-72.

Rosenbaum M, Werth VP. Pathogenesis of Cutaneous Lupus Erythematosus: The Role of Ultraviolet Light. In: Kuhn A, Lehmann P, Ruzicka T, eds. *Cutaneous Lupus Erythematosus*. Berlin: Springer-Verlag; 2005. p.251-66.

Sampaio SAP, Rivitti EA. *Dermatologia*. 3^a ed. São Paulo: Artes Médicas; 2007. p.455-73.

Schiodt M. Oral discoid lupus erythematosus. III. A histopathologic study of sixty-six patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984;57:281-93.

Schneider SW, Luger TA. Experimental Therapies in Cutaneous Lupus Erythematosus. In: Kuhn A, Lehmann P, Ruzicka T, eds. *Cutaneous Lupus Erythematosus*. Berlin: Springer-Verlag; 2005. p.419-36.

Schwarz T. Immunology. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP. *Dermatology* 2^a ed. Spain: Mosby Elsevier; 2008. p.63-79.

Sestak AL, Nath SK, Harley JB. Genetics of Systemic Lupus Erythematosus: How far have we come? *Rheum Dis N Am*. 2005;31:223-4.

Singh AK. Cytokines Play a Central Role in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Medical Hypotheses*. 1992a;39:356-9.

Singh AK. Do cytokines play a role in systemic lupus erythematosus? *Journal of the Royal College of Physicians of London*. 1992b;26(4):374-6.

Shreedhar V, Giese T, Sung VW, Ullrich SE. A Cytokine Cascade Including Prostaglandin E2, IL-4, and IL-10 Is Responsible for UV-Induced Systemic Immune Suppression. *The Journal of Immunology*. 1998;160:3783-9.

Sontheimer RD, Provost TT. Lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH. *Dubois lupus erythematosus*. 5thed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p.569-623.

Sontheimer RD. Skin manifestations of systemic autoimmune connective tissue disease: diagnostics and therapeutics. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2004;18(3):429-62.

Specker C, Schneider M. Relationship between cutaneous and systemic lupus erythematosus In: Kuhn A, Lehmann P, Ruzicka T. (eds). *Cutaneous Lupus Erythematosus*. Berlin: Springer-Verlag; 2005. p.177-86.

Stein LF, Saed GM, Fivenson DP. T-cell cytokine network in cutaneous lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol.* 1997;36(2):191-6.

Suárez A, López P, Mozo L, Gutiérrez C. Differential effect of IL-10 and TNF- α genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2005;64:1605-10.

Theofilopoulos AN, Koundouris S, Kono DH, Lawson BR. The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. *Arthritis Res.* 2001;3(3):136-141.

Toro JR, Finlay D, Dou X, Zheng SC, LeBoit PE, Connolly MK. Detection of type I cytokines in discoid lupus erythematosus. *Arch Dermatol.* 2000;136:1497-501.

Tucci M, Lombardi L, Richards HB, Dammacco F, Silvestris F. Overexpression of interleukin-12 and T helper 1 predominance in lupus nephritis. *Clinical and Experimental Immunology.* 2008;154:247–54.

Tsao BP, Ohnishi K, Cheroutre H, Mitchell B, Teitell M, Mixter P, Kronenberg M, Hahn B. Failed self-tolerance and autoimmunity in IgG anti-DNA transgenic mice. *J Immunol.* 1992;149:350-8.

Uppal S, Hayat S, Raghupathy R. Efficacy and safety of infliximab in active SLE: a pilot study. *Lupus*. 2009;18(8):690-7

Vasconcelos DM. A Resposta Imune. In: Grumach AS. *Alergia e Imunologia na Infância e na Adolescência*. 2ªed. São Paulo: Editora Atheneu; 2009. p. 381-404.

Weiss E, Mamelak AJ, Morgia SL, Wang B, Feliciani C, Tulli A, Sauder DN. The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2004;50(5):657-75.

Wenzel J, Wörenkämper E, Freutel S, Henze S, Haller O, Bieber T, Tüting T. Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *Journal of Pathology*. 2005;205:435-42.

Werth VP, Zhang W, Dortzbach K, Sullivan K. Association of a Promoter Polymorphism of Tumor Necrosis Factor- α with Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus and Distinct Photoregulation of Transcription. *The Journal of Investigative Dermatology* 2000;115(4):726-30.

Werth VP, Bashir MM, Zhang W. IL-12 completely blocks ultraviolet-induced secretion of tumor necrosis factor alpha from cultured skin fibroblasts and keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2003;120:116-22.

Werth VP. Cutaneous Lupus insights into Pathogenesis and Disease Classification. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases* 2007;65(3):200-4.

Williams EL, Gadola S, Edwards CJ. Anti-TNF- induced lupus. *Rheumatology* (Oxford). 2009; 48(7):716-20

Wysenbeek AJ, Guedj D, Amit M, Weinberger A. Rash in systemic lupus erythematosus: prevalence and relation to cutaneous and non-cutaneous disease manifestations. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1992;51:717-9.

11. Apêndices

Oral lesions in lupus erythematosus—cytokines profiles of inflammatory infiltrate

Background: Lupus erythematosus (LE) is a chronic inflammatory disease. Presence of type 1 cytokines in cutaneous discoid lesions suggests that they may be critical for induction, development and maintenance of these manifestations. Type 2 cytokines in combination with local interferon gamma (INF- γ) are thought to be related to the physiopathology of cutaneous LE. Cytokines profiles are still unknown in oral LE lesions.

Materials and Methods: Expression of Th1 and Th2 cytokines (including IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and INF- γ) was investigated and compared in 29 biopsies of intra-oral (sun-protected) and labial lesions (sun-exposed) of LE using immunohistochemistry.

Results: Inflammatory infiltrate of LE lesions was strongly positive for INF- γ (97%) and TNF- α (90%), both Th1 type cytokines. Interleukin-10, a Th2 cytokine was also strongly expressed. Other cytokines were only mildly positive. Cytokines patterns were similar in intra-oral (sun-covered) and labial (sun-exposed) LE lesions.

Conclusions: Oral LE lesions are associated with both type 1 and type 2 cytokines, characterized by stronger expression of INF- γ , TNF- α and IL-10. These findings suggest that although ultraviolet (UV) light is involved in the induction of LE lesions, mechanisms of lesions formation may be similar in sun-exposed as well as sun-covered areas.

Marques ERM, Lourenço SV, Lima DM, Nico MMS. Oral lesions in lupus erythematosus—cytokines profiles of inflammatory infiltrate.

J Cutan Pathol 2009. © 2009 John Wiley & Sons A/S.

Elisa R. M. C. Marques¹, Silvia Vanessa Lourenço^{1,2,3}, Dirce M. Lima³ and Marcello Menta S. Nico¹

¹Dermatology Department, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil,

²General Pathology Department, Dental School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, and

³Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Silvia Vanessa Lourenço, DDS, PhD, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, CEP: 05508-000, São Paulo, SP, Brazil
Tel/Fax: +55 11 3061 7062
e-mail: silvialourenco@usp.br

Accepted for publication August 7, 2009

Lupus erythematosus (LE) is a chronic inflammatory disorder, considered the prototype of autoimmune human disease. Genetic, immunologic, hormonal and environmental factors are involved in its pathogenesis. LE occurs at both extremes of age in either sex, although it is more commonly diagnosed in women of childbearing age.^{1–3} LE is a multisystem disease and mucocutaneous lesions are among its commonest presentations.¹ The classification of LE in cutaneous and systemic is artificial since the same pathological process is known to be involved in both presentations.^{1,2} Skin/Mucosal lesions are classically divided in acute, subacute and chronic and, in

a recent review, our group discussed the identity and similarities between oral and skin lesions.⁴ The prevalence of mucosal involvement in patients with LE is uncertain, and according to some authors, may vary from 9% to 45% in patients diagnosed with systemic disease and from 3% to 20% in patients with chronic cutaneous involvement.^{5–7}

Oral lesions in LE comprise a variety of clinical aspects, that histologically consist of an interface mucositis with superficial and deep inflammatory infiltrate, composed predominantly of T-lymphocytes.^{4,8} In a previous work we showed that the acanthotic epithelium shows a cytokeratin profile

of hyperproliferation despite the clinical aspects of atrophy.⁹ This epithelial feature may be the result of a combination of effects produced by growth factors and cytokines secreted by the inflammatory infiltrate.⁸ Some authors have described the presence of type 1 cytokines in cutaneous skin discoid lesions, suggesting that they may be critical for induction, development and maintenance of these cutaneous manifestations.¹⁰ Others speculate that type 2 cytokines in combination with local interferon gamma $\text{INF-}\gamma$ production may be related to the physiopathology of cutaneous LE.¹¹

In the present study we investigated the expression of several cytokines in oral lesions of LE to further understand the morphological aspects of oral mucosal tissues in LE and compared the cytokine profile of intra-oral (sun-protected) with labial (sun-exposed) lesions.

Material and methods

Twenty-nine patients with confirmed diagnosis of LE and presenting specific oral lesions were included in the study.

Clinical lesions were classified in acute, subacute and chronic according to clinical features⁴ and analogy to cutaneous lesions in the same patient: chronic lesions—lesions with the typical aspect often described as “discoid”, “keratotic”, “verrucous”, “honeycomb” and “chronic ulcerated”⁴; subacute lesions—discrete mucosal lesions in patients with typical subacute cutaneous LE⁴; acute lesions—lesions with typical aspect often described as “purpuric”, “eroded”, “aphtoid” and “bullous”, commonly affecting patients with severe systemic involvement.⁴ Differential diagnosis with other mucocutaneous diseases such as lichen planus and lichenoid reactions was based on clinico-pathological correlation; histopathological differentiation between them is included on Table 1.

Demographical data included age, race and sex of all patients. Lesions were biopsied and analyzed microscopically. For the later, sections of the biopsied lesions were fixed in formalin at 10%, histologically processed and stained with routine hematoxylin

and eosin (H & E) and periodic acid-Schiff (PAS). Direct immunofluorescence examination (DIF) was also performed in all the specimens biopsied (fresh tissue). Control specimens included mucosal sections from dental surgery of three healthy individuals (fixed similarly to the previous, and histologically processed). All patients included had given informed consent before excision. This study was approved by the Local Ethical Committee.

Immunohistochemistry

Analysis of cytokines profile of the inflammatory infiltrate of biopsied oral LE lesions was performed in all specimens. Serial sections of 3 μm from these specimens were subjected to immunohistochemistry against IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-alpha ($\text{TNF-}\alpha$) and IFN- γ . Antigen retrieval and primary antibodies clones, sources and titles are detailed in Table 2. Staining was completed with the chromogen 3,3'-diaminobenzidin. After that, specimens were lightly counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated and mounted with glass cover slip and xylene based mountant.

Immunohistochemical analysis of the same cytokines was performed in oral mucosa from healthy controls. Negative controls were incubated with nonimmune serum. Positive controls were employed according to manufacturer's recommendation.

The expression of all cytokines studied was scored semiquantitatively in each case as follows: 0: negative; +: weak expression or until 20%; ++: moderate expression or until 60% and +++: strong expression or more than 60%.

Results

Clinical information regarding age and sex, race, involvement of the disease (chronic, subacute or acute LE), sites of mucosal lesions and their clinical aspects are summarized in Table 3. Illustrative examples of oral lesions of LE are seen in Fig. 1.

The main histological aspects in all the biopsied lesions corresponded to an interface mucositis with superficial and deep and perivascular inflammatory

Table 1. Antibodies, clones, source and working protocol

Primary serum	Clone	Source	Antigen retrieval	Title
IL-4	Polyclonal AF-204-NA	RD system	1% Trypsin in PBS at 37°C	1:40
IL-5	Monoclonal 9906	RD system	Citrate buffer pH 6.0 at 95°C	1:50
IL-6	Polyclonal Ab6672	Abcam	Tris-EDTA, pH9.0 at 95°C	1:750
IL-10	Polyclonal AF-217-NA	RD system	1% Trypsin in PBS at 37°C	1:10
IL-12	Monoclonal C11.5	Abcam	Tris-EDTA, pH9.0 at 95°C	1:50
TNF-alpha	N19 1350	Santa Cruz	1% Trypsin in PBS, room temperature	1:30
IFN-gamma	mab 285 25718 111	RD system	Tris-EDTA, pH9.0 at 95°C	1:30

Table 2. Clinical information including sex, age, race, type of Lupus erythematosus involvement, clinical aspects, sites and immunohistochemical aspects of cytokines expression of LE oral lesions

Case	Sex/age	Race	LE	Clinical aspects of mucosal lesions		Th2				Th1		
						IL-4	IL-5	IL-6	IL-10	IL-12	TNF- α	IFN- γ
<i>M</i>												
1	F/30	Caucasian	SLE	Acute	Palate	0	++	+++	++	0	0	+++
2	F/36	Caucasian	SLE	Acute	Buccal mucosa	0	++	++	++	0	++	+
3	M/33	Mulatto	SLE	Acute	Lips	0	++	+	+	+	+++	++
4	F/22	Caucasian	SLE	Acute	Palate	0	++	++	0	+	++	+
5	F/14	Caucasian	SLE	Subacute	Palate	0	++	++	+	0	++	0
6	F/48	Caucasian	CLE	Chronic discoid	Buccal mucosa	0	++	+++	+++	+	+	++
7	F/41	Mulatto	SLE	Chronic discoid	Buccal mucosa	++	++	++	+++	0	+++	+
8	F/27	—	SLE	Chronic discoid	Buccal mucosa	+	++	+++	+++	+	++	+++
9	F/27	Black	SLE	Chronic discoid	Buccal mucosa	+	++	+++	++	0	0	+++
10	F/34	Mulatto	SLE	Chronic discoid	Lips	0	++	+++	0	0	++	+
11	F/34	—	SLE	Chronic discoid	Palate	0	++	+++	++	0	+	+++
12	F/38	Caucasian	SLE	Chronic discoid	Palate	0	++	+	++	0	+	++
13	F/37	Mulatto	CLE	Chronic discoid	Palate	+	+++	++	++	0	++	++
14	F/26	—	CLE	Chronic discoid	Buccal mucosa	0	++	++	+	0	+	++
15	F/43	Caucasian	CLE	Chronic discoid	Buccal mucosa	0	++	++	++	+	+	++
16	F/29	Black	CLE	Chronic discoid	Buccal mucosa	++	++	+++	+++	++	+	+++
17	M/40	Caucasian	LE	Chronic discoid	Buccal mucosa	0	++	++	+	+	0	++
18	M/13	—	CLE	Chronic discoid	Buccal mucosa	+	++	++	++	0	+	+
19	M/39	Caucasian	CLE	Chronic discoid	Buccal mucosa	0	++	++	++	+	++	++
20	F/29	Mulatto	SLE	Chronic discoid	Buccal mucosa	0	++	+++	+	0	+++	+
21	F/43	—	LE	Chronic discoid	Buccal mucosa	0	++	++	+	0	+	++
22	F/19	—	CLE	Chronic discoid	Palate	0	++	+	0	0	++	+
23	F/25	—	LE	—	Buccal mucosa	0	++	++	++	0	+	+++
<i>SM</i>												
24	F/21	Caucasian	SLE	Acute	Lips	0	++	++	+	+	+	++
25	F/51	Caucasian	CLE	Chronic discoid	Lips	0	+++	++	+	0	++	+++
26	F/33	—	SLE	Chronic discoid	Lips	0	++	++	0	+	+	++
27	M/38	Black	CLE	Chronic discoid	Lips	+	+++	++	++	+	+	+++
28	F/57	Mulatto	CLE	Chronic discoid	Lips	0	++	++	++	0	++	+++
29	M/53	—	CLE	Chronic discoid	Lips	0	++	+++	++	++	++	+++
<i>HC</i>												
1					Retro-molar trigone	0	+	+	0	0	0	+
2					Retro-molar trigone	0	+	+	0	0	+	0
3					Retro-molar trigone	0	+	+	0	0	0	0

M, mucosal; SM, semi-mucosal; HC, normal oral mucosa-healthy control; –, information unavailable.

infiltrate. In cases of acute lesions a diffuse mixed inflammatory infiltrate was predominant. These aspects are shown in Fig. 2. Thickening of epithelial and vascular basement membranes were clearly shown on PAS stained sections.

The most commonly observed patterns of direct immunofluorescence included granular IgM, IgG, IgA or C3 deposition at the basement membrane zone.

Immunohistochemical analysis

All specimens included in the study were adequate for immunohistochemical analysis. Positivity for the antibodies employed was considered when a golden-brown stain was observed in the inflammatory cells

that composed the infiltrate in the biopsied lesions. All results of immunohistochemical analysis of cytokines in oral lesions of LE are summarized in Table 2 and illustrated in Fig. 3.

Discussion

The analysis of cytokines of twenty-nine mucosal and semi-mucosal LE lesions accompanying LE cutaneous manifestation of acute, subacute and chronic LE,⁴ revealed that all lesions presented both characteristics of Th1 and Th2 response. Considering Th1 cytokines, positivity was stronger for IFN- γ and TNF- α . IL-12 was only seen as a weak positive. Cytokines of Th2 immune response in our

Table 3. Histopathological differential diagnosis between oral lupus erythematosus (LE), oral Lichen planus (LP), and lichenoid drug reaction

	Oral LE	Oral LP	Lichenoid drug reactions
Epithelial alterations	Hyperkeratosis, hypergranulosis, acanthosis and atrophy, spongiosis, hydropic vacuolization (patchy or widespread), colloid bodies, hyperproliferation of basal layer, at times with presence of atypical keratinocytes.	Hyperkeratosis, hypergranulosis, acanthosis and atrophy, epithelial cones in "saw-tooth" pattern, spongiosis, hydropic vacuolization (patchy or widespread). In severe cases, complete destruction of basal layer is seen.	Hyperkeratosis, hypergranulosis, acanthosis and atrophy, marked spongiosis, hydropic degeneration, necrotic cells on the suprabasal layers
Basement membrane (epithelial and vascular wall)	Regular or focal thickening of epithelial basement membrane associated with thickening of vascular walls.	Focal or widespread destruction of basement membrane by inflammatory infiltrate.	Widespread destruction of basement membrane by inflammatory infiltrate.
Lamina propria	Lymphocytic predominant inflammatory infiltrate of variable intensity with limited or widespread aggression to the basal keratinocytes. Inflammatory infiltrate is seen both in the superficial lamina propria (lichenoid) and deep perivascular. Vessel walls are prominent with endothelial tumefaction. Edema and variable deposits of mucin are present.	Superficial lymphocytic predominant lichenoid infiltrate with presence of Langerhans cells.	Heavy lymphocytic predominant lichenoid infiltrate, with presence of eosinophils. Inflammatory infiltrate may be present around vessels in mid and deep lamina propria. Prominent interstitial edema and vascular congestion are present.

cases included IL-5 and IL-6, which were positive; IL-10 that was strongly expressed and IL-4, which was only occasionally detected.

Fig. 1. Clinical examples of oral lesions of lupus erythematosus. A), B) and C) Intra-oral discoid lesions (sun-covered areas). D) Extensive discoid lesion on upper and lower vermillion (sun-exposed areas).

Fig. 2. Histopathological and immunofluorescence aspects of oral LE lesions. A) Mucositis with lichenoid and perivascular inflammatory infiltrate (hematoxylin and eosin, original magnification 40 $\times$). B) Closer view of the interface inflammatory infiltrate: vacuolar degeneration of basal keratinocytes and colloid bodies (hematoxylin and eosin, original magnification 400 $\times$). C) Perivascular inflammatory infiltrate associated with thickening of blood vessels walls (hematoxylin and eosin, original magnification 250 $\times$). D) Direct immunofluorescence showing linear deposits of IgG along the basement membrane.

There is progressively more evidence that cytokines are important players in the pathogenesis of LE.^{12–14} Previous studies evaluated cytokines only

Fig. 3. Expression of cytokines in oral LE lesions. A) Mild expression of IL-4 in the lichenoid infiltrate (A1) and stronger expression of this cytokine in the interstitial aspect of mucous salivary gland lobule (A2) (original magnification 40 $\times$ and 400 $\times$, respectively). B) and C) Mild and scarce expression of IL-5 and IL-6 in the inflammatory infiltrate of oral LE lesions, respectively (original magnification 400 $\times$). Expression of IL-10: strong expression of this interleukin in the lichenoid infiltrate (D). A closer view of IL-10 expression in the cytoplasm of inflammatory cells of oral LE lesions (E) (original magnification 40 $\times$ and 400 $\times$). F) A very weak expression of IL-12 in the inflammatory infiltrate of oral LE lesions (original magnification 400 $\times$). G) Strong presence of TNF-alpha in a few cells inflammatory cells of oral LE lesions (original magnification 400 $\times$). H) Strong and widespread expression of IFN-gamma in the inflammatory infiltrate of oral LE lesions (original magnification 400 $\times$).

in skin lesions^{10,11}; mucosal lesions have not been evaluated so far. The importance of Th2 or Th1 responses in LE has been increasingly debated and there is still no consensus on their specific relevance to the disease process. Conflicting data are reported: some investigators report predominance of type 1 cytokines in cutaneous skin discoid lesions¹⁰ and others speculate that type 2 cytokines in combination with local IFN- γ production may be related to the

physiopathology of cutaneous LE.¹¹ Recently, some workers described that IFN type I and TNF- α play a key role in the pathogenesis of LE.^{15,16}

Interferon gamma and TNF- α were intensely positive in our sections (97% and 90%, respectively). TNF- α and IFN- γ are prominent Th1 cytokines. TNF- α is both a pro-inflammatory and immunoregulatory cytokine. It has differential effects on B cells, T cells as well as on the process of programmed cell death. The involvement of TNF- α in the pathogenesis of LE has been highlighted by several researchers,^{17–20} mainly after the availability of anti-TNF therapy,²¹ even though other authors have reported the onset of LE in patients where these drugs were employed for other conditions.²² The genetic regulation of TNF- α production is shown by the association of -308 A polymorphism of the human TNF- α gene with LE.^{16,23} Increased expression of TNF- α in SLE was yet observed by Richaud-Patin et al.²⁴ IFN- γ is another prominent Th1 cytokine with relevant pro-inflammatory function. It has been postulated that IFN- γ could be implicated in lupus nephritis in mice and in the skin pathology of lupus.^{25,26} Its involvement in SLE has been confirmed by some authors.^{27–29} The increased expression of IFN- γ was observed by Toro et al.¹⁰ and Stein et al.¹¹ in cutaneous LE specimens. The presence of TNF- α was also shown by Toro et al.¹⁰ in the majority of cutaneous LE specimens, although it was detected in all biopsies of normal patient skin. Our results are in agreement with the literature.

Interleukin 12 was only occasionally positive in our sections. The IL-12 production by peripheral blood monocytes is lower in SLE patients than in healthy controls.²⁸ This low production may be attributable to the excessive IL-10 production that is known to occur in the disease. Our result is in accordance with these findings.

IL-10 was the most prevalent Th2 cytokine in our specimens. Ninety per cent of cases were intensely positive for this cytokine. IL-10, a prominent Th2 cytokine, is a potent inducer of B lymphocyte differentiation, as well as an inhibitor of helper T lymphocyte and antigen-presenting cells (APCs) function.

Some authors discuss the role of IL-10 in the pathogenesis of LE.^{17,30} However, the genetic regulation of IL-10 in patients with LE has been shown^{23,28} and some workers confirm the increased expression of IL-10 in SLE.^{24,29,31} Our findings support previous results, which showed the presence of IL-10 in 10 of 19 specimens of cutaneous LE.¹¹

We found positive expression of IL-5 and IL-6 in all studied specimens and also in normal controls. However, their positivity was stronger on the LE biopsies. These findings are in agreement

with literature findings. IL-6 is a Th2 cytokine with multiple effects in several biological systems, including immune regulation.²⁷ Some authors observed that SLE patients have increased IL-6 titers in serum and in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with or without correlation with disease activity.^{24,27} Presence of IL-6 is also reported in SLE patients with cardiopulmonary and renal disease.²⁷ In addition, its levels are reported to be elevated in the sera and in cerebrospinal fluid of patients with SLE.²⁸ Besides, IL-6 has been shown in skin biopsies specimens taken from patients with various LE subtypes.²⁸

In another study, IL-5, a Th2 cytokine, was present in 16 of 19 specimens of cutaneous LE.¹¹ Our results are in agreement with literature findings.

Interleukin 4 (IL-4) was hardly ever detected in both mucosa and semi-mucosal specimens in our study. IL-4 is another prominent Th2 cytokine and was originally described as a cytokine that delivers early activation and class-switch signals to lymphocyte, essential for stimulating B cells.

Our results about IL-4 match with previous findings demonstrating decreased or absent expression in cutaneous LE specimens.^{10,11} The same was observed in PBMC from patients with SLE.^{29,32} In addition, the inhibitory effect of IFN- γ on IL-4 transcription is well supported by the literature.³³ Based on our results and in accordance with previous reports in the literature, we may conclude that IFN- γ may be responsible for the inhibition of IL-4.

In this study, we also compared the profile of cytokines of oral LE mucosal (sun-protected) with lower lip (sun-exposed) lesions. Ultraviolet (UV) light of varying wavelengths (UVB—290–320 nm and UVA—320–400 nm) can induce abnormal skin responses and cutaneous lesions in lupus patients.^{32,33} It is often stated that sunlight cannot only aggravate cutaneous LE but can potentiate systemic features of disease.¹³

The link between photosensitivity and the induction of autoimmune disease is explained using a model centered on the apoptotic cell.

Ultraviolet might be an important initiator of apoptosis in keratinocytes. Both apoptosis induction and apoptotic cell clearance can be determined by genetical abnormalities, and result in an increased load of apoptotic cells. Apoptosis may be an important mechanism leading to autoantigen presentation in cutaneous LE.^{12–14,34–39} In addition to promoting cell death and neoantigen generation, UV lights also induces and modulates immune and inflammatory mediators by increasing levels of both IL-10 and IL-12.^{12–14,36} IL-10 induces systemic immunosuppression and tolerance by promoting Th2 response. IL-12 seems to promote

a Th1 response and can reverse UV-induced IL-10 immunosuppression and tolerance.³⁶ IL-12 may also have a role in controlling UV-mediated apoptosis by suppression of TNF- α .³⁷

Despite of the above stated, our results did not reveal differences in cytokine expression when we compared sun-exposed (lower lip) and sun-covered (intra-oral) areas (Table 2). These findings may suggest that even though UV light is known to be of great importance in the induction of LE activity, mechanisms of mucocutaneous lesions formation may be similar in sun-exposed and in sun-covered areas, after the whole process has been initiated. These findings are in accordance with the hypothesis that oral LE lesions represent the mucosal counterpart to cutaneous LE,^{4,40} because they probably come to being by the action of the same molecular inductors.

In conclusion, our results suggest that oral LE is associated with both type 1 and type 2 cytokines, characterized by stronger expression of INF- γ , TNF- α and IL-10. We also observed that there is no significant difference between the profiles of cytokines in oral mucosal (sun-covered) or semi-mucosal (sun-exposed) LE lesions. These findings reconfirm that both type 1 and type 2 cytokines may be related to the physiopathology of oral LE lesions.

References

1. Crowson AN, Magro C. The cutaneous pathology of lupus erythematosus: a review. *J Cutan Pathol* 2001; 28: 1.
2. Kuhn A, Ruzicka T. Classification of cutaneous lupus erythematosus. In Kuhn A, Lehmann P, Ruzicka T, eds. *Cutaneous lupus erythematosus*. Germany: Springer, 2005; 5.
3. Karjalainen TK, Tomich CE. A histopathologic study of oral mucosal lupus erythematosus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 67: 547.
4. Nico MMS, Vilela MAC, Rivitti EA, Lourenço SV. Oral lesions in lupus erythematosus: correlation with cutaneous lesions. *Eur J Dermatol* 2008; 18: 376.
5. Burge SM, Frith PA, Juniper RP, Wojnarowska F. Mucosal involvement in systemic and chronic cutaneous lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 1989; 121: 727.
6. Jonsson R, Heyden G, Westberg NG, Nyberg G. Oral mucosal lesions in systemic lupus erythematosus: a clinical, histopathological and immunopathological study. *J Rheumatol* 1984; 11: 38.
7. Schiodt M. Oral discoid lupus erythematosus. III. A histopathologic study of sixty-six patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984; 57: 281.
8. Lourenço SV, Sotto MN, Vilela MAC, Carvalho FRG, Rivitti EA, Nico MMS. Lupus erythematosus: clinical and histopathological study of oral manifestations and immunohistochemical profile of epithelial maturation. *J Cutan Pathol* 2006; 33: 657.
9. Lourenço SV, Carvalho FRG, Boggio P, et al. Lupus erythematosus: clinical and histopathological study of oral manifestations and immunohistochemical profile of the inflammatory infiltrate. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 558.

10. Toro JR, Finlay D, Dou X, Zheng SC, LeBoit PE, Connolly MK. Detection of type I cytokines in discoid lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 2000; 136: 1497.
11. Stein LF, Saed GM, Fivenson DP. T-cell cytokine network in cutaneous lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36: 191.
12. Kuhn A, Bijl M. Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* 2008; 17: 389.
13. Lin JH, Dutz JP, Sontheimer RD, Werth VP. Pathophysiology of cutaneous Lupus Erythematosus. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2007; 33: 85.
14. Werth VP. Cutaneous lupus insights into pathogenesis and disease classification. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2007; 65: 200.
15. Wenzel J, Wörenkämper E, Freutel S, et al. Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *J Pathol* 2005; 205: 435.
16. Werth VP, Zhang W, Dortzbach K, Sullivan K. Association of a promoter polymorphism of Tumor Necrosis Factor- α with Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus and distinct photoregulation of transcription. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 726.
17. Rahman A. Cytokines in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 160.
18. Singh AK. Cytokines play a central role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Med Hypotheses* 1992; 39: 356.
19. Singh AK. Do cytokines play a role in systemic lupus erythematosus? *J Roy Coll Phys Lond* 1992; 26: 374.
20. Aringer M, Smolen JS. SLE-Complex cytokine effects in a complex autoimmune disease: tumor necrosis factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 172.
21. Uppal S, Hayat S, Raghupathy R. Efficacy and safety of infliximab in active SLE: a pilot study. *Lupus* 2009; 18: 690.
22. Williams EL, Gadola S, Edwards CJ. Anti-TNF-induced lupus. *Rheumatology (Oxford)*. 2009; 48: 716.
23. Suárez A, López P, Mozo L, Gutiérrez C. Differential effect of IL-10 and TNF- α genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1605.
24. Richaud-Patin Y, Alcocer-Varela J, Llorente L. High levels of TH2 cytokine gene expression in systemic lupus erythematosus. *Rev Invest Clin* 1995; 47: 267.
25. Hass C, Ryffel B, Le Hir M. IFN- γ receptor deletion prevents autoantibody production and glomerulonephritis in lupus-prone (NZB $\times$ NZW) F1 mice. *J Immunol* 1998; 160: 3713.
26. Barcellini W, Rizzard GP, Borghi MO, Nicoletti F, Fain C, Del Papa N. In vitro type-1 and type-2 cytokine production in systemic lupus erythematosus: lack of relationship with clinical disease activity. *Lupus* 1996; 5: 139.
27. Linker-Israeli M. Cytokine abnormalities in human lupus. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 63: 10.
28. Dean GS, Tyrrell-Price J, Crawley E, Isenberg DA. Cytokines and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 243.
29. Csiszár A, Nagy GY, Gergely P, Pozsonyi T, Pócsik É. Increased interferon-gamma (IFN- γ), IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 2000; 122: 464.
30. Weiss E, Mamelak AJ, Morgia SL, et al. The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50: 657.
31. Kalsi JK, Grossman J, Kim J, et al. Peptides from antibodies to DNA elicit cytokine release from peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus: relation of cytokine pattern to disease duration. *Lupus* 2004; 13: 490.
32. Horwits DA, Wang H, Gray JD. Cytokine gene profile in circulating blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus: increased interleukin-2 but not in interleukin-4 mRNA. *Lupus* 1994; 3: 423.
33. Parronchi P, De Carli M, Manetti R, et al. IL-4 and IFN (α and γ) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J Immunol* 1992; 149: 2977.
34. Bijl M, Kallenberg CGM. Ultraviolet light and cutaneous lupus. *Lupus* 2006; 15: 724.
35. Casciola-Rosen L, Rosen A. Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: a potential mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in LE. *Lupus* 1997; 6: 175.
36. Rosenbaum M, Werth VP. Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus: the role of ultraviolet light. In Kuhn A, Lehmann P, Ruzicka T, eds. *Cutaneous lupus erythematosus*. Germany: Springer, 2005; 251.
37. Werth VP, Bashir MM, Zhang W. IL-12 completely blocks ultraviolet-induced secretion of tumor necrosis factor alpha from cultured skin fibroblasts and keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 116.
38. Kuhn A, Sonntag M, Richter-Hintz D, et al. Phototesting in lupus erythematosus: a 15 year experience. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45: 86.
39. Lehmann P, Holzle E, Kind P, Goerz G, Plewig G. Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 181.
40. Lee SS, Ackerman AB. Lupus dermatitis is an expression of systemic lupus erythematosus. *Dermatopathol Pract Concept* 1997; 3: 346.