GABRIEL COSTA DE CARVALHO

Análise do perfil fenotípico e funcional das células *natural killer* e linfócitos TCD8+ no Líquen plano

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Dermatologia

Orientadora: Profª Drª. Maria Notomi Sato

São Paulo
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Gabriel Costa de
Análise do perfil fenotípico e funcional das células *Natural Killer* e linfócitos TCD8+ no líquen plano / Gabriel Costa de Carvalho. -- São Paulo, 2016.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Dermatologia.
Orientadora: Maria Notomi Sato.

Descritores: 1.Líquen plano 2.Peptídeos catiônicos antimicrobianos 3.Linfócitos T CD8-positivos 4.Células matadoras induzidas por citocinas 5.Citotoxicidade imunológica

USP/FM/DBD-153/16

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, meu pai Walmir, minha mãe Mônica, minha irmã Daniele, a minha esposa Vivian por todo amor, carinho e força nesta etapa de minha vida e ao meu filho David que vem para alegrar nossa família.

Agradecimentos Especiais

À Professora Dra. Maria Notomi Sato, por ser um exemplo como pesquisadora e mostrar que o carinho aliado à dedicação são fundamentais para um bom trabalho. Por todo apoio intelectual, paciência e incentivo para a execução deste trabalho.

Agradecimentos

À Deus por me propor desafios e me fazer sempre confiar um resultado positivo.

À meu pai (Walmir) e minha mãe (Mônica) e minha irmã (Daniele) pelo amor e criação que me deram.

À minha esposa (Vivian) que com amor, carinho, todo momento esteve presente para me confortar.

Ao meu filho(a) David, fruto que me alegra e inspira a novas conquistas.

À toda minha família que agrega todo apoio emocional, as risadas, a compreensão e o companheirismo mesmo que a distância.

Ao professor Alberto José da Silva Duarte por me permitir atuar no LIM e por me fornecer a estrutura necessária para este trabalho.

Ao professor Dr. Claus Kerkhoff da Universidade de Osnabrück por me ensinar além do meu trabalho e me receber com carinho em seu laboratório na Alemanha. As suas alunas Hannah, Yvonne pela paciência e dedicação em me ensinar novas técnicas e a funcionária Karin pelo carinho em me acolher como membro de sua família no exterior.

Aos amigos do LIM-56: Rosana, Kelly, Camila, Vanessa, Raquel, Luanda , Tiago Titz, Jefferson, Fábio, Luana, Anna Claúdia, Natalli, Marilia, Marina, Franciane, Raíssa.e Ana Júlia.

A Noemia, Rosangela e Patricia do (setor de Citometria de Fluxo), Ao José Eduardo (setor da Carga Viral), Tatiana (setor de Cultura Celular), Luiz, Lucio, Edna, Evelyn e Cristina (secretaria), Anderson (TI), Daniel (coleta), Silvia e Adriana (limpeza e lavagem) e a todos amigos do LIM56 que contribuiram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

E a todos os outros amigos do LIM-56 que contribuíram direta e indiretamente com este trabalho.

Às médicas Juliana Zimbres, Marcelle Nogueira, Camila Gavioli pela ajuda na seleção dos pacientes. À Professora Dra. Valéria Aoki pela ajuda e direcionamento dos pacientes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

Aos pacientes com Líquen plano que tornaram possível este estudo.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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. Divisão 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. 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação: 2011.

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 Fíguras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO 2

1.1 Importância PAMPs e DAMPs como ligantes dos TLRs no LP **4**

1.2 Células NK no LP.....**8**

1.3 Células TCD8+ no LP.....**10**

2 OBJETIVOS 13

3 MÉTODOS.....15

3.1 Casuística.....**15**

3.2 Obtenção de células mononucleares (CMNs) de sangue periférico.....**15**

3.2.1 Análise de células T CD8 citotóxicas e subpopulações efetoras/memória por citometria multiparamétrica.....**16**

3.2.2 Análise da via de sinalização de receptores Toll-like em células TCD8+ estimuladas com S100A8.....**17**

3.2.3 Análise da expressão de NLRP-1, NLRP3, AIM-2, CASP-1 e IL-1-β em células TCD8+ por PCR em tempo real.....**18**

3.2.4 Análise do perfil funcional das células NK por citometria multiparamétrica.....**19**

3.3 Obtenção de biopsias de pele.....**19**

3.3.1 Análise da expressão de S100A8, S100A9, HMGB-1, TLR-4 e RAGE por reação em PCR em tempo real.....**20**

3.3.2 Expressão de S100A8, HMGB-1, TLR-4 e RAGE por imunoistoquímica.....**21**

3.4 Determinação sérica de S100A8/A9, MICA, MICB e HMGB-1 por ensaio imunoenzimatico.....**22**

3.5 Análise estatística.....**23**

4 RESULTADOS..... 25

4.1 Resultados referentes ao perfil de ativação das célula NK e TCD8+ e a influência da proteína S100A8 no LP.....**25**

4.2 Resultados referentes à análise de subpopulações de linfócitos TCD8+, inflamassoma, receptores de ativação/inibição de células NK, ligantes solúveis e receptor TLR-4.....**37**

4.3 Características demográficas dos pacientes com Líquen plano.....**38**

4.5 Efeito do S100A8 e LPS em subpopulações de células T CD8+ em pacientes com LP.....**39**

4.6 Expressão de inflamassoma em células TCD8+ S100A8 ativadas em indivíduos com LP.....**47**

4.7 Efeitos do S100A8 em subpopulações de células NK de pacientes com LP.....**49**

4.8 Análise da expressão de mRNA de TLR4 em lesões de pele em indivíduos com LP **53**

4.9 Análise da expressão de mRNA de RAGE em lesões de pele em indivíduos com LP **55**

4.1.1 Expressão do DAMP HMGB-1 nas lesões cutâneas de LP e níveis séricos.....**57**

5 DISCUSSÃO.....61

6 CONCLUSÂO.....71

7 ANEXOS 73

8 REFERÊNCIAS 96

LISTA DE ABREVIATURAS

LP	Líquen plano
TLRs	Receptores tipo Toll
mDCs	Células dendríticas mielóides
pDCs	Células dendríticas plasmocitóides
CMNs	Células mononucleares
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
IFN	Interferon
LPS	Lipolissacarídeo
T reg	Células T reguladoras
LPO	Líquen plano oral
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
DAMPs	Padrões moleculares associados à perigo
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CXCL	ligante quimiocina (motivo C-X-C)
CCL	ligante quimiocina C-C
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
TCR	Receptores de células T
DCs	Células dendríticas
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
PMA	Acetato miristrato de forbol
CCR	receptor de quimiocinas
NK	célula *Natural killer*
APC	Célula apresentadora de antígenos
HLA	Antígeno leucocitário humano
HC-FMUSP	Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CAPPesq	Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa
FMO	Fluorescência menos um
FSC	Disperção frontal
SSC	Disperção lateral
CMV	Citomegalovírus
VHA	Vírus da Hepatite A
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VEB	Vírus Epstein-Baar
HSV	Herpes simples vírus
MFI	Intensidade Média de Fluorescência
TCM	Células T de memória Central
TEM	Células T de memória Efetora
TEMRA	Células T de memória Efetora RA
NFκB	Fator Nuclear Kappa B
HHV	Vírus da herpes humano

HERVs	Retrovírus endógeno humano
HMGB1	proteína de alta mobilidade box 1
DA	Dermatite atópica
APCs	Células apresentadoras de antígeno
CD	*Cluster of Differentiation*
CD4	Células T CD4 auxiliador
CD8	Células T CD8 citotóxico
NK	Células Natural Killer
$CD56^{bright}$	Subpopulação de células NK reguladora
$CD56^{dim}$	Subpopulação de células NK citotóxica
CD107a	Cluster de diferenciação 107a (Marcador de desgranulação)
CMN	Células Mononucleares
CTL	Controle saudavel
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IFNα	Interferon alpha
IFNβ	Interferon beta
IFNγ	Interferon gamma
KIR	Receptor de células NK tipo imunoglobulina
LAP	Proteína associada a latência
LFA-1	Antígeno associado a função linfocitária
NKG2C	receptor natural killer grupo 2, membro C
NKG2D	receptor natural killer grupo 2, membro D
NKG2A	receptor natural killer grupo 2, membro A
RAGE	receptor para produtos finais de glicação avançados
TLR	Receptores tipo Toll
Mcl-1	marcador de células mieloide -1
VCAM	Proteína de adesão cellular vascular
ITIMs	Imunoreceptor inibidor baseado em motivos de tirosina
MICA	(cadeia *MHC de classe I –relacionado a genes A*)
MICB	(cadeia *MHC de classe I –relacionado a genes B*)
sMICA	MICA Solúvel
sMICB	MICB Solúvel

LISTA DE SÍMBOLOS

±	Mais ou menos
%	Por Cento
µg	Micrograma
µL	Microlitro
≤	Menor ou igual a
<	Menor que
>	Maior que
ºC	Graus Celsius
mL	Mililitro
n	Tamanho da amostra
+	Positivo
-	Negativo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do processo patológico na pele de indivíduos com LP.....**4**
Figura 2. Estratégia para análise do perfil fenotípico de células TCD8+ ou suas subpopulações efetoras/memória no sangue periférico.....**39**
Figura 3: Frequência de subpopulações de células T CD8+ em etapas de diferenciação.....**40**
Figura 4. Frequência de expressão de CD107a em subpopulações de células TCD8+ induzida por ligantes de TLR4 e PMA/iono.....**42**
Figura 5. Frequência de expressão de TNF em subpopulações de células TCD8+ induzida por ligantes de TLR4 e PMA/iono.....**43**
Figura 6. Frequência de expressão de IL-1β em subpopulações de células TCD8+ induzida por ligantes de TLR4 e PMA/iono.....**45**
Figura 7: Expressão de TLR4 em células TCD8+ ou em subpopulações efetora/memória estimuladas.....**47**
Figura 8. Expressão de NLRP1, NLRP3, NLRP4, AIM-2, Caspase 1 e IL-1β em células TCD8+ estimuladas com S100A8 em pacientes LP.....**48**
Figura 9: Estratégia de análise das células NK no sangue periférico.....**50**
Figura 10: Expressão de marcadores de ativação e inibição em células NK estimuladas.....**51**
Figura 11: Níveis circulantes de MICB em pacientes LP.....**52**
Figura 12: Aumento da expressão de TLR-4 na derme de lesões cutâneas de pacientes com LP.....**54**
Figura 13: Aumento da expressão de RAGE na derme de lesões cutâneas de pacientes com LP.....**56**
Figura 14: Aumento da expressão de HMGB-1 na derme de lesões cutâneas de pacientes com LP.....**58**
Figura 15: Níveis circulantes do DAMP HMGB-1 em indivíduos com LP.....**59**
Figura 16: Representação esquemática do perfil inflamatório mediado por DAMPs, receptores proinflamatórios e células TCD8+ e NK no LP.....**68**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela demográfica dos indivíduos incluídos no estudo **38**

Tabela 2. Sorologia para vírus dos indivíduos com LP **92**

Tabela 3. Dados clínicos dos indivíduos com LP..... **93**

Tabela 4. Dados Laboratoriais dos indivíduos com LP.....**94**

Resumo

De Carvalho GC. *Análise do perfil fenotípico e funcional das células Natural Killer e linfócitos TCD8+ no Líquen plano.* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016. 105p.

INTRODUÇÃO: Líquen plano (LP) é uma doença mucocutânea de natureza inflamatória crônica de etiologia ainda desconhecida. Alterações na resposta imune inata, como aos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) podem levar à inflamação crônica e contribuir com a patogênese do LP. **OBJETIVO:** Avaliar o efeito da ativação via o DAMP S100A8 e o receptor Toll-like 4 (TLR-4) em células Natural killer (NK) e TCD8 citotóxicas e suas subpopulações de memória/efetoras em pacientes com LP. **MÉTODOS:** Foram selecionados 25 pacientes com LP (22 mulheres, 3 homens) com idade média de 43,46 anos ± 8,46 e um grupo controle com 25 indivíduos (22 mulheres, 3 homens) com idade média de 42 anos ± 5,5. A determinação transcricional e da expressão por imunohistoquimica dos DAMPs S100A8, HMGB-1 e de TLR-4 e RAGE foi realizada em biópsias de lesões cutâneas de indivíduos com LP, e os níveis séricos de S100A8, HMGB-1, MICA e MICB foram determinados por ELISA. As células mononucleares (CMNs) de sangue periférico foram avaliadas por citometria de fluxo quanto a frequência de TNF, IL-1β e o marcador de desgranulação CD107a em células TCD8+ e células NK CD56+ e suas subpopulações. A avaliação da via de sinalização de TLR em células TCD8+ purificadas e ativadas com S100A8 foi analisada por PCR array e a determinação da expressão de mRNA dos componentes do inflamassoma em células TCD8+ ativadas com S100A8 por PCR em tempo real. **RESULTADOS:** Foi evidenciado nos indivíduos com LP elevada expressão da proteína S100A8 nas lesões cutâneas e de HMGB-1, TLR-4 e RAGE na derme, em paralelo ao aumento da expressão de mRNAs para S100A8 e S100A9 e diminuição de RAGE. Além disto, uma elevação dos níveis séricos do dímero S100A8/A9 foi detectada nos pacientes comparados aos controles, ao contrário do DAMP HMGB-1 que mostrou níveis similares em ambos os grupos. A influência do S100A8 em células TCD8+ e células NK, foi analisada em CMNs pela ativação com o lipopolissacáride e a proteína recombinante S100A8, ambos ligantes de TLR-4. Nos indivíduos com LP foi detectado aumento da resposta citotóxica de linfócitos TCD8+ e células NK $CD56^{bright}$ pela expressão do marcador de desgranulação CD107a por citometria de fluxo. A proteína S100A8 foi capaz de induzir a expressão de genes pró-inflamatórios como IL-1β, TNF e IL-6 em células TCD8+ de pacientes com LP em contraste com os indivíduos saudáveis que mostraram expressão IL-10 e IFN tipo I. As células TCD8+ de indivíduos com LP ativadas ou não com S100A8 expressam transcritos de NLRP1, NLRP3 e AIM-2 e produzem IL-1β em níveis similares a controles saudáveis. Além disso, células TCD8+ ativadas com S100A8 mostraram aumento de expressão TLR3, TLR5, TLR7 e TLR8 na doença comparada às biopsias de controles. O aumento da resposta TCD8+ citotóxica foi principalmente mediado pelo subtipo de memória efetora (TEM, CCR7- CD45RA-). Elevação basal da expressão do receptor ativador NKG2D e inibidor NKG2A foi observado em células NK $CD56^{dim}$ nos indivíduos com LP e um nível similar do ligante solúvel MICB em ambos os grupos. **CONCLUSÃO**: Estes resultados evidenciam que componentes da imunidade inata, como a proteína S100A8 pode contribuir na manutenção do perfil inflamatório do LP.

Descritores: líquen plano; peptídeos catiônicos antimicrobianos; linfócitos T CD8-positivos; células matadoras induzidas por citocinas; citotoxicidade imunológica.

Abstract

De Carvalho GC. *Analysis of phenotypic and functional profile of Natural Killer cells and CD8 + T lymphocytes in Lichen planus.* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016. 105p.

BACKGROUND: Lichen planus (LP) is a mucocutaneous inflammatory chronic disease of unknown etiology. Alterations in the innate immune response such as the pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) and damage-associated molecular pattern (DAMPs) can lead to chronic inflammation and contribute to the pathogenesis of LP. **OBJECTIVE:** Evaluate the effect of the activation trough the DAMP S100A8 and the Toll-like receptor 4 (TLR-4) on the Natural killer cells (NK) and cytotoxic TCD8 cells and their memory / effector subsets in LP disease. **METHODS:** We selected 25 patients with LP (22 women, 3 men) with a mean age of 43.46 years ± 8.46 and a control group of 25 subjects (22 women, 3 men) with a mean age of 42 ± 5, 5. The transcriptional determination and protein expression by immunohistochemistry of DAMPs, S100A8 and HMGB-1 as well as TLR-4 and RAGE was performed on biopsies of skin lesions from patients with LP, and serum levels of S100A8, HMGB-1, MICA and MICB were determined by ELISA. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were assessed by flow cytometry to evaluate the frequency of TNF, IL-1β and the degranulation marker CD107a in CD8+ T cells and CD56 + NK cells and their subsets. The evaluation of the TLR signaling pathway in purified CD8 + T cells activated with S100A8 were analyzed by PCR array and the determination of mRNA expression of inflammasome components on CD8 + T cells activated by S100A8 was measured by real time PCR. **RESULTS:** It was shown in the LP individuals an increased expression of the S100A8 protein in the cutaneous lesions and HMGB-1, TLR-4 and RAGE in the dermis, in parallel to increased level of mRNAs for S100A8 and S100A9 and decreased expression of RAGE. Moerover, increased serum levels of the dimer S100A8 / A9 was detected in patients compared to controls, in contrast to DAMP HMGB1 that revealed similar levels in both groups. The influence of S100A8 in CD8 + T cells and NK cells, was analyzed in PBMC activating with lipopolysaccharide and recombinant protein S100A8, both ligands of TLR-4. It was detected in LP individuals, an increased cytotoxic response of CD8+ T lymphocytes and $CD56^{bright}$ NK cells trough CD107a degranulation marker expression. The S100A8 protein was able to induce the pro-inflammatory genes expressions such as IL-1β, TNF and IL-6 in CD8 + T cells of LP patients in contrast to healthy subjects who promoted IL-10 expression and type I IFN. CD8 + T cells of LP individuals activated or not with S100A8 are able to express NLRP1, NLRP3 and AIM-2 and IL-1β production at similar levels to healthy controls. Moreover, CD8 + T cells activated with S100A8 showed increased expression of TLR3, TLR5, TLR7 and TLR8 in LP compared to biopsies from healthy controls. The increased CD8 + T cells cytotoxic response was mediated by the subtype of effector memory (TEM CD45RA- CCR7). The increased baseline expression of activating receptor NKG2D and the inhibitory NKG2A in the NK $CD56^{dim}$ cells in LP individulas, and the similar level of MICB soluble in both groups. **CONCLUSION:** These results shows that innate immunity components, such as S100A8 protein may contribute to the maintenance of LP inflammatory profile.

Descriptors: lichen planus; antimicrobial cationic peptides; CD8-positive T-lymphocytes; killer cells, natural; cytotoxicity, immunologic.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O Líquen plano (LP) é uma doença inflamatória mucocutânea crônica de etiologia desconhecida. A apresentação clínica da doença varia dependendo da área envolvida, sendo a pele e a mucosa oral as áreas de acometimento mais frequente (1); (2). A doença pode ainda se manifestar sob diversas formas atingindo unhas (1), genitália e couro cabeludo (3).

O LP cutâneo é caracterizado pela presença de lesões com a superfície achatada, pápulas poligonais; violáceas; em 80% dos casos pode ser intensamente pruriginosa (4). As lesões podem se apresentar como uma rede de linhas brancas conhecidas como estrias de *Wickham* (5) e resultar em extensa hiperpigmentação residual podendo causar constrangimento ao paciente (2);(6). A classificação de variantes clinicas baseia na peculiaridade da morfologia e distribuição topográfica das lesões podendo apresentar sob a forma hipertrófica, bolhosa, linear entre outras (7).

A prevalência do LP em sua forma cutânea é estimada em <1% da população, enquanto a forma oral afeta cerca de 1-2% (8); (9). O LP pode se manifestar somente na forma cutânea ou em associação com a mucosa, no entanto entre 30-70% dos casos são observados o acometimento de mucosa em pacientes com LP cutâneo (10); (11). A média da faixa etária de acometimento é entre 40 e 45 anos para a forma cutânea, e o tempo de duração da doença pode variar de um mês a sete anos, sendo o diagnóstico clínico confirmado por biópsia da pele (6); (4). O LP é em geral mais frequente em mulheres de meia idade na proporção de 3:2 em relação aos homens (12);(13), sendo incomum em crianças, que correspondem menos de 5% dos casos (13). Não existem relatos quanto a etnias predominantes no LP, no entanto, um estudo em uma população de crianças nos Estados Unidos mostrou maior incidência desta enfermidade em afro-americanos (13).

Nos achados histológicos das lesões de indivíduos com LP é encontrado espessamento da camada córnea, acentuação da camada de células granulares, infiltrado de células inflamatórias e degeneração da camada basal de queratinócitos. A apoptose de queratinócitos é atribuída à presença de linfócitos TCD8 citotóxicos como principal componente do infiltrado, que são recrutados para a junção derme-epiderme com alta expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e induzem a apoptose dos queratinócitos basais (14); (15); (16). No LP cutâneo as células Natural killer (NK) também estão presentes nos sítios inflamatórios, sendo responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias (17). Nas lesões do LP cutâneo e oral, há aumento da expressão de TNF-α, IL-1, IL-6 e IL-8 e de moléculas apoptóticas como Fas/Apo-1 e Bcl-2 (18). Um estudo recente mostra que o potencial de malignização no Liquen plano oral (LPO) pode estar correlacionado com o aumento da expressão do marcador de células mieloide -1 (Mcl-1) (19).

Apesar da etiopatogenia do LP não estar definida, acredita-se que a doença possa ser desencadeada por mudanças antigênicas no local onde se encontram os queratinócitos basais, que passam a expressar um peptídeo próprio, exposto sob estímulo de drogas ou trauma (20). No entanto, diversos fatores como doenças autoimunes (21), infecções virais, como o vírus humano do herpes tipo 7 ou vírus da hepatite C (5); (12); (22) , retrovírus endógeno (23), medicações (21); (24), vacinações (25) e materiais de restauração dentária (26) têm sido associados à patogênese do LP. Contudo, sinais de danos celular (*danger-associated molecular patterns*, DAMPs) assim como padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* PAMPs) podem ser os principais fatores que aumentam a resposta citotóxica de linfócitos T, resultando na destruição dos queratinócitos nas lesões de indivíduos com LP (27).

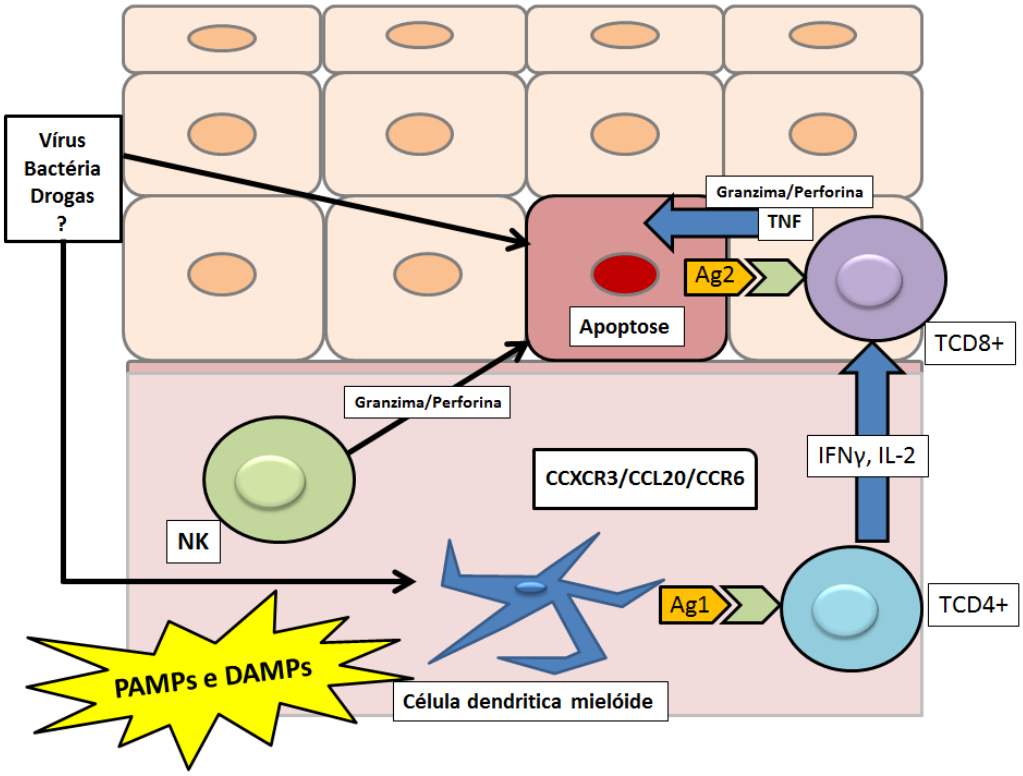


Figura 1. Representação do processo patológico na pele de indivíduos com LP. Um possível agente desencadeador favorece o processamento a apresentação de antígenos por células dendríticas mielóides ou queratinócitos e induz células TCD4+ direcionar a resposta para o eixo TH1, enquanto os linfócitos TCD8+ e células NK realizam a resposta citotóxica. O processo inflamatório e a produção de quimiocinas também podem ser amplificados devido à presença de PAMPs e DAMPs locais. (28, modificado).

Em geral as abordagens no LP sobre as células da resposta imune inata como as células NK e células dendríticas, bem como das células que participam da resposta imune adaptativa, TCD4+ e TCD8 se atém à pesquisa nas lesões de pele. São escassos os trabalhos que relatam a participação dessas células em sítio extracelular, como as células mononucleares do sangue periférico (CMNs) no LP.

1.1 Importância PAMPs e DAMPs como ligantes dos TLRs no LP

Em geral nas lesões dermatológicas são encontrados PAMPs como o lipopolissácaride (LPS) proveniente de bactérias gram negativas pela quebra da barreira

cutânea, assim como DAMPs devido aos danos celulares existentes. Esses padrões atuam como agonistas que ativam células via os receptores *Toll-like* (TLR) e culminam na produção de citocinas pró-inflamatórias. Foram descritos 10 receptores funcionais em humanos, destes seis localizados na membrana celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10) e outros quatro em compartimentos intracelulares como os retículos endoplasmáticos e endossomos (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9). Eles são capazes de reconhecer diversos tipos de moléculas, desde lipoproteínas de origem bacteriana (TLRs 1,2,6), lipopolissácaride (TLR4) e flagelina (TLR5), até RNA e DNA virais (TLRs 3,7,8 e 9). Diversos tipos celulares expressam esses receptores, como células dendríticas, macrófagos, linfócitos T e células não linfóides como queratinócitos e fibroblastos, porém, a sua atuação dependerá do tipo celular e do tecido onde estão expressos. Ainda que a inflamação gerada via ativação pelos TLRs seja protetora em muitos casos, a constante estimulação pode gerar necrose e liberar fatores endógenos que podem cronificar o processo inflamatório (29); (30).

Na pele, as alterações na expressão de TLRs, como a diminuição da expressão de TLR1 e TLR2 foram evidenciadas em lesões cutâneas de LP (31) e aumento da expressão dos TLR4 e TLR9 em lesões na mucosa oral de LPO (32). No sangue periférico, foi demonstrado aumento da expressão de TLR2 em monócitos de pacientes com LPO (33). Em um trabalho recente do nosso grupo, foi evidenciado que a estimulação com ligantes de TLRs extracelulares (TLR2, TLR4 e TLR5) induz uma produção elevada de TNF nos pacientes de LP cutâneo, com uma importante redução dessa citocina quando estimulados via TLRs intracelulares (TLR3, TLR7 e TLR9) em comparação aos controles (34). Contudo, a estimulação via TLR7/TLR8 foi capaz de restaurar a produção de TNF, sugerindo que a via TLR8 é funcional no LP.

Dentre os fatores endógenos liberados em processos inflamatórios existem os DAMPs, como S100A8 (MRP8) e S100A9 (MRP14). O complexo S100A8/A9 (Calprotectina) é liberado durante a ativação de fagócitos e atua via receptor TLR4, possibilitando a ativação de NFκB e produção de TNF-α assim como outras citocinas (35); (36). A calprotectina também é considerada um fator antimicrobiano e seus níveis podem se elevar durante exposição a mínimas quantidades de LPS. Além disto, o aumento de S100A8/A9 no soro possui uma relação inversa com a sobrevivência de pacientes com sepse (37).

A associação da proteína S100A8 com o S100A9 e sua elevação tem sido mostrada em doenças inflamatórias, câncer (38); (40), doenças autoimunes como diabetes do tipo I, fibrose cística, atrite reumatóide, como também em doenças dermatológicas como psoríase (40); (41) onde são encontrados altos níveis de S100A8/A9 solúveis (42); (43).

Na psoríase o complexo S100A8/A9 produzido pelos queratinócitos induzem a produção de citocinas proinflamatórias como IL-6, IL-8 e TNF-α e proangiogências que ativam genes relacionados com fatores de crescimento (44) Assim, a excessiva produção deste complexo atua na manutenção de ambiente inflamatório e contribui para migração de células nas lesões. O ambiente inflamatório presente nas lesões de pele no LP, psoríase e dermatite atópica pode favorecer a migração de células TCD8+ assim como células NK (46).

O S100A8 e sua ação como proteína ligante de cálcio pode atuar como um segundo mensageiro após a ativação por LPS e induzir a ativação do inflamassoma pelo receptor NOD-like. Além disso, o complexo S100A8/A9 é capaz de induzir NFκB, e a proteína NLR que contém o domínio pirina 3 (NLR3) a ativar pro- IL-1β em células mononuleares (CMNs) (46). Desta forma, o efeito de DAMP S100A8 também pode contribuir para perpetuação inflamatória no LP.

A proteína HMGB1 (*high mobility group box 1*) é uma proteína nuclear presente na maioria das células eucarióticas, que tem como função atuar na estabilização da

formação do nucleossomo e na regulação de diversos genes. A proteína HMGB-1 também é considerada um DAMP e é secretada por macrófagos ativados, células dendríticas maduras, células NK e queratinócitos em resposta a danos celulares, infecções e estímulos inflamatórios (47); (48); (49); (50).

O HMGB-1 quando secretado para o meio extracelular pode interagir com três receptores: receptor para produtos finais de glicação avançados (RAGE), TLR2 e TLR4. A ligação da proteína HMGB-1 ao receptor RAGE conduz a ativação de MAPK, NF-kB induzindo a produção de citocinas inflamatórias TNF, IL-1, IL-6, IL-8 e MIP-1 (51).

A constante ativação de padrões como PAMPs (LPS) e DAMPs S100A8 e o HMGB-1 em especial ao TLR4 pode contribuir para a ação inflamatória e migração/ativação das células do sistema imune inato (NK) e adaptativo (TCD8+) no LP.

1.2 Células NK no LP

As células NK representam um subconjunto de linfócitos participantes do sistema imune inato que atuam na defesa contra diversos patógenos e na rejeição de tumores (52); (53). As células NK humanas compreendem aproximadamente 15% de todos os linfócitos e são definidos fenotipicamente pela expressão de CD56 e a falta de expressão de CD3 (54). Além disso, duas populações distintas de células NK podem ser representadas com base na densidade da expressão de CD56 em sua superfície celular (55). As células NK $CD56^{dim}$ representam cerca de 90% das células NK circulantes, expressam altos níveis do receptor FcyRIII (CD16) possui uma potente atividade citotóxica e é facilmente recrutado para os sítios de inflamação (56). Já as células NK $CD56^{bright}$ são consideradas reguladoras devido o seu potencial para secretar citocinas como: IFN-γ e IFN-α, TNF-α e IL-10. Esse subtipo regulador mostra alta densidade de expressão de CCR7 e CD62L, característica que permite o tráfego entre os linfonodos, onde essas células são mais abundantes (57).

Os receptores das células NK podem ser encontrados nas formas inibidoras e ativadoras. Existem três subfamílias de receptores para este tipo celular descritos em humanos: os KIRs (*killer cell immunoglobulin-like receptor*) que reconhecem HLA-A, -B e C; a subfamília de lectina tipo-C, que incluem os receptores CD94 e NKG2 ou KLRs (*Killer Lectin-like Receptor*) que reconhecem HLA-E e os NCRs (*natural cytotoxicity receptors*) como o Nkp46 que se liga a antígenos virais (58).

Entre os receptores KIRs, existem os subtipos NKG2D, NKG2A e NKG2C. O NKG2D humano está acoplado ao adaptador DAP10 a PI3-K (PhosphoInositide 3-Kinase) e interage especificamente com moléculas induzidas por stress, como MICA e MICB (*MHC class I Chain- related genes A and B*) expressas frequentemente na

superfície de células tumorais e/ou infectadas por vírus (59). O NKG2D é normalmente expresso em células NK, células T γδ e células T CD8 e está relacionado com a resistência à infecção para alguns vírus (60). Estudos experimentais para resposta tumoral mostram que a molécula S100A8/A9 é capaz de promover a ativação de células NK via receptor RAGE e este processo ser mediado pelo NKG2D (61).

O CD94 é um receptor que forma heterodímeros com NKG2A, -B, -C ou -E (53). O domínio intracelular do NKG2A contém sequências conservadas de aminoácidos relacionadas com a transdução de sinais inibidores denominadas ITIMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs*). Desta forma, a ligação do receptor CD94/NKG2A às moléculas HLA-E inibe a capacidade lítica das células NK (62). O heterodímero CD94-NKG2C reconhece HLA-E com a mesma especificidade que o complexo CD94-NKG2A, no entanto, os sinais intracelulares do receptor NKG2C culminam na ativação das células NK (63).

As células NK podem ser encontradas em processos inflamatórios que ocorrem nas lesões de LP, psoríase e dermatite atópica (45). Nas biópsias de indivíduos com psoríase e dermatite de contato, foram descritas infiltrado exclusivo de células $CD56^{bright}$ $CD16^{-}$ na qual são recrutados para o sítio inflamatório através das quimiocinas CXCR3/CXCL10, CCR5/CCL5 e CCR6/CCL20 (receptor/ligante) (64). No LP cutâneo a infiltração de células $CD56^{bright}$ também estão presentes nos sítios inflamatórios (17). Além disso, essa subpopulação de célula NK na lesão é responsável pela produção de perforina e secreção IFN-γ e TNF-α e da expressão de NKG2D (17).

Poucos trabalhos evidenciam a participação destas células nas lesões de pele, além disso, no LP, não existem evidências de estudo sobre essas células no sangue periférico.

1.3 Células TCD8+ no LP

Embora a etiologia do LP ainda seja desconhecida, sabe-se também que os linfócitos T desempenham importante papel na patogenia da doença. Os linfócitos T CD4 juntamente com os linfócitos T CD8 são recrutados para a junção derme-epiderme causando intensa inflamação local (14).

Diversas alterações nos queratinócitos basais podem torná-los susceptíveis a respostas mediadas pelos linfócitos T CD8, que quando ativados secretam IL-2, IFN-gama e principalmente de TNF que se ligam nos receptores dos queratinócitos induzindo a apoptose (15). A maior parte destas células é encontrada em áreas lesionadas da membrana basal, próximo das áreas de destruição dos queratinócitos.

A expressão do marcador de desgranulação CD107a na superfície de células efetoras como NK e linfócitos TCD8+ é evidenciada pela atividade lítica em ensaios de citotoxicidade contra célula alvo marcada com cromo radioativo (^{51}Cr) (65). No LP constatou-se que linfócitos TCD8+ encontrados nas lesões da doença são citotóxicos, já os clones de linfócitos TCD8+ derivados de regiões adjacentes são menos citotóxicos contra os queratinócitos de regiões lesionadas autólogas, ou seja, menos autorreativos que os linfócitos provenientes das lesões (66). A autorreatividade de linfócitos T CD8+ e o desenvolvimento de autoimunidade sistêmica em modelos experimentais mostrou estar relacionada com a presença de DAMPs que se ligam ao receptor TLR4, como as proteínas S100A8 e S100A9 conduzindo ao aumento da expressão de IL-17 (67).

Além da ação citotóxica para efetividade da resposta imune, a geração de células de memória imunológica é essencial para conferir proteção imediata nos tecidos periféricos inflamados. As células T efetoras de memória CCR7- migram para os tecidos periféricos na inflamação e atuam na resposta efetora imediata, enquanto as células T de

memória central CCR7+ dirigem-se para as áreas de células T nos órgãos linfoides secundários, capazes de estimular eficientemente as células dendríticas. As células T CCR7+ podem ainda se diferenciar em células CCR7- após um segundo estímulo e retornar com sua ação efetora imediata (68). O receptor CCR7 que auxilia no regresso das células para os tecidos linfóides é utilizado para classificar fenótipos de linfócitos T CD8+ como naive CCR7+, CD45RA+, de memória central (TCM) CCR7+, CD45RA-, memória efetora (TEM) CCR7- CD45RA- e memória efetora terminalmente diferenciada (TEMRA) CCR7-, CD45RA+ (69).

Contudo, avaliações extra-cutâneas são mais escassas e podem contribuir no entendimento da patogênese da doença. As células NK e TCD8+ circulantes e suas subpopulações em indivíduos com LP podem expressar distintos perfis fenotípicos e funcionais em relação a controles saudáveis em resposta aos agonistas que medeiam respostas pró-inflamatórias como DAMPs e PAMPs.

2. Objetivos

2. Objetivo Geral

Avaliar o perfil fenotípico e funcional de células da resposta imune inata pelas células *Natural Killer* e da resposta adaptativa pela célula T CD8+ nos pacientes com Líquen plano.

Objetivos secundários:

- Determinação da expressão transcricional e protéica do DAMP S100A8 e o receptor Toll-like -4 em biópsias cutâneas de indivíduos com LP e dos níveis séricos de S100A8.
- Percentual de TNF, IL-1β e do marcador de desgranulação CD107a em células TCD8 e células NK CD56+ do sangue periférico.
- A via de sinalização de TLRs em células TCD8+ ativadas com S100A8.
- Expressão de mRNA dos componentes do inflamassoma NLRP1, NLRP3, NLRP4, AIM-2, Caspase 1 e IL-1β em células TCD8+ ativadas por S100A8.
- Percentual de subpopulações de células TCD8+ efetoras e de memória quanto a produção de TNF, IL-1β e da resposta citotóxica induzida por agonistas de TLR4.
- Expressão de marcadores de ativação/inibição em subpopulações de células NK induzidas por S100A8 e LPS.
- Determinação dos níveis séricos de MICA e MICB.
- Determinação da expressão transcricional e protéica do DAMP HMGB-1 e dos receptores Toll-like -4 e RAGE em biópsias cutâneas de indivíduos com LP e dos níveis séricos de HMGB-1.

3. Métodos

3.1 Casuística

Os pacientes com Líquen plano (n=25), de ambos os sexos, foram selecionados no Ambulatório do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Os pacientes com LP cutâneo apresentavam lesões de pele com diagnóstico confirmado por biópsia. A associação com melanoma e/ou outras doenças autoimunes, assim como o uso de medicação imunossupressora ou LP pilar constituíram critérios de exclusão. Todos os pacientes apresentaram resultados negativos para o fator anti-nuclear e HIV. Os pacientes não tinham sido tratados com qualquer tipo de corticóide tópico ou sistêmico, retinóides ou imunossupressores nos últimos 30 dias antes da biópsia de pele e coleta de sangue.

O grupo controle foi composto por indivíduos sadios (n=25), de ambos os sexos que não apresentaram história de doença dermatológica e com idade acima de 18 anos. Os pacientes e os indivíduos controles saudáveis foram submetidos ao termo de consentimento e livre esclarecido para posterior inclusão no estudo. Todos foram informados do conteúdo da pesquisa, assinando um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo ($n^0$8802) (Anexo1).

3.2 Obtenção de células mononucleares (CMNs) de sangue periférico

Foram coletados 50 mL de sangue periférico em tubo heparinizado, diluídos, volume a volume, em solução fisiológica e centrifugado em solução gradiente de Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, EUA) por 20 minutos a 550g para obtenção de

CMNs. Após duas lavagens em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen, EUA) suplementado com gentamicina (10µg/mL, Novafarma, SP, Brasil) por 10 minutos a 1200 rpm, as células obtidas foram quantificadas e a concentração definida de acordo com o experimento.

3.2.1 Análise de células T CD8 citotóxicas e subpopulações efetoras/memória por citometria multiparamétrica

Para analisar as células TCD8 e TCD4 efetoras, as CMNs foram estimuladas com agonistas de TLR4 (lipopolissacáride-LPS, 1µg/mL) ou MRP8 (S100A8, 1µg/mL) separadamente ou LPS (1µg/mL) por 30 minutos seguido por MRP8 (1µg/mL) por 6 horas. A Brefeldina A (10µg/ml) foi adicionada à cultura 1 hora após o início da cultura. Como controle positivo foi utilizado o acetato de miristato de forbol (PMA) 10ng/mL e Ionomicina 1µg/mL nas mesmas condições de cultivo. O anticorpo anti-CD107a PerCP-Cy5 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) foi adicionado no início do cultivo. Após o período de 6 horas as células foram retiradas da placa e marcadas com marcador de viabilidade LIVE/DEAD PE-Texas Red (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 30 minutos a 4ºC. Após isso, as células foram tratadas com CYTOFIX/CYTOPERM (BD Biosciences) e marcadas com: CD3 Qdot 605, CD4 Horizon V450, CD8 Horizon V500, TNF Pe-Cy7, IL-1-beta FITC, CD45RA-APC-H7, CCR7-Alexa-647 procedentes da BD Biosciences. As células foram lavadas e a aquisição de 200.000 células foi realizada com o citômetro de fluxo Fortessa (LSRFortessa, BD) e analisadas através do Software FlowJo (Tree Star – USA).

Todas as análises de citometria foram realizadas com prévia padronização determinada pelo FMO (*fluorescence minus one*). O principio desta padronização se

baseia na inclusão de todos os marcadores a serem lidos no citômetro de fluxo omitindo a presença de uma fluorescência. O procedimento favorece uma precisa determinação para análise de células marcadas, para melhor discriminar as populações positivas e as negativas.

3.2.2 Análise da via de sinalização de receptores Toll-like em células TCD8+ estimuladas com S100A8

Para analisar a ação direta da proteína S100A8, células TCD8 de indivíduos com Líquen plano (n=3) ou indivíduos saudáveis (n=3) foram isoladas a partir de CMNs utilizando o citômetro FACSAria III (BD Biosciences, San Jose, CA) do CEFAP, ICBIV-USP. As células TCD8+ foram cultivadas em microplacas de 96 poços (Costar, Cambridge, MA, USA) a 37°C em 5% CO2 e estimuladas com S100A8 (1 µg/ml ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., NZ, Israel) por 4 horas. Após esse período as células foram armazenadas em solução RNAlater (Sigma-Aldrich) a -20ºC para posterior extração do mRNA total. Foram avaliados 84 genes relacionados à via de sinalização dos TLRs utilizando o kit Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway PCR Array (Qiagen, Hilden, Germany). Para tanto, foi realizada a extração do mRNA das células TCD8+ utilizando o kit RNeasy Micro Kit Protocol (Qiagen, Hilden, Germany) e a transcrição reversa com o kit RT^2 PreAMP cDNA Synthesis (Qiagen). O cDNA equivalente foi aplicado em placas RT^2 Profiler PCR Array plate (Qiagen) e o material genético foi amplificado no aparelho ABI 7500 RT-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A análise dos dados foi realizada pelo software 7500 versão 2.0.6 (Applied Biosystems, USA) em conjunto com Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) para análise estatística. Os valores ΔΔCt foram

calculados através dos níveis de expressão dos genes normalizadores e em comparação com os controles. Para tanto, os grupos de indivíduos com Liquen plano ou saudáveis foram comparados considerando a intensidade de expressão de cada gene entre células TCD8+ estimuladas ou não com S100A8. O ponto de corte parta a intensidade de expressão ≥ duas vezes para a indução de genes ou ≤ duas vezes para a repressão do gene de cada foi utilizada para respectivamente comparar genes regulados positivamente ou negativamente em células TCD8+ ativadas em relação às células TCD8+ sem estímulo.

3.2.3 Análise da expressão de NLRP-1, NLRP3, AIM-2, CASP-1 e IL-1-β em células TCD8+ por PCR em tempo real

O RNA total das células TCD8+ sorteadas foi isolado utilizando-se o kit de extração RNAqueous Micro kit (Ambion). O cDNA foi preparado utilizando-se o kit SuperScript™ III (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade e qualidade do RNA foram avaliadas por espectrofotômetro (Nanodrop N-1000) e a expressão dos principais componentes do inflamassoma (NLRP1, NLRP3, AIM2, CASP1, IL1B) foi avaliada através de sondas TaqMan® específicas para plataforma ABI 7500 (Applied Biosystems). Os níveis de mRNA foram normalizados com os níveis de mRNA do gene endógeno beta actina, ACTB (Applied Biosystems). O número do ciclo em que a transcrição do gene de interesse é detectável (CT) foi normalizado com o número do ciclo de detecção do gene endógeno ACTB, referida como delta Ct (ΔCT). Os resultados de amplificação foram analizados utilizando o software Sequence Detection System (SDS) (Applied Biosystems). A expressão normalizada foi calculada conforme Livak et al. (2001).

3.2.4 Análise do perfil funcional das células NK por citometria multiparamétrica

Para analisar as células NK, as CMNs foram estimulados com agonistas de TLR4 (LPS, 1µg/mL) ou MRP8 (S100A8, 1µg/mL) separadamente ou LPS (1µg/mL) por 30 minutos iniciais seguido por MRP8 (1µg/mL) por 6 horas. A Brefeldina A (10µg/ml) foi adicionada à cultura após 1 hora do início da cultura. Como controle positivo foi utilizado PMA (10ng/mL) e Ionomicina (1µg/mL). O anticorpo anti-CD107a PerCP-Cy5 foi adicionado no início do cultivo. Após o período de 6 horas as células foram retiradas da placa e marcadas com marcador de viabilidade LIVE/DEAD PE-Texas Red (Invitrogen) a 4ºC por 30 minutos. Após isso, as células foram tratadas com CYTOFIX/CYTOPERM (BD Biosciences) e marcadas com os anticorpos para: CD3 Qdot 605(Invitrogen), CD19 Horizon V500, CD16 APC Cy7, CD56 Alexafluor 700, TNF PE Cy7, IFN-γ Horizon V450, IL1-beta FITC ou foi realizada a marcação fenotípica de células NK incluindo os marcadores, NKG2A PE, NKG2D PE Cy7 e NKG2C FITC, procedentes da BD Biosciences. As células foram lavadas e a aquisição de 200.000 células foi realizada com o citômetro de fluxo Fortessa (LSRFortessa, BD) e analisadas através do Software FlowJo (Tree Star – USA).

3.3 Obtenção de biopsias de pele

Foram obtidas biópsias de aproximadamente 6mm de diâmetro de peles lesionas de pacientes com LP ou de mesma região da pele de indivíduos saudáveis, coletadas após aplicação de anestesia local. As amostras foram armazenadas em solução RNA later (Sigma, CA, USA) a 20ºC para posterior análise de transcritos pelo método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR real time).

3.3.1 Análise da expressão de S100A8, S100A9, HMGB-1, TLR-4 e RAGE por reação em PCR em tempo real

A expressão de transcritos relacionados com a produção da proteína S100A8 Humana (MRP8) e S100A9 (MRP14), HMGB-1, TLR-4 e RAGE foi realizada por qPCR. As amostras de pele foram armazenadas em RNA later (Sigma) a 20ºC e processadas com o aparelho Tissue Ruptor (Qiagen Valencia, CA, USA). Após a remoção de fragmentos por centrifugação, os sobrenadantes foram utilizados para a extração de RNA. O RNA total foi extraído das biopsias utilizando o RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). A transcrição reversa foi realizada com o Reverse Transcriptase Kit (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). Os oligonucleotidios iniciadores (primers) foram sintetizados pela (Life Invitrogen, Carlsbad, CA, USA):

S100A8 (MRP8)

5’ – GGGATGACCTGAAGAAATTGCTA - 3’ forward

5’ - TGTTGATATCCAACTCTTTGAACCA- 3’ reverse

S100A9 (MRP14)

5’ - GTGCGAAAAGATCTGCAAAATTT- 3’ forward

5’ - GGTCCTCCATGATGTGTTCTATGA- 3’ reverse

HMGB-1

5´- CTCAGAGAGGTGGAAGACCATGT – 3´ forward

5´-GGGATGTAGGTTTTCATTTCTCTTTC – 3´ reverse

TLR-4

5’- CCTGATGACATTCCTTCT– 3´ forward

5’- AGCCACCAGATTCTCTAA– 3´ reverse

RAGE

5’- GAGGAGGAGCGTGCAGAACT – 3´ forward

5’ - CCTCAAGGCCCTCCAGTACTACT – 3´ reverse

GAPDH:

5’ - GAAGGTGAAGGTCGGAGT - 3’ forward

5’ - GAAGATGGTGATGGGATTTC - 3’ reverse

Para aplicação da PCR em tempo real foi utilizado o aparelho Applied Biosystems 7500 Fast system usando o método de amplificação por SYBRGreen (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Os primers para amplificação foram aceitos com suas eficiências de 100 ± 10%. A especificidade da reação foi examinada pela curva de dissociação. Os níveis de mRNA de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) das amostras foram analisados e normalizados com os níveis de mRNA das amostras de cada indivíduo testado. Foram utilizados ciclos de 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C. Os resultados de amplificação foram analizados utilizando o software Sequence Detection System (SDS) (Applied Biosystems). A expressão normalizada foi calculada conforme (70).

3.3.2 Expressão de S100A8, HMGB-1, TLR-4 e RAGE por imunoistoquímica

Foram realizados cortes histológicos de 4µm de espessura de biópsias de pele emblocadas em parafina em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co., St. Louis,

MO/USA, cód. A3648). Os cortes histológicos foram desparafinizados em banhos de xilol e posteriormente hidratados em concentrações decrescentes de etanol. O bloqueio com peroxidase endógena (H2O2) foi feito em câmara escura com três incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada. Logo foi realizada a exposição antigênica em calor úmido em pH 9.0 (Dako Cytomatation, Carpinteria, CA, USA). O bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido foi feito com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé) a 10%. As lâminas foram incubadas com anticorpo primário, coelho monoclonal anti-MRP8 anti-HMGB1, anti-RAGE ou anti-TLR4 (Abcam, Cambridge, MA) diluído em solução de albumina bovina (BSA) 1% em tampão PBS pH 7.4. Os sítios de ligação foram revelados com solução cromógena Permanet Red LSAB-AP para avaliar a marcação de S100A8 ou diaminobenzidina (DAB) para avaliar a marcação de TLR-4, HMGB-1 ou RAGE (Dako Cytomatation, Carpinteria, CA, USA). Os controles negativos das reações foram obtidos através da omissão do anticorpo primário, substituído por PBS pH 7.4. Após a montagem das lâminas com resina Permount (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA). As lâminas foram escaneadas no aparelho Aperio Scan-scope Cs (Aperio Technologies, Vista, CA) no aumento de 40X e analisadas no software Image-Pro Plus (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland). A avaliação na distribuição da proteína MRP8, HMGB-1, TLR-4 e RAGE ocorreram mediante a divisão de áreas marcadas pela área total da epiderme ou derme mensurada.

3.4 Determinação sérica de S100A8/A9, MICA, MICB e HMGB-1 por ensaio imunoenzimatico

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi utilizado para detecção da proteína S100A8/A9 (MRP8), MICA, MICB (Biolegend San Diego, CA) ou HMGB-1 (IBL Minneapolis,

MN). O soro de controles e indivíduos com LP não diluídos foram adicionados em uma placa pré-sensibilizada com anticorpo anti-S100A8/A9, MICA, MICB ou HMGB-1 por um período de 1 hora a 37^0C. A placa foi lavada e incubada com anticorpo de detecção anti-S100A8/A9, MICA ou MICB por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado estreptoavidina peroxidase por 30 minutos a 37^0C. O substrato foi utilizado para iniciar a reação, 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB). A leitura foi realizada no leitor de ELISA VersaMax (Molecular Devices CA.- US.) utilizando o comprimento de onda de 450nm.

3.5 Análise estatística

Os dados foram analisados com auxílio do *software* GraphPadPrism (Versão 5.0). Na comparação estatística entre os grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Todas as comparações que resultaram em $P \leq 0.05$ foram consideradas significativas. Os dados foram representados com a média e desvio padrão da média e ou intensidade média de fluorescência (MFI).

4. Resultados

4.1 Resultados referentes ao perfil de ativação das célula NK e TCD8+ e a influência da proteína S100A8 no LP

Artigo publicado na revista Acta Dermato-Venereologica em Dezembro de 2015.

Acta Derm Venereol 2015 Epub ahead of print

INVESTIGATIVE REPORT

Up-regulation of Proinflammatory Genes and Cytokines Induced by S100A8 in CD8$^+$ T Cells in Lichen Planus

Gabriel COSTA DE CARVALHO, Rosana DOMINGUES, Marcelle ALMEIDA DE SOUSA NOGUEIRA, Anna C. CALVIELLI CASTELO BRANCO, Kelly C. GOMES MANFRERE, Naiura VIEIRA PEREIRA, Valeria AOKI, Mirian NACAGAMI SOTTO, Alberto J. DA SILVA DUARTE and Maria NOTOMI SATO

Laboratory of Dermatology and Immunodeficiency (LIM-56), Department of Dermatology, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Lichen planus (LP) is a chronic inflammatory mucocutaneous disease. The inflammatory status of LP may be related to S100A8 (myeloid-related protein 8; MRP8) activation of cytotoxic cells. The aims of this study were to evaluate S100A8 expression in skin lesions and the *in vitro* effects of S100A8 on CD8$^+$ T cells and natural killer (NK) cells in LP. Increased levels of S100A8/S100A9 were detected in the skin lesions as well as in the sera of subjects with LP. S100A8 expression induced an increased cytotoxic response by peripheral blood CD8$^+$CD107a$^+$ T cells as well as by NK CD56^{bright} cells in patients with LP. Increased expression of interleukin (IL)-1β, tumour necrosis factor (TNF) and IL-6 in the CD8$^+$ T cells of patients with LP was induced by S100A8, in contrast to the control group that produced IL- 10 and interferon (IFN) type I genes. These data suggest that, in individuals with LP, S100A8 may exert distinct immunomodulatory and cytotoxicity functions. *Key words: lichen planus; S100A8; CD8+ T cells; natural killer cells; Toll-like receptor*.

Accepted Dec 2, 2015; Epub ahead of print Dec 3, 2015

Acta Derm Venereol 2016; XX: XX–XX.

Maria Notomi Sato, Laboratory of Dermatology, University of Sao Paulo School of Medicine, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 3o. Floor IMT II, Cerqueira César, São Paulo, CEP-05403-002, Brazil. E-mail: marisato@usp.br

Lichen planus (LP) is a chronic inflammatory skin disease that most frequently involves the skin and the oral mucosa (1, 2). Although the aetiopathogenesis of LP is unclear, several possible causes, including genetic predisposition and environmental triggers, can lead to a continuous inflammatory response. Viral infections, such as human herpes virus type 7 (3) or human hepatitis C virus (HCV), may also be associated with LP (4).

Endogenous danger signals (danger-associated molecular patterns [DAMPs] as well as exogenous pathogen-associated molecular patterns [PAMPs]) may activate cytotoxic T lymphocytes, causing the destruction of keratinocytes in the skin of patients with LP (5). The autoreactivity of CD8$^+$ T cells and the development of systemic autoimmunity in a mouse autoimmune model have been shown to be related to the local production of DAMPs, including the myeloid-related proteins S100A8 and S100A9, which bind to the Toll-like receptor TLR4 and lead to increased interleukin (IL)-17 expression (6). The elevated sera levels of S100A8 and S100A9 proteins are observed in numerous pathological conditions associated with inflammation in humans (e.g. rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, diffuse cutaneous systemic sclerosis, psoriasis and cancer (7–12)). We have observed previously that peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from individuals with LP are hyper-responsive to activation through the TLR2, TLR4 and TLR5 pathways, with increased secretion of tumour necrosis factor alpha (TNF-α) (13). Therefore, altered innate immunity could contribute to the inflammation and T-cell autoreactivity in LP.

Moreover, S100A8/A9 proteins induce the production of proinflammatory and pro-angiogenic cytokines, which attract immune cells to the psoriatic skin lesions (14). The inflammatory skin milieu can attract CD8$^+$ T cells as well as natural killer (NK) cells in LP, psoriasis and cutaneous lesions of atopic dermatitis (15). The NK cell CD56^{bright} subtype, which predominates in the inflammatory sites of LP lesions, is able to produce perforin, interferon (IFN)-γ and TNF-α (16). It is currently unknown whether altered serum levels of S100A8/A9 in LP can modulate the cytotoxic functions of NK cells or CD8$^+$ T cells.

This study investigated the levels of S100A8 in the skin lesions and sera of patients with LP as well as the immunomodulatory S100A8 on CD107a molecules, which are indicators of degranulation, and cytokine secretion by CD8$^+$ T cells and the NK CD56$^+$ cell subtype from peripheral blood. The findings demonstrate increased S100A8/A9 expression in the skin lesions and sera of patients with LP, which may positively regulate the cytotoxic responses of NK and CD8$^+$ T cells. Moreover, the effects of S100A8 on CD8$^+$ T cells in patients with LP involved the up-regulation of pro-inflammatory cytokine gene expression in association with altered TLR expression.

[1]http://www.medicaljournals.se/acta/content/?doi=10.2340/00015555-2306

© 2016 The Authors. doi: 10.2340/00015555-2306
Journal Compilation © 2016 Acta Dermato-Venereologica. ISSN 0001-5555

MATERIALS AND METHODS (see Appendix S1[1])

RESULTS

Expression of S100A8 in skin lesions of patients with lichen planus

The histology and expression of the S100A8 protein was evaluated in skin biopsies of LP ($n = 12$) and healthy controls (HC, $n = 12$). Compared with the epidermal and dermal layers of H&E-stained HC samples (Fig. 1a) LP samples showed increased epidermal cell layers with degeneration of basal cells and an intense cellular infiltration in the superficial dermis (Fig. 1b). S100A8 staining demonstrated intense protein expression in epidermal keratinocytes and diffuse labelling in the superficial dermis (Fig. 1d), contrasting the scarce S100A8 expression in HC samples (Fig. 1c). The combined results of all 12 samples show increased S100A8 protein expression in both the epidermis (Fig. 1e) and dermis (Fig. 1f) of subjects with LP compared with the skin of healthy individuals.

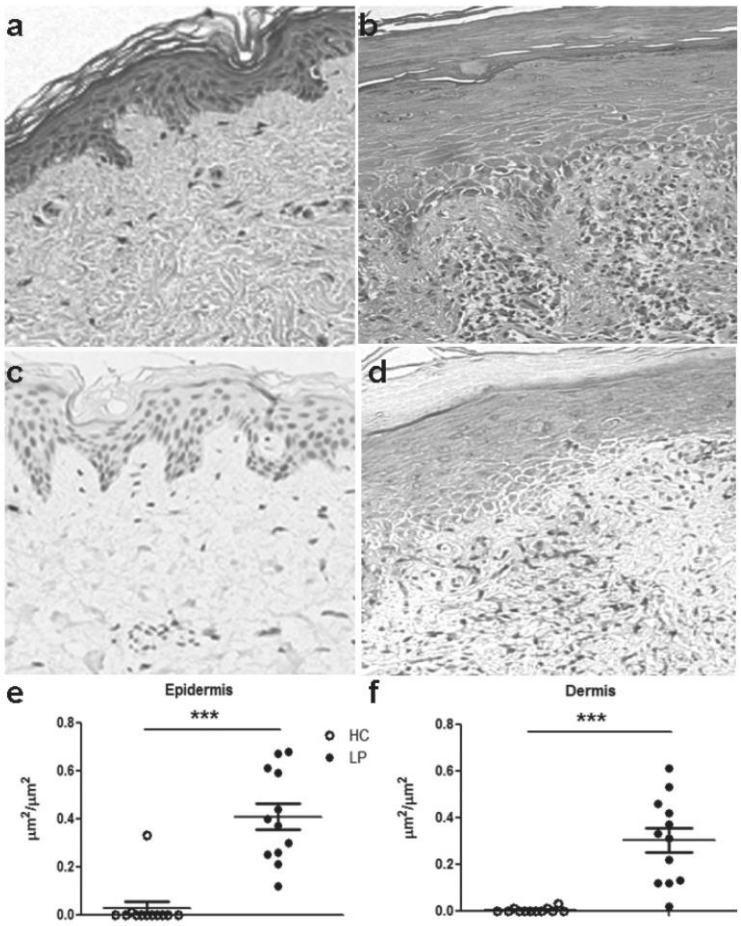


Fig. 1. Enhanced expression of S100A8 in the epidermis and dermis of skin lesions from patients with lichen planus (LP). Skin biopsies from (a, c) healthy subjects and lesions from (b, d) patients with LP were stained with haematoxylin and eosin; (a, b) 100× magnification. (c, d) S100A8 protein levels were measured using immunohistochemistry. The distribution of S100A8 in the (e) epidermal and (f) dermal layers of healthy control skin (HC, $n = 12$) or in the lesions of patients with LP ($n = 12$) was evaluated. Calculation of the S100A8-positive area in the dermis was performed by dividing the area positive for the S100A8 protein by the total area. The data are presented as means ± standard error of the mean (SEM). ***$p < 0.0001$.

Analysis of S100A8 mRNA expression in the skin and serum levels of patients with lichen planus

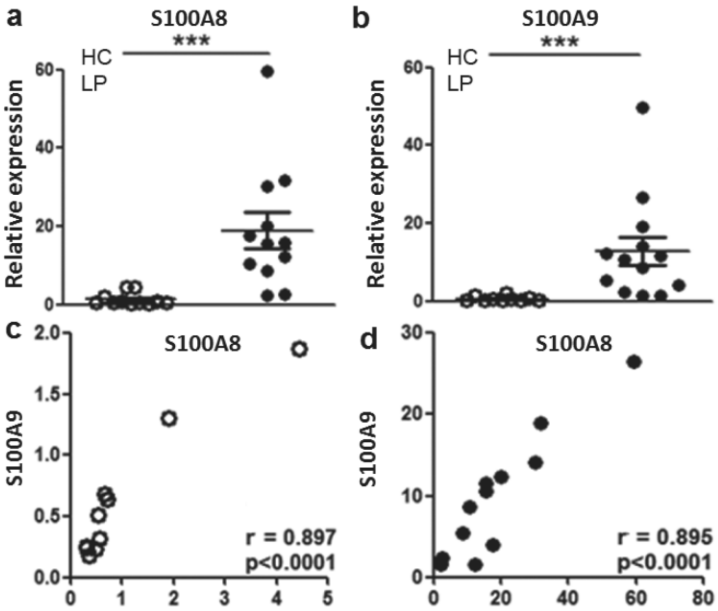
To further evaluate S100A8/S100A9 expression, we assessed S100A8 and S100A9 transcripts in skin lesions from subjects with LP and in HC skin using real-time quantitative qPCR. Higher S100A8 and S100A9 mRNA expression was detected in the LP skin samples compared with the HC samples (Fig. 2a, b). In addition, a highly positive correlation between S100A8 and S100A9 transcript levels was verified in the skin, suggesting that S100A8/S100A9 dimers may form (Fig. 2c, d).

Because we had verified that S100A8/S100A9 expression is up-regulated in the skin cells of subjects with LP, we next evaluated the circulating serum levels of this protein using ELISA. Fig. 2e shows that the levels of this protein were significantly increased in the sera of subjects with LP (median 1,766.1 ng/ml, range 602.2–4,911.4 ng/ml) compared with the control group (median 967.8 ng/ml, range 111.5–2,764 ng/ml).

In vitro effects of S100A8 on cytotoxic cells after stimulation via TLR4 in subjects with LP

The effects of S100A8 expression on the cytotoxic responses of $CD8^+$ T cells and NK cells were then evaluated using the degranulation marker CD107a after stimulating PBMCs; both S100A8 and lipopolysaccharide (LPS) are agonists of TLR4. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin were used to stimulate the cells. The gating strategy for $CD8^+$ T cells is shown in Fig. S1[1], and for NK cells in Fig. S2[1].

There was an increased baseline frequency of unstimulated $CD8^+$ $CD107a^+$ T cells in subjects with LP compared with HC (Fig. S3a[1]). Stimulation with LPS or S100A8 increased the frequency of $CD8^+CD107a^+$ T cells in subjects with LP compared with the HC group. However, simultaneous stimulation with LPS and S100A8 did not alter the frequency of $CD107^+CD8^+$ T cells (Fig. S3a[1]).



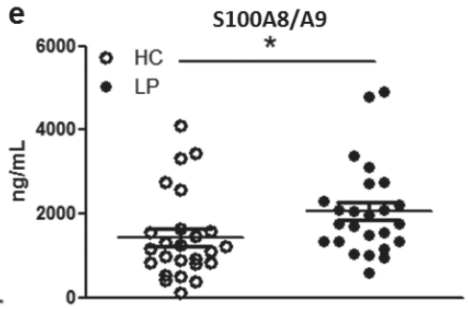


Fig. 2. Up-regulation of S100A8 and S100A9 expression in the skin and increased S100A8 and S100A9 levels in the sera of patients with lichen planus (LP). (a, b) Skin biopsies from healthy controls (HC, $n=12$) or lesions of patients with LP ($n=12$) were analysed for the expression of S100A8 and S100A9 mRNA using real-time PCR (relative to housekeeping gene). Correlation between S100A8 and S100A9 mRNA expression in the skin in (c) HC and (d) subjects with LP. (e) Levels of the S100A8/S100A9 dimer in the sera of LP ($n=25$) and HC ($n=21$) were evaluated using enzyme-linked immunoassay (ELISA). The data are presented as means ± standard error of the mean (SEM). ***$p<0.0001$, *$p\leq0.05$.

In addition, an increased baseline frequency of TNF$^+$CD8$^+$ T cells was found in subjects with LP compared with HC (Fig. S3b[1]). Moreover, IL-1β secretion by CD8$^+$ T cells was elevated following simultaneous stimulation with LPS and S100A8 (Fig. S3c[1]). The synergistic effect of LPS and S100A8, which both act through TLR4, increased the pro-inflammatory response by CD8$^+$ T cells in subjects with LP.

We next evaluated CD107a, TNF and IL-1β expression in response to the TLR4 agonists LPS and S100A8, or to PMA and ionomycin, in CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells. The increased frequency of NK CD56^{bright}CD107a$^+$ cells following S100A8 stimulation was verified in LP compared with HC (Fig. S4a[1]). Conversely, NK CD56^{dim}TNF$^+$ cells from the LP group were more responsive to PMA and ionomycin stimulation than the HC group (Fig. S4b[1]). Only low levels of IL-1β in NKCD56^{dim} and NKCD56^{bright} cells were induced after stimulation, and these levels did not differ between the analysed groups (Fig. S4c[1]).

Profile of Toll-like receptor pathway gene expression in CD8$^+$ T cells from patients with lichen planus stimulated with S100A8

Given our observation that circulatory CD8$^+$ T cells exhibit distinct activation in patients with LP, CD8$^+$ T cells were sorted from PBMCs to evaluate the direct effects of S100A8 on genes related to innate immunity and the TLR signalling pathway. Table I shows the up-regulated and down-regulated TLR pathway gene expression after S100A8 stimulation in LP and HC.

Consistent with this, Fig. 3 shows up-regulation of the regulatory cytokine IL-10 and genes related to the type I IFN response, such as IFNB1 and TLR7, in CD8$^+$ T cells of HC and patients upon S100A8 stimulation. It is notable that subjects with LP did not up-regulate these regulatory cytokines upon S100A8 stimulation; instead, this group overexpressed inflammatory genes such as IL-1β, TNF and IL-6. Contrasting effects were also observed with TLR expression: although TLR5 and TLR8 expression in CD8$^+$ T cells was down-regulated upon S100A8 stimulation in the HC group, expression was up-regulated in the LP group, and the opposite effects were observed for TLR7 gene expression. Moreover, the data showed that although one of the S100A8 receptors could be TLR4, this DAMP is able to modulate the expression of other TLRs.

Table I. *Differentially regulated genes in the Toll-like receptor (TLR)-mediated signalling pathway of CD8$^+$ T cells after stimulation with S100A8 between the lichen planus (LP) and healthy control groups*

Lichen planus		Healthy controls	
Gene symbol	Fold regulation	Gene symbol	Fold regulation
IL1B	*4.8929*	IFNB1	*3.1207*
IL6	*2.4921*	IL10	*4.1753*
PTGS2	*2.3577*	TLR7	*3.6264*
TLR3	*4.5024*	CCL2	**–8.5434**
TLR5	*2.6342*	CD180	**–3.7619**
TLR8	*3.3652*	CD80	**–3.2825**
TNF	*2.1795*	CD86	**–2.126**
BTK	**–2.06**	CLEC4E	**–4.9524**
CD86	**–4.3049**	IFNA1	**–2.1016**
CLEC4E	**–6.8811**	IL8	**–2.2317**
CSF3	**–3.8798**		
IFNA1	**–3.7304**		
TLR4	**–2.0984**		
TLR7	**–3.2102**		

Fold regulation of scatterplot analysis of up-regulated (*italic*) and down-regulated (*bold*) genes of CD8$^+$ T cells stimulated with S100A8 compared with unstimulated CD8$^+$T cells from subjects with LP (*left*) and HC group (*right*).

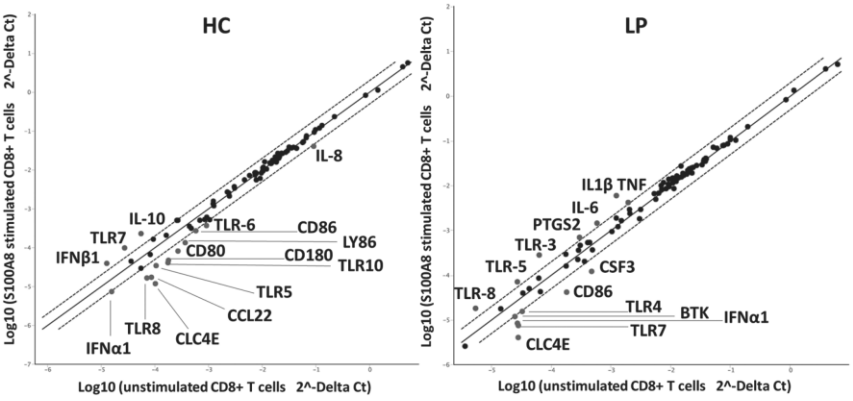


Fig. 3. Influence of S100A8 on the expression of genes related to the Toll-like receptor (TLR)-signalling pathway in CD8$^+$ T cells. Total mRNA from CD8$^+$ T cells from healthy controls (HC) ($n = 3$) and patients with lichen planus (LP) ($n = 3$) was isolated after 4 h of stimulation with S100A8. Quantitative real-time PCR with the Human Toll-Like Receptor Signalling Pathway RT2 profiler PCR array was performed. Analysis using Student's *t*-test was performed to determine significant gene expression fold changes upon stimulation with S100A8 compared with basal levels in the HC and LP groups. Dots represent the means from 3 independent donors. Genes that were significantly up-regulated by more than 2-fold are marked with their gene name.

DISCUSSION

In the present study, we observed increased expression of S100A8 and S100A9 transcripts in the skin lesions of subjects with LP as well as increased serum levels of the complex. The use of recombinant S100A8 in PBMC culture revealed differences in the cytotoxic responses of NK cells as well as TCD8$^+$ cells between the groups. These results suggested that S100A8 maintained cytotoxic activity in LP. Moreover, S100A8 directly activated TCD8$^+$ cells, leading to pro-inflammatory cytokine expression in LP (IL-6, TNF, IL-1β), whereas in HC, the regulatory cytokine IL-10 was expressed. Although the S100A8 receptor could be TLR4, CD8$^+$T cells activated by S100A8 induced altered TLR expression, including TLR3, TLR5, TLR7, and TLR8, which were differentially expressed between the LP and HC groups. This fact shows that the antiviral and antimicrobial responses are mediated in different ways in the presence of S100A8 between groups. It seems that S100A8 induced compensation in the expression of TLRs; while some are up-regulated others could be inhibited, in dependency to their baseline levels. Moreover, in healthy individuals S100A8 down-regulated TLR5 as well as TLR8 expression, probably to avoid the pro-inflammatory responses, differently from LP CD8$^+$ T cells.

We demonstrated an intensification of S100A8 transcripts and protein expression levels in the skin lesions of subjects with LP, especially in keratinocytes, as already shown by Kunz et al. (19). The increased serum levels of S100A8/A9 may also induce NK and CD8$^+$ T-cell migration to skin lesions and may be associated with an enhancement of their cytotoxic and cytokine responses, which, in turn, leads to the destruction of keratinocytes. Elevated levels of the S100A8 and S100A9 proteins are also a hallmark of numerous pathological conditions that are associated with inflammation (20–22). Indeed, S100A8 affected the up-regulation of pro-inflammatory cytokine gene expression in CD8$^+$ T cells from subjects with LP. Moreover, activation of PBMCs with S100A8 maintained the differential frequencies of CD8$^+$ CD107a$^+$ T cells from subjects with LP compared with HC, and simultaneous activation with LPS and S100A8 increased the production of IL-1β by CD8$^+$ T cells in subjects with LP. S100A8 is a major calcium-binding protein that can act as a second messenger after LPS activation, thereby inducing assembly of the inflammasome platform. In fact, S100A8 and S100A9 mediated the activation of NFκB, the NoD-like receptor (NLR) family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) protein, and pro-IL-1β in PBMCs (23).

The pro-inflammatory response induced by S100A8 in LP was observed via the up-regulation of the IL-6, TNF and IL-1β genes in lieu of the regulatory cytokine IL-10 observed in the HC group. IL-10 exerts an inhibitory role in the human monocyte synthesis of IL-1β, IL-6 and TNF after LPS activation (21). IL-10 production by CD8$^+$ T cells after S100A8 stimulation was detected only in HC, suggesting a defect in regulatory cytokine secretion in LP individuals. Our previous results showed that LPS induced decreased IL-10 secretion by PBMCs in individuals with LP (13). In addition, it must be further determined whether the CD8$^+$ T cells secreting IL-10 are regulatory CD8$^+$ T cells or Tc2 cells. Altogether, our results showed that TLR4 induction in LP leads to decreased IL-10 secretion, which probably contributes to the maintenance of pro-inflammatory status conferred by IL-1β, IL-6 and TNF gene expression.

The down-regulation of IFN-α in CD8$^+$ T cells in LP may suggest that S100A8 cannot control the viral response in individuals with LP. S100A8 mediates the anti-viral response in the HC group by inducing the up-regulation of IFN-1β and TLR7 gene expression. We have previously observed that subjects with LP have an impaired IFN-α response in PBMCs stimulated with a TLR7 agonist (imiquimod), which is restored by the activation of TLR7/TLR8 (CL097) (13). Indeed, we found that CD8$^+$ T cells from patients with LP activated with S100A8 exhibited the up-regulation of TLR8, but the down-regulation of TLR7. We also detected

the down-regulation of TLR4 after stimulation with S100A8 in human LP CD8$^+$ T cells. The decreased TLR4 expression after S100A8 stimulation of the CD8$^+$ T cells of subjects with LP suggests an interaction between S100A8 and this receptor.

We verified that S100A8 is able to enhance the degranulation of CD56^{bright} NK cells from patients with LP. It is possible that this subtype of NK cells migrates to sites of skin injury, given that CD56^{bright} NK cells could be found in skin lesions of cutaneous LP (24). However, it remains to be determined whether the NK cells that migrate to the skin acquire the CD56^{bright} NK profile by influencing the microenvironment.

Altogether, our findings highlight the role of S100A8 as an important DAMP that could regulate cytotoxic activity locally at skin lesions as well as systemically in patients with LP. This study provides evidence for the immunomodulatory role of S100A8 as well as the cytotoxicity functions mediated by NK and CD8$^+$ T cells in individuals with LP.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to all individuals who participated in the study. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (2011/20740-3) and the Laboratório de Investigação Médica, Unidade 56 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo.

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Boyd AS, Neldner KH. Lichen planus. J Am Acad Dermatol 1991; 4: 593–619.
2. Rashtak S, Pittelkow, MR. Skin involvement in systemic autoimmune diseases. Curr Dir Autoimmun 2008; 10: 344–358.
3. de Vries HJ, Teunissen MB, Zorgdrager F, Picavet D, Cornelissen M. Lichen planus is associated with human herpesvirus type 7 replication and infiltration of plasmacytoid dendritic cells. Br J Dermatol 2007; 299: 213–219.
4. Lodi G, Giuliani M, Majorana A, Sardella A, Bez C, Demarosi F, et al. Lichen planus and hepatitis C virus: a multicentre study of patients with oral lesions and a systematic review. Br J Dermatol 2004; 15: 1172–1181.
5. Iijima W, Ohtani H, Nakayama T, Sugawara Y, Sato E, Nagura H, et al. Infiltrating CD8+ T cells in oral lichen planus predominantly express CCR5 and CXCR3 and carry respective chemokine ligands RANTES/CCL5 and IP-10/CXCL10 in their cytolytic granules: a potential self-recruiting mechanism. Am J Pathol 2003; 163: 261–268.
6. Loser K, Vogl T, Voskort M, Lueken A, Kupas V, Nacken W, et al. The Toll-like receptor 4 ligands MRP8 and MRP14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. Nature Med 2010; 16: 713–718.
7. Xu X, Wu WY, Tu WZ, Chu HY, Zhu XX, Liang MR, et al. Increased expression of S100A8 and S100A9 in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. A correlation with organ involvement and immunological abnormalities. Clin Rheumat 2013; 32: 1501–1510.
8. Haga HJ, Brun JG, Berntzen HB, Cervera R, Khamashta M, Hughes GR. Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity. Lupus 1993; 2: 47–50.
9. Berntzen HB, Fagerhol MK, Ostensen M, Mowinckel P, Høyeraal HM. The L1 protein as a new indicator of inflammatory activity in patients with juvenile rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1991; 18: 133–138.
10. Salama I, Malone PS, Mihaimeed F, Jones JL. A review of the S100 proteins in cancer. Eur J Surg Oncol 2008; 34: 357–364.
11. Benoit S, Toksoy A, Ahlmann M, Schmidt M, Sunderkötter C, Foell D, et al.. Elevated serum levels of calcium-binding S100 proteins A8 and A9 reflect disease activity and abnormal differentiation of keratinocytes in psoriasis. Br J Dermatol 2006; 155: 62–66.
12. Aochi S, Tsuji K, Sakaguchi M, Huh N, Tsuda T, Yamanishi K, et al. Markedly elevated serum levels of calcium-binding S100A8/A9 proteins in psoriatic arthritis are due to activated monocytes/macrophages. J Am Acad Dermatol 2011; 64: 879–887.
13. Domingues R, Carvalho GC, da Silva Oliveira LM, Futata TE, Zimbres JM, Aoki V, et al. The dysfunctional innate immune response triggered by Toll-like receptor activation is restored by TLR7/8 and TLR9 ligands in cutaneous Lichen planus. Br J Dermatol 2015; 172: 48–55.
14. Lee Y, Jang S, Min JK, Lee K, Sohn KC, Lim JS, et al. S100A8 and S100A9 are messengers in the crosstalk between epidermis and dermis modulating a psoriatic milieu in human skin. Biochem Bioph Res Comm 2012; 423: 647–653.
15. Skrzeczyńska-Moncznik J, Stefańska A, Zabel BA, Kapińska-Mrowiecka M, Butcher EC, Cichy J. Chemerin and the recruitment of NK cells to diseased skin. Acta Biochimica Polonica 2009; 56 355–360.
16. Carbone T, Nasorri F, Pennino D, Donnarumma M, Garcovich S, Eyerich K, et al. CD56highCD16 – NK cell involvement in cutaneous lichen planus. Eur J Dermatol 2010; 20: 724–730.
17. Pereira NZ, Cardoso EC, da Silva Oliveira LM, de Lima JF, Branco, ACCC, Ruocco RMDSA, et al. Upregulation of innate antiviral restricting factor expression in the cord blood and decidual tissue of HIV-infected mothers. PloS One 2013; 8:e84917.
18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 2001; 25: 402–408.
19. Kunz M, Roth J, Sorg C, Kolde G. Epidermal expression of the calcium binding surface antigen 27E10 in inflammatory skin diseases. Arch Derm Res 1992; 284: 386–390.
20. Bogumil T, Rieckmann P, Kubuschok B, Felgenhauer K, Brück W. Serum levels of macrophage-derived protein MRP-8/14 are elevated in active multiple sclerosis. Neurosci Lett 1998; 247: 195–197.
21. Foell D, Hernandez-Rodriguez J, Sanchez M, Vogl T, Cid MC, Roth J. Early recruitment of phagocytes contributes to the vascular inflammation of giant cell arteritis. J Pathol 2004; 204: 311–316.
22. Lügering N, Stoll R, Kucharzik T, Schmid KW, Rohlmann G, Burmeister G, et al. Immunohistochemical distribution and serum levels of the Ca2+-binding proteins MRP8, MRP14 and their heterodimeric form MRP8/14 in Crohn's disease. Digestion 1995; 56: 406–414.
23. Simard JC, Cesaro A, Chapeton-Montes J, Tardif M, Antoine F, Girard D, et al. S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF-κB1. PloS One 2013; 8: e72138.
24. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor C, De Vries JE. IL-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autocrine role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med 1991 250: 1302–1305.

Supplementary material to article by G. Costa de Carvalho et al. "Up-regulation of Proinflammatory Genes and Cytokines Induced by S100A8 in CD8⁺ T Cells in Lichen Planus"

Appendix S1.

MATERIAL AND METHODS

Study population

The study enrolled patients with LP ($n = 25$; 3 males, 22 females) and healthy individuals ($n = 25$; 3 males, 22 females) from the Dermatological Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-FMUSP). Other forms of LP, such as oral LP, lichen planopilaris, or drug-induced LP, were not included in this evaluation, nor were any associations between LP and autoimmune diseases or other skin diseases investigated. The majority of patients had at least 2 affected limbs, with papules involving up to approximately 30% of the trunk. The patients had not been treated with any type of topical or systemic corticosteroid, retinoid or immunosuppressant prior to skin biopsy and blood collection. Two patients with LP were seropositive for HCV. The median age was 42.0 ± 5.5 years (range 20–71 years) for the subjects with LP and 43.46 ± 8.46 years (range 22–65 years) for the healthy individuals. All individuals provided written informed consent, and the study protocol was approved by the institutional ethics committee of the HC-FMUSP.

Flow cytometry

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized venous blood using Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) gradients and resuspended in Roswell Park Memorial Institute (*RPMI*) 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) medium supplemented with gentamicin (10 µg/ml) and 10% AB human serum (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The PBMCs (0.5×10^5 cells/well) were cultured in flat-bottomed microplates (Costar, Cambridge, MA, USA) at 37°C and in 5% CO_2. The PBMCs were stimulated with agonists of TLR4 (lipopolysaccharide (LPS) 1 µg/ml) or MRP8 (S100A8, 1 µg/ml; ProSpec-Tany TechnoGene Ltd, Ness-Ziona, Israel) alone, or LPS (1 µg/ml; Sigma) was added 30 min before the addition of S100A8 (1 µg/ml). CD107a PerCP-Cy5 was added at the beginning of these incubations. The agonist concentration was established in our previous assays. After 1 h of incubation, Brefeldin A (10 µg/ml; Sigma) was added, and the cultures were incubated for 5 h. As a positive control, a combination of phorbol 12-myristate 13-acetate (10 ng/ml; Sigma) and ionomycin (1 µg/ml; Sigma) was added. After incubation, the cells were labelled with LIVE/DEAD PE-Texas Red viability marker (Invitrogen), fixed with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and stained with the antibodies CD3-Qdot 605, CD4-Horizon V450, CD8-V500 Horizon, TNF-PE-Cy7, IL-1-beta-FITC, CD19-Horizon V500, CD16-APC-Cy7, and CD56-Alexa-fluor 700 (BD Biosciences) to evaluate $CD8^+$ T-cell or NK-cell subsets. A total of 200,000 events were acquired using a flow cytometer (LSR Fortessa, BD Biosciences, USA) and then analysed using FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Toll-like receptor signalling pathway PCR array of $TCD8^+$ cells stimulated with S100A8

$CD8^+$ T cells from the PBMCs of patients with LP ($n = 3$) and HC ($n = 3$) were sorted using a FACSAria III instrument (BD Biosciences). The $CD8^+$ T cells (0.5×10^5 cells/well) were cultured in a 96-well microplate (Costar, Cambridge, MA, USA) at 37°C and in 5% CO_2 and stimulated with MRP8 (S100A8, 1 µg/ml) for 4 h; afterwards, the cells were stored in RNAlater solution (Sigma-Aldrich) at –20°C. We assessed 84 genes related to TLR-mediated signal transduction and innate immunity using a Human Toll-Like Receptor Signalling Pathway PCR array (Qiagen). The RNA was extracted from $TCD8^+$ cells using the RNeasy Micro Kit Protocol (Qiagen, Hilden, Germany). Then, reverse transcription was performed using the RT^2 PreAMP cDNA Synthesis kit (Qiagen), and the cDNA equivalent was used with an RT^2 Profiler PCR Array plate (Qiagen) on an ABI 7500 RT-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Data were evaluated using 7500 software version 2.0.6 (Applied Biosystems) combined with Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) for statistical evaluation. $\Delta\Delta Ct$ values were calculated by normalizing the gene expression levels of housekeeping genes and then comparing with controls. The relative expression level of each gene was expressed as fold regulation. When comparing each gene's signal intensity between S100A8-stimulated and S100A8 non-stimulated $TCD8^+$ cells in patients with LP or HC groups, the cut-off was considered ≥ 2-fold for gene induction and ≤ 2-fold for gene repression.

Real-time PCR

One-punch biopsies (6 mm) of skin lesions, primarily located on the arms and forearm, were performed under local anaesthesia, and the samples were stored in RNAlater solution (Sigma-Aldrich) at –20ºC. The frozen samples were then processed using a Tissue Ruptor (Qiagen, Valencia, CA, USA). Total RNA was also extracted from the skin biopsies using an RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). Reverse transcription was performed using a Reverse Transcriptase Kit (Qiagen). The primers utilized for the real-time PCR assays were as follows:

S100A8 (MRP8): 5'-GGGATGACCTGAAGAAATTGCTA-3' forward, 5'-TGTTGATATCCAACTCTTTGAACCA-3' reverse; S100A9 (MRP14): 5'-GTGCGAAAAGATCTGCAAAATTT-3' forward, 5'-GGTCCTCCATGATGTGTTCTATGA-3' reverse; and GAPDH: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3' forward, 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3' reverse.

Real-time qPCR was performed using an Applied Biosystems 7500 Fast system with the specific primers and SYBR Green (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), as described by Pereira et al. (17). The levels of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA in samples within the same plate were analysed to normalize the mRNA contents of the tested samples. The cycling protocol consisted of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C. The amplification results were analysed using Sequence Detection System (SDS) software (Applied Biosystems), and the normalized expression was calculated as described by Livak & Schmittgen (18).

ELISA assay for S100A8/S100A9 serum detection

An ELISA was used to detect the S100A8/S100A9 protein in sera according to the manufacturer's instructions (BioLegend, San Diego, CA, USA).

S100A8 protein detection by immunohistochemistry

One part of each skin biopsy was formalin-fixed and then embedded in paraffin and sectioned at 4 µm. The histological sections were deparaffinized in xylol baths and then rehydrated in ethanol, blocking with 3% hydrogen peroxide. The slides were incubated with the primary antibody, rabbit monoclonal anti-S100A8 (Abcam, Cambridge, MA, USA) or phosphate-buffered saline (PBS) in 1% bovine serum albumin in PBS (pH 7.4) and visualized with Permanent Red LSAB-AP chromogenic solution (Dako, CA, USA), non-immune IgG was used for negative staining control. The slides were scanned using an Aperio Scan-scope Cs (Aperio Technologies, Vista, CA) and then analysed using Image-Pro Plus software (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MA, USA). The total tissue distribution of

S100A8 in the stained area divided by the total area measured in the epidermis or dermis was calculated.

Statistical analysis

The data were analysed using GraphPad Prism software (version 5.0). Student's *t*-test was performed to determine significant gene expression fold changes in PCR array analysis. The alternate distribution was examined using non-parametric Mann-Whitney test for statistical comparisons between groups, and $p \leq 0.05$ was considered significant. Baseline values were subtracted from all respective stimulated values in flow cytometry analysis.

Supplementary material to article by G. Costa de Carvalho et al. "Up-regulation of Proinflammatory Genes and Cytokines Induced by S100A8 in CD8⁺ T Cells in Lichen Planus"

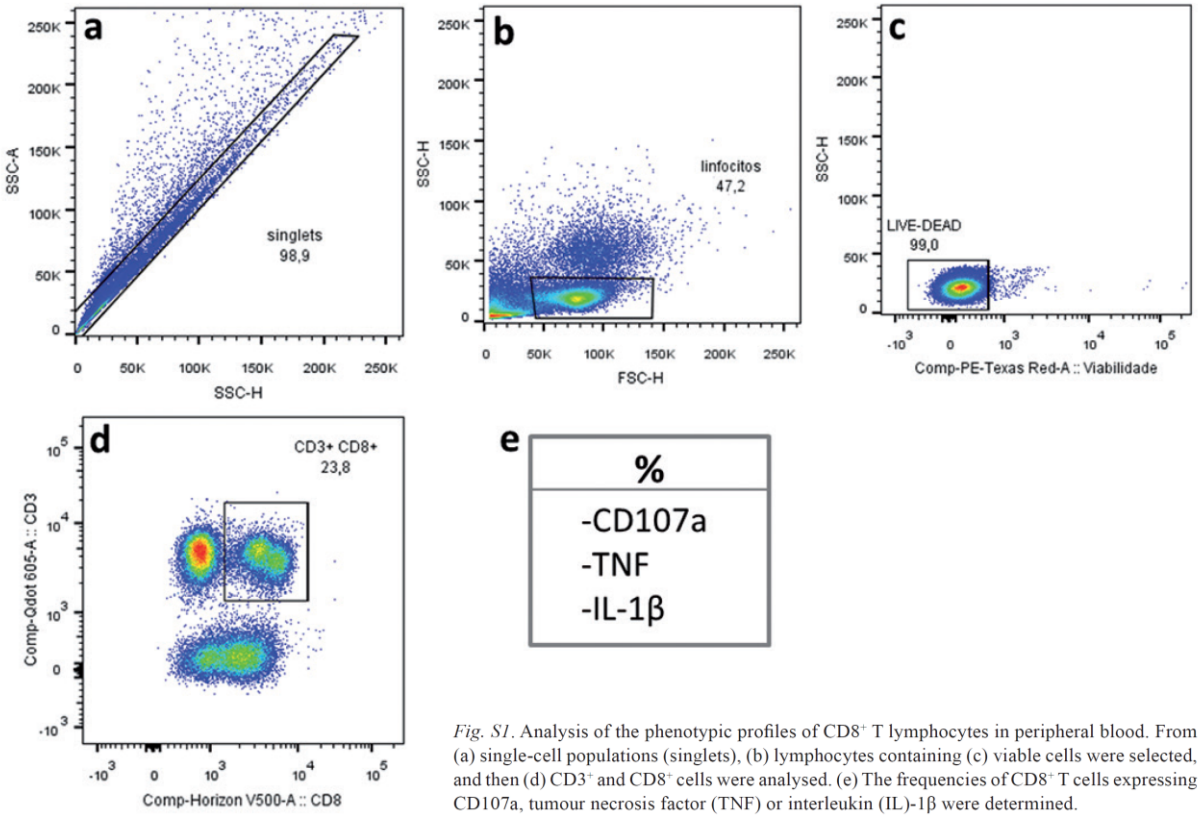


Fig. S1. Analysis of the phenotypic profiles of CD8⁺ T lymphocytes in peripheral blood. From (a) single-cell populations (singlets), (b) lymphocytes containing (c) viable cells were selected, and then (d) CD3⁺ and CD8⁺ cells were analysed. (e) The frequencies of CD8⁺ T cells expressing CD107a, tumour necrosis factor (TNF) or interleukin (IL)-1β were determined.

Supplementary material to article by G. Costa de Carvalho et al. "Up-regulation of Proinflammatory Genes and Cytokines Induced by S100A8 in CD8⁺ T Cells in Lichen Planus"

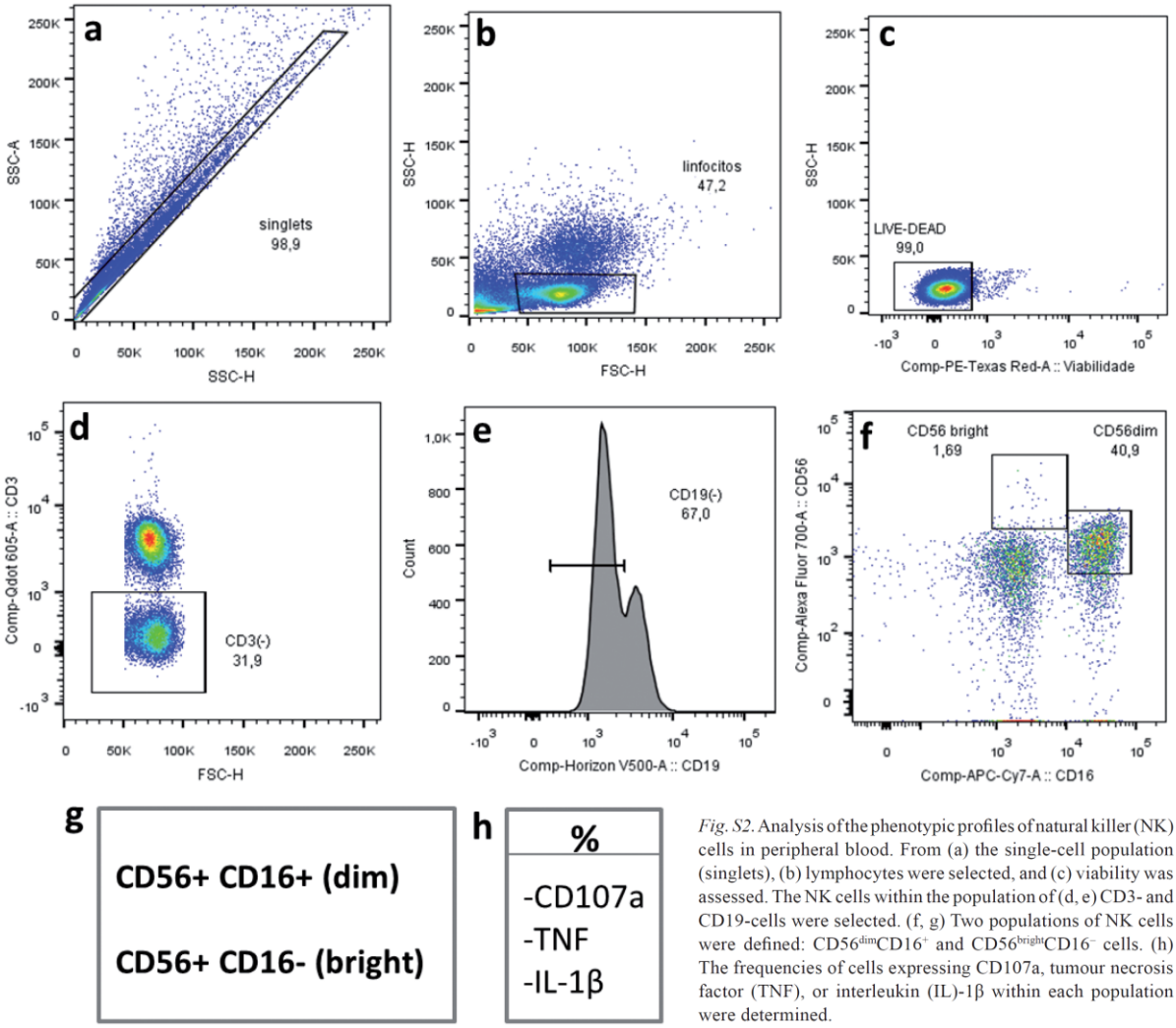


Fig. S2. Analysis of the phenotypic profiles of natural killer (NK) cells in peripheral blood. From (a) the single-cell population (singlets), (b) lymphocytes were selected, and (c) viability was assessed. The NK cells within the population of (d, e) CD3- and CD19-cells were selected. (f, g) Two populations of NK cells were defined: $CD56^{dim}CD16^{+}$ and $CD56^{bright}CD16^{-}$ cells. (h) The frequencies of cells expressing CD107a, tumour necrosis factor (TNF), or interleukin (IL)-1β within each population were determined.

Supplementary material to article by G. Costa de Carvalho et al. "Up-regulation of Proinflammatory Genes and Cytokines Induced by S100A8 in CD8⁺ T Cells in Lichen Planus"

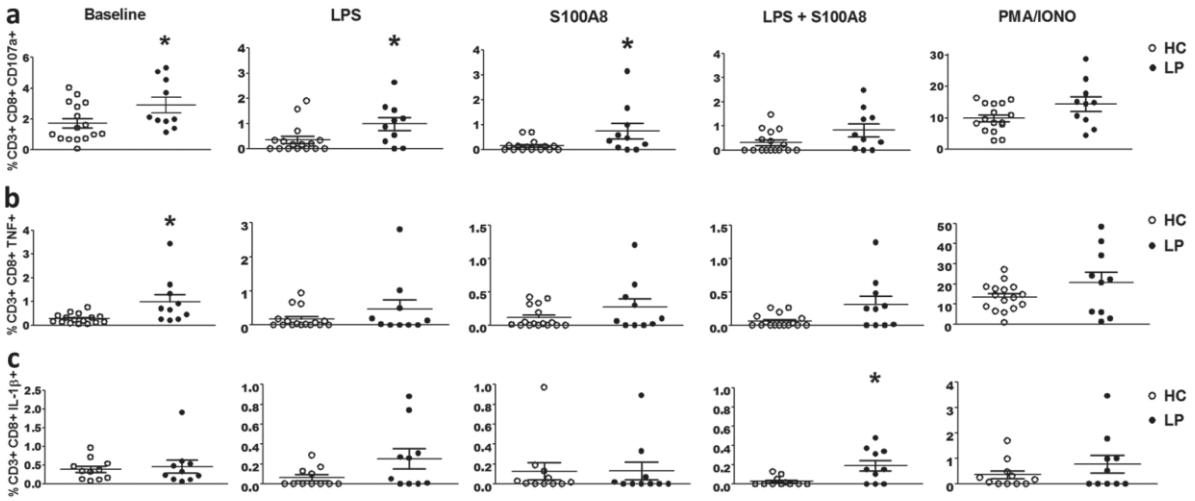


Fig. S3. Cytotoxic profiles of circulating CD8⁺ T cells stimulated by ligands of Toll-like receptor TLR4. Flow cytometry with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was used to evaluate the frequency of CD8⁺ T cells expressing (a) CD107a, (b) tumour necrosis factor (TNF), or (c) interleukin (IL)-1β in the presence or absence of stimulation by lipopolysaccharide (LPS), S100A8, LPS plus S100A8 or PMA/ionomycin in individuals with lichen planus (LP) ($n=10$) or health controls (HC) ($n=15$) for CD107a and TNF analysis, and LP ($n=10$) or HC ($n=11$) for IL-1β analysis. Baseline values were subtracted from the stimulated values. The data are presented as the means ± standard error of the mean (SEM). $*p<0.05$.

Supplementary material to article by G. Costa de Carvalho et al. "Up-regulation of Proinflammatory Genes and Cytokines Induced by S100A8 in CD8+ T Cells in Lichen Planus"

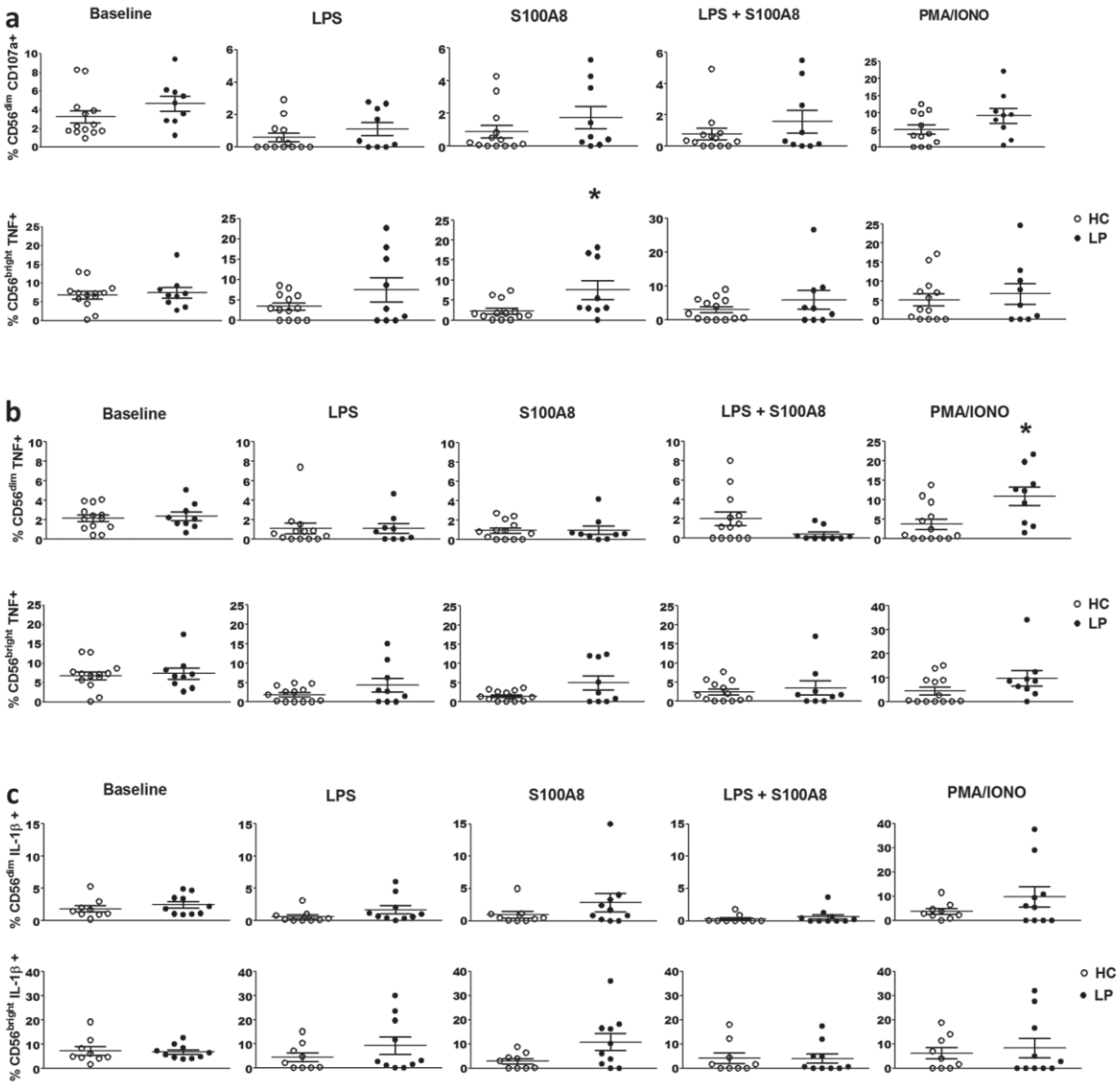


Fig. S4. Increased frequency of circulating CD107a^{+}CD56^{bright} natural killer (NK) cells in subjects with lichen planus (LP). Flow cytometry of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was used to evaluate the frequencies of CD107a, tumour necrosis factor (TNF) and interleukin (IL)-1β positive subsets of NK CD56^{dim} and CD56^{bright} cells in unstimulated cells or in the presence or absence of stimulation by LPS, S100A8, LPS plus S100A8 or PMA/ionomycin. Individuals with LP ($n=9$) or healthy controls (HC) ($n=13$) were used for CD107a and TNF analysis, and individuals with LP ($n=10$) or HC ($n=9$) were used for IL-1β analysis. The baseline values were subtracted from the stimulated values. The data are presented as the means ± standard error of the mean (SEM). *$p<0.05$.

4.2 Resultados referentes à análise de subpopulações de linfócitos TCD8+, expressão de inflamassoma, receptores de ativação/inibição de células NK, ligantes solúveis e receptor TLR-4

4.3 Características demográficas dos pacientes com Líquen plano

Os pacientes com Líquen plano (n=25) selecionados do Ambulatório da Clínica de Dermatologia HC-FMUSP foram compostos por 88% de mulheres e 12% de homens, com idade média de 43,46 anos ± 8,46 (Tabela 1). As lesões cutâneas nesses pacientes se concentraram principalmente em punhos (94,4%) e pernas (88,8%), 50% dos pacientes apresentavam lesões nos braços, 22% no tronco e somente 1% na face. A sorologia para vírus como: Citomegalovírus (CMV), vírus da Hepatite A (VHA), B (VHB), C (VHC), Herpes vírus simples e o vírus Espstein- Baar nos indivíduos com LP também foi realizada (23) (**Anexo5**).

Controles saudáveis provenientes do Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências – LIM56 (n=25) foram predominantemente compostos por mulheres (22) em relação aos homens (3), com idade média de 42 anos ± 5,5.

Tabela 1. Tabela demográfica dos indivíduos incluídos no estudo**.**

	Controle	**Líquen plano**
n total	25	25
Gênero (mulheres/homens)	22/3	22/3
Idade (média em anos)	42,0 ± 5,5	43,46 ± 8,46
Acometimento oral (mulheres/homens)		6/1
Acometimento genital (mulheres/homens)		3/1

Valores expressos em média ± desvio padrão.

4.5 Efeito do S100A8 e LPS em subpopulações de células T CD8+ em pacientes com LP

Após avaliarmos o nível de expressão de S100A8/A9 na lesão cutânea e no soro, prosseguimos a avaliação para verificar o efeito *in vitro* do S100A8 na resposta citotóxica e inflamatória em células TCD8+ (71). A estratégia de análise está ilustrada na **Figura 2**.

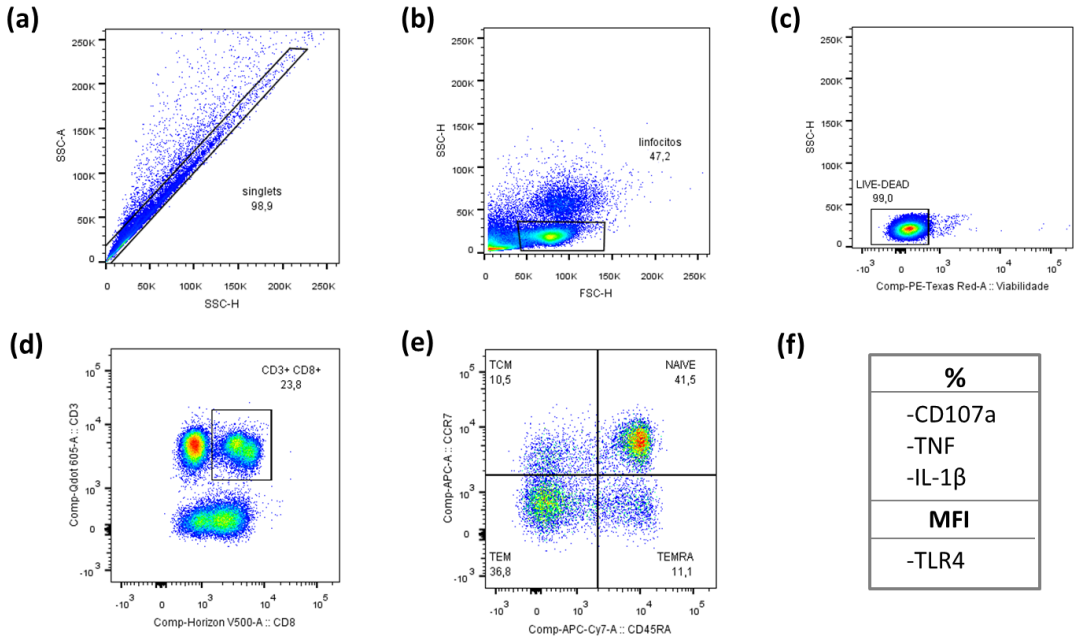


Figura 2. **Estratégia para análise do perfil fenotípico de células TCD8+ ou suas subpopulações efetoras/memória no sangue periférico.** A partir de células únicas (singlets) **(a)** foram selecionados linfócitos **(b)** contendo células viáveis **(c)** para analisar células T CD3+ TCD8+ **(d)** ou quanto a etapas de maturação, na qual as células T CD8+ foram definidas como: *naives* (CD45RA+CCR7+), memória central - TCM (CD45RA-CCR7+), efetoras – TEM (CD45RA-CCR7-), e efetoras RA - TEMRA (CD45RA+CCR7-) **(e)** A intensidade media de fluorescência (MFI) do marcador TLR-4 foi obtida a partir de células TCD8+, e suas subpopulações assim como a frequência de TNF e IL-1β. e a expressão do marcador de desgranulação CD107a **(f)**.

A resposta de células T CD8+ a agonistas TLR-4 pode ser distinta em função das etapas de diferenciação das células, assim, foi analisada a frequência de células TCD8+ nos estágios de maturação em indivíduos com LP. Para tanto foram identificados os fenótipos das populações *naive* (CD45RA+CCR7+), memória central (CD45RA-CCR7+), efetoras (CD45RA-CCR7-) e efetoras RA (CD45RA+CCR7-). Apesar de observamos um percentual de células TCD8+ ativadas no estágio basal (71), não foi identificado alteração na frequência de subpopulações de células TCD8+ em comparação aos indivíduos controles **(Figura 3).**

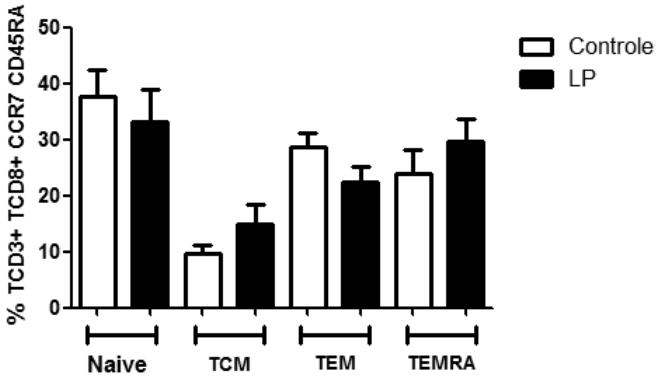


Figura 3: Frequência de subpopulações de células T CD8+ em etapas de diferenciação . A frequência de células TCD8+ foi avaliada em CMNs não estimuladas de indivíduos com LP (n=10) e indivíduos saudáveis (n=10). A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os dados estão representados como média ± erro padrão.

O perfil de desgranulação em subpopulações de células TCD8+ está relacionado com o potencial citotóxico e memória, efeito que pode ser evidenciado pela expressão de CD107a na membrana celular. Em contraste com os dados de células TCD8+ totais (71), no estado basal as subpopulações de memória/efetoras mostraram semelhante produção de CD107a **(Figura 4a)**.

Na condição de estímulo com LPS, houve indução de desgranulação nas células efetoras terminalmente diferenciadas TEMRA (CD45RA+CCR7-) de indivíduos com LP comparadas aos controles **(Figura 4b).** Contudo, as células T CD8+ efetoras CD45RA-CCR7-CD107a+ foram predominantes em resposta ao S100A8 **(Figura 4c)**, de mesmo modo, a estimulação dupla de LPS e S100A8 potencializou a resposta nesta subpopulação nos indivíduos com LP **(Figura 4d)**.

A produção de citocinas pró-inflamatórias nos estágios de maturação de células TCD8+ induzidas com ligantes de TLR4 foi analisada nos indivíduos com LP. O estágio de maturação de células TCD8+ efetoras TEM (CCR7- CD45RA-) induziu TNF em indivíduos com LP após estímulo com S100A8 **(Figura 5c)**. Em contraste, a dupla indução com LPS e S100A8 induziu aumento de células TCM TNF+ nos grupo LP em relação a controles saudáveis **(Figura 5d).**

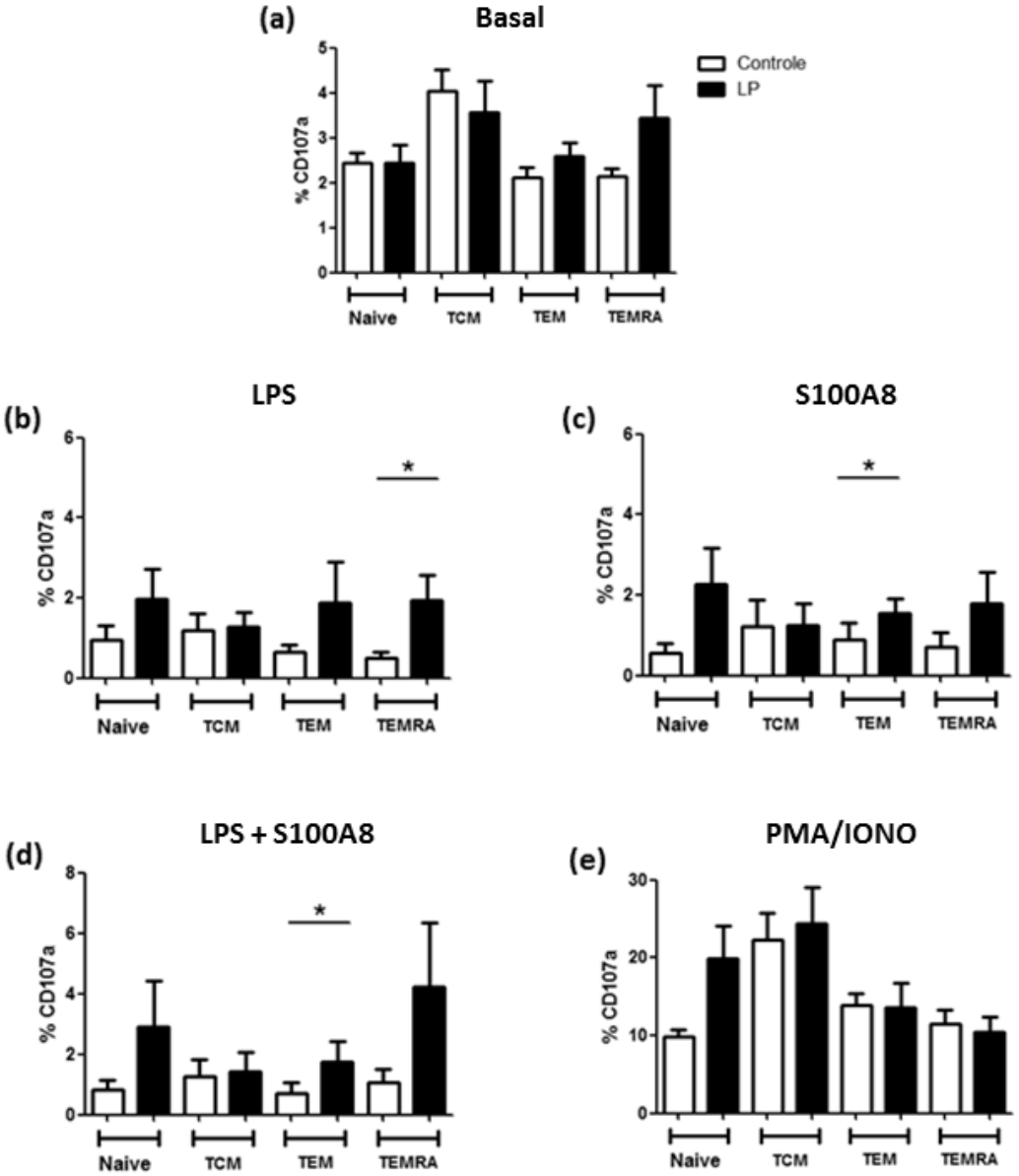


Figura 4. Frequência de expressão de CD107a em subpopulações de células TCD8+ induzida por ligantes de TLR4 e PMA/iono. A frequência de CD107a em subpopulações de células TCD8+ foi avaliada em CMNs não estimuladas **(a)** ou estimuladas com LPS **(b)**, S100A8 **(c)**, LPS + S100A8 **(d)** e PMA/Iono **(e).** A análise foi realizada por citometria de fluxo em indivíduos com LP (n=10) e indivíduos saudáveis (n=15). Os dados estão representados como média ± erro padrão. Os valores basais foram subtraídos dos estimulados.*$p<0.05$.

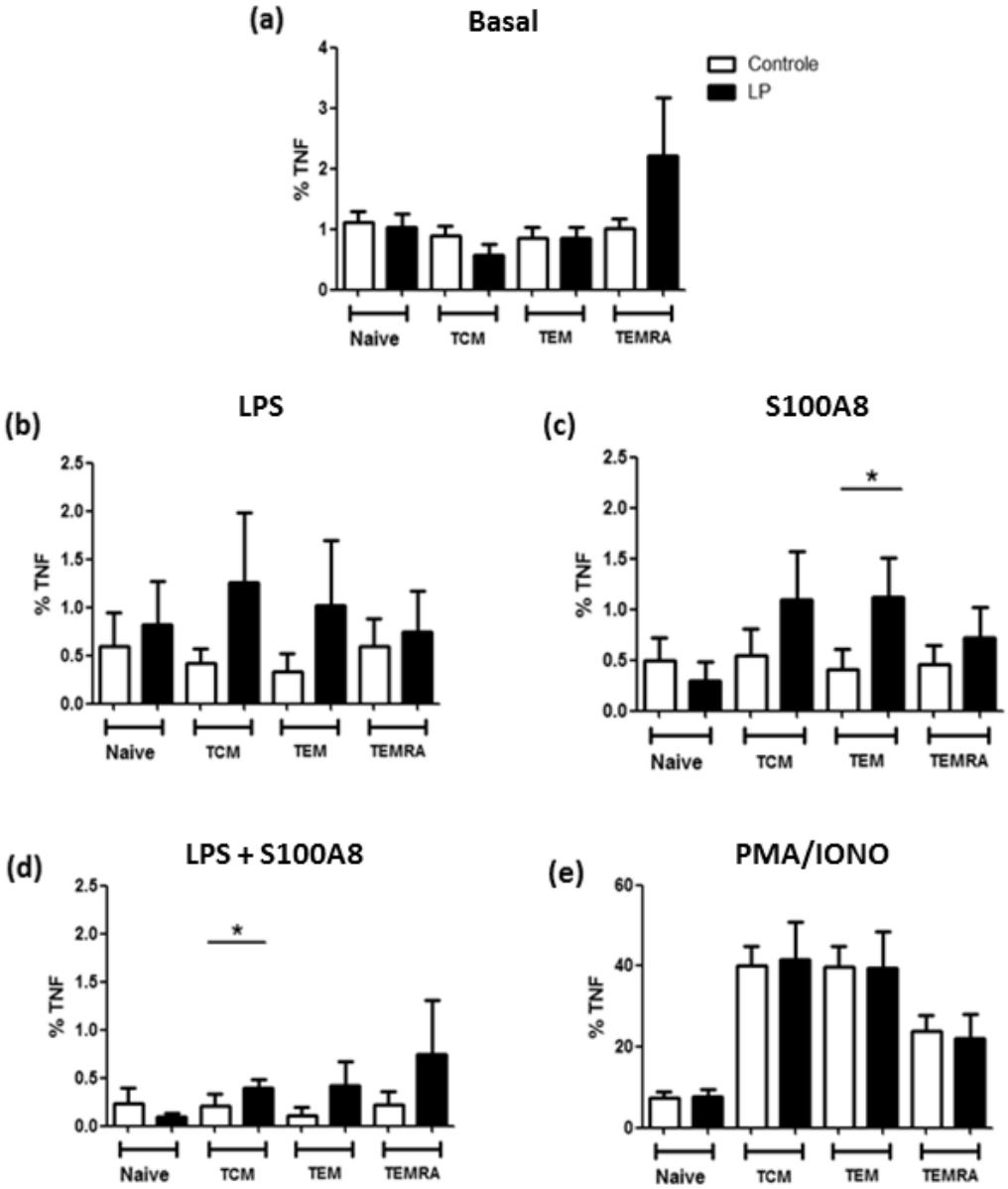


Figura 5. Frequência de expressão de TNF em subpopulações de células TCD8+ induzida por ligantes de TLR4 e PMA/iono. A frequência de TNF em subpopulações de células TCD8+ foi avaliada em CMNs não estimuladas **(a)** ou estimuladas com LPS **(b)**, S100A8 **(c)**, LPS + S100A8 **(d)** e PMA/Iono **(e).** A análise foi realizada por citometria de fluxo em indivíduos com LP (n=10) e indivíduos saudáveis (n=15). Os dados estão representados como média ± erro padrão. Os valores basais foram subtraídos dos estimulados. *p<0.05.

Na sequência foi analisada a citocina pró-inflamatória IL-1β nas subpopulações de células TCD8+, na condição basal ou após estímulo com ligantes de TLR4 e PMA e ionomicina, em CMNs de indivíduos com LP e controles. As **Figuras 6 (a), (b), (c)** e **(e)** mostram que tanto os ligantes de TLR4 como LPS ou S100A8 quanto o estímulo por PMA/Iono nas subpopulações de células TCD8+ não alteraram a produção de IL-1β entre os grupos. No entanto, a dupla estimulação com LPS e S100A8 em CMNs de indivíduos com LP aumentou a produção de IL-1β em células TCD8+ efetoras TEM (CCR7-CD45RA-) **Figura 6d**.

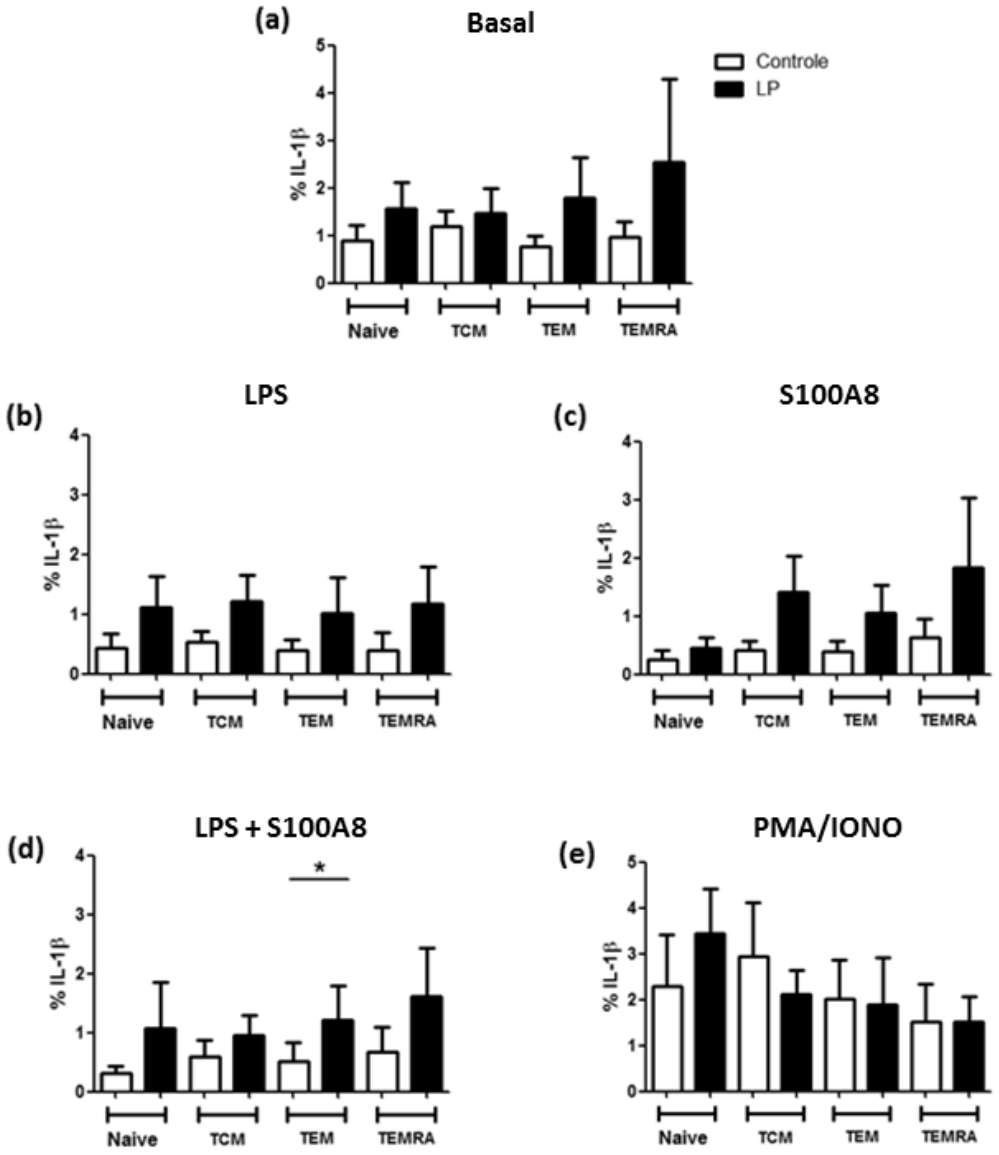


Figura 6. Frequência de expressão de IL-1β em subpopulações de células TCD8+ induzida por ligantes de TLR4 e PMA/iono. A frequência de IL-1β em subpopulações de células TCD8+ foi avaliada por CMNs não estimuladas **(a)** ou estimuladas com LPS **(b)**, S100A8 **(c)**, LPS + S100A8 **(d)** e PMA/Iono **(e).** A análise foi realizada por citometria de fluxo em indivíduos com LP (n=10) e saudáveis. Os dados estão representados como média ± erro padrão. Os valores basais foram subtraídos dos estimulados. *p<0.05.

Em seguida, avaliamos a expressão do TLR4 nas populações de células TCD8+. Apesar da diferença de respostas quando as células TCD8+ e subpopulações são ativadas com agonistas TLR4 nos indivíduos com LP, a expressão de TLR4 em células TCD8+ foi similar entre as subpopulações no estágio basal ou nas situações onde CMNs foram estimuladas em cultura **(Figuras 7 a, b e c).**

Os dados mostram que a subpopulação de células de TCD8+ de memória efetora de indivíduos com LP ativadas com a molécula S100A8 tem um perfil de resposta citotóxico e pro-inflamatório distinto de controles sadios.

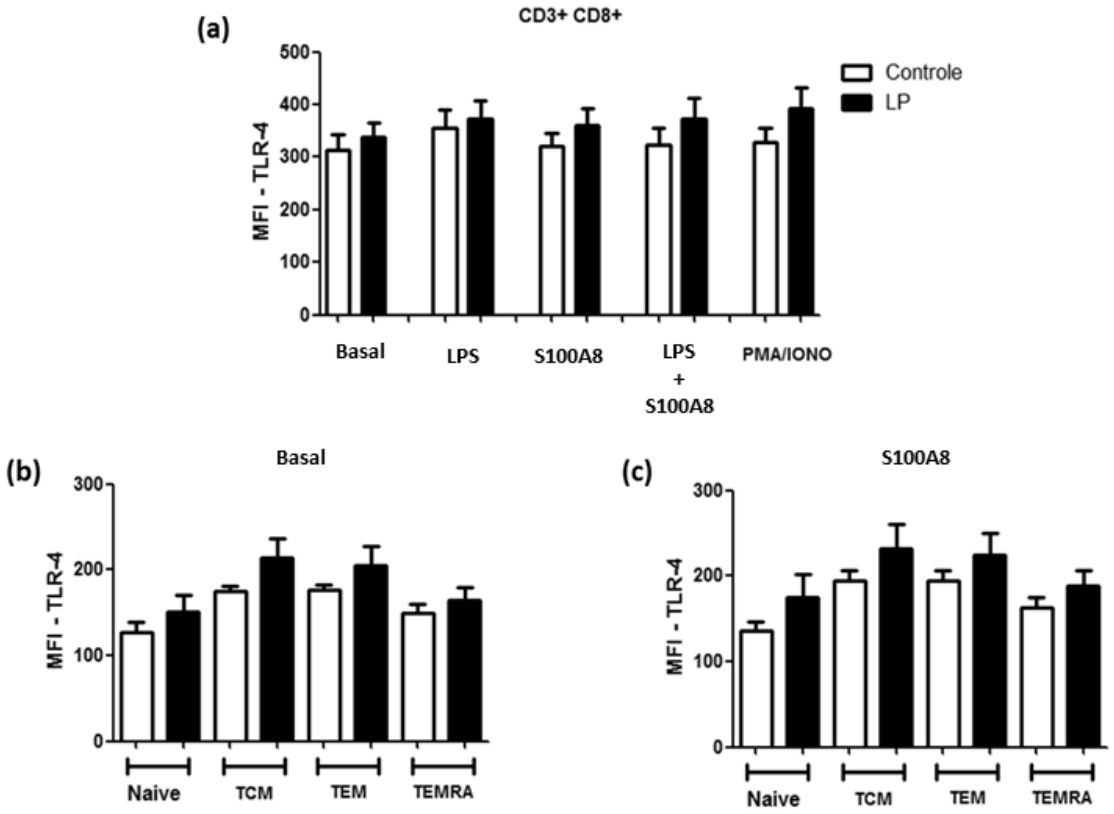


Figura 7: Expressão de TLR4 em células TCD8+ ou em subpopulações efetora/memória estimuladas. A intensidade média de expressão (MFI) de TLR-4 foi avaliada em CMNs por citometria de fluxo em indivíduos com LP (n=10) e indivíduos saudáveis (n=10). Análise de células TCD8+ não estimuladas ou estimuladas com LPS, S100A8, LPS + S100A8, PMA/Iono **(a)** ou subbopulações de células TCD8+ não estimuladas **(b)** ou estimuladas com S100A8 **(c).** Os dados estão representados como média ± erro padrão.

4.6 Expressão de inflamassoma em células TCD8+ S100A8 ativadas em indivíduos com LP

Os resultados publicados mostraram que as células T CD8+ circulantes possuem um perfil de ativação distinta em pacientes com LP comparada aos indivíduos controles

(71). Além disto, ainda não está determinado sobre a plataforma de inflamassomas em linfócitos, sobretudo em linfócitos TCD8+. Desta forma, as células T CD8+ foram isoladas a partir de CMNs para avaliar o efeito direto da proteína S100A8 na expressão de genes do inflamassoma. Para avaliar a expressão de transcritos responsáveis pela ativação do inflamassoma foi realizada a análise por PCR por tempo real em células TCD8+ purificadas no Cell-sorting e pré-ativadas com S100A8 de indivíduos com LP ou controles saudáveis. A expressão de mRNA de NLRP1, NLRP3, NLRP4, AIM-2, Caspase 1 e IL-1β em indivíduos com LP foi similar aos indivíduos saudáveis. No entanto, uma pequena variação foi observada em relação à produção de IL-1β em células TCD8+ ativadas por S100A8 de indivíduos com LP. A expressão do receptor NLRP4 não foi detectável (**Figura 8 a e b)**.

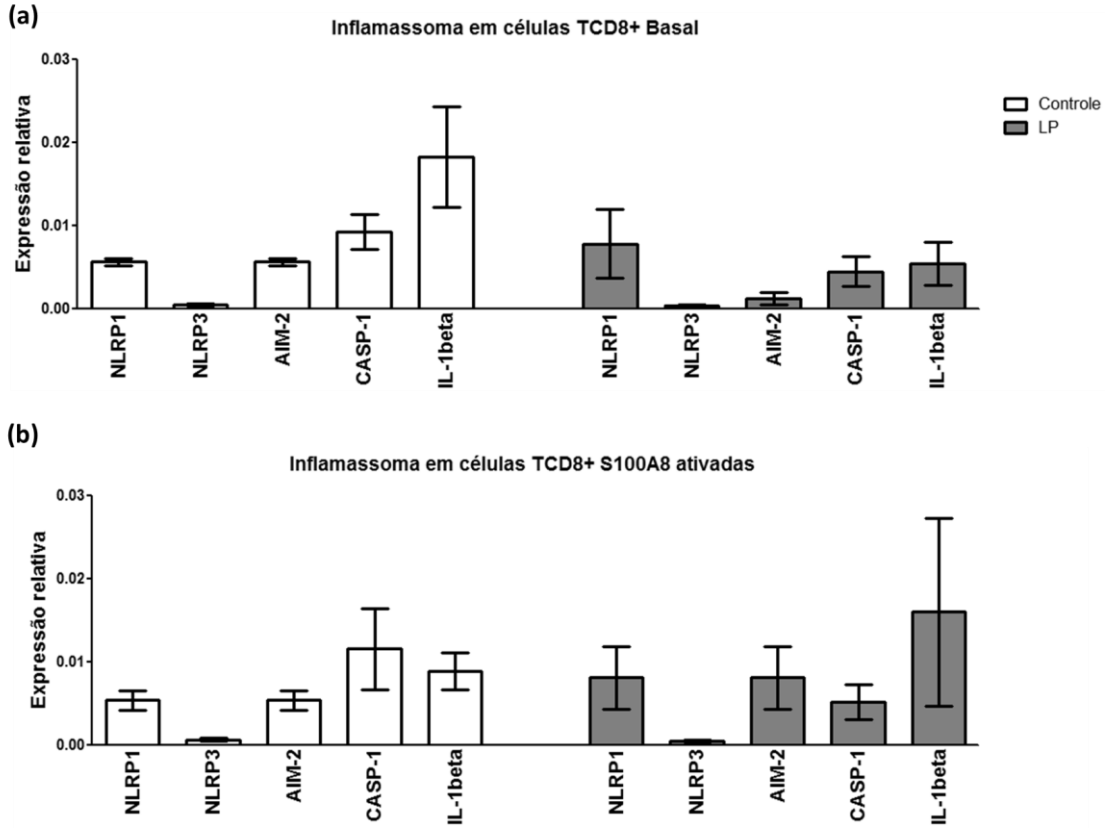


Figura 8. **Expressão de NLRP1, NLRP3, NLRP4, AIM-2, Caspase 1 e IL-1β em células TCD8+ estimuladas com S100A8 em pacientes LP**. As células TCD8+ purificadas **(a)** e estimuladas com S100A8 **(b)** de pacientes com LP (n = 3) ou controles saudáveis (n = 3) foram analisadas quanto a expressão do mRNA de NLRP1, NLRP3, NLRP4, AIM-2, Caspase 1 e IL-1beta utilizando PCR em tempo real**.**

4.7 Efeitos do S100A8 em subpopulações de células NK de pacientes com LP

Subtipos de células NK com potencial efetor e secretor são encontrados de acordo com a expressão de CD56, em células $CD56^{dim}$ e $CD56^{bright}$. O potencial para ativação via TLR4 a partir das subpopulações de células NK na circulação sanguínea pode contribuir para acentuar o processo de desgranulação/CD107a e a produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF e IL-1β (71). A estratégia para análise de receptores das populações de células NK está ilustrada na **Figura 9**.

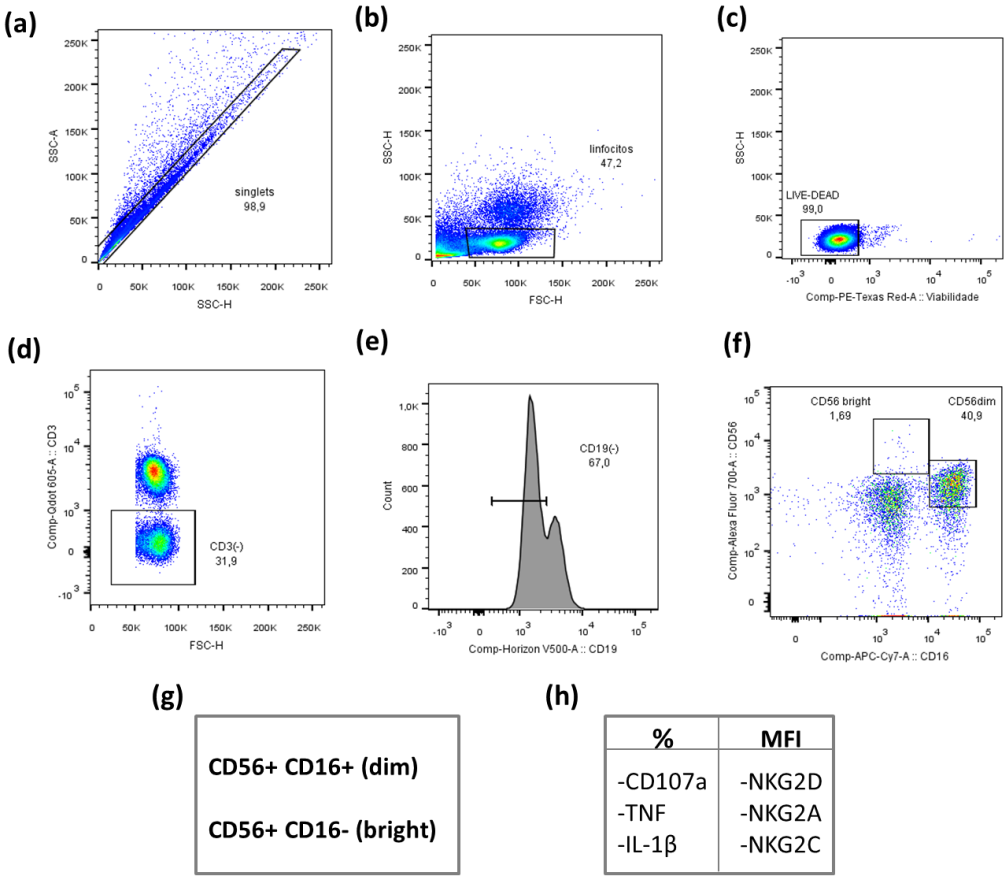


Figura 9: Estratégia de análise das células NK no sangue periférico. A partir de células únicas (singlets) **(a)** foram selecionados linfócitos **(b)** em células viáveis **(c).** As células NK foram selecionadas dentro da população de linfócitos CD3-CD19- **(d)** e **(e)**, em seguida duas populações de NK foram definidas como $CD56^{dim}$CD16+ e $CD56^{bright}$ CD16- **(f)** e **(g)** que expressam TNF, IL-1β e CD107a e a intensidade média de fluorescência (MFI) dos marcadores NKG2D, NKG2A e NKG2C **(h)**.

A avaliação dos receptores é importante para avaliar o potencial de ativação ou não das células NK em resposta a estímulos de resposta inata. A **Figura 10** mostra a expressão de marcadores inibidores ou ativadores de células NK em resposta aos ligantes de TLR4. A **Figura 10 a** mostra aumento da expressão do marcador de ativação NKG2D na população $CD56^{dim}$ no LP em relação aos controles saudáveis e o mesmo efeito após o estímulo com os ligantes de TLR4. A expressão do receptor inibidor NKG2A já estava elevada na condição

basal no grupo LP enquanto os ligantes de TLR4 bem como a ativação por PMA/Iono modulam a ação desse receptor nas células NK CD56^{dim} **(Figura 10 c)**. É possível observar um aumento na freqüência de células NK CD56^{bright} que expressam NKG2C ao estímulo por PMA/Iono em indivíduos com LP **(Figura 10 f)**.

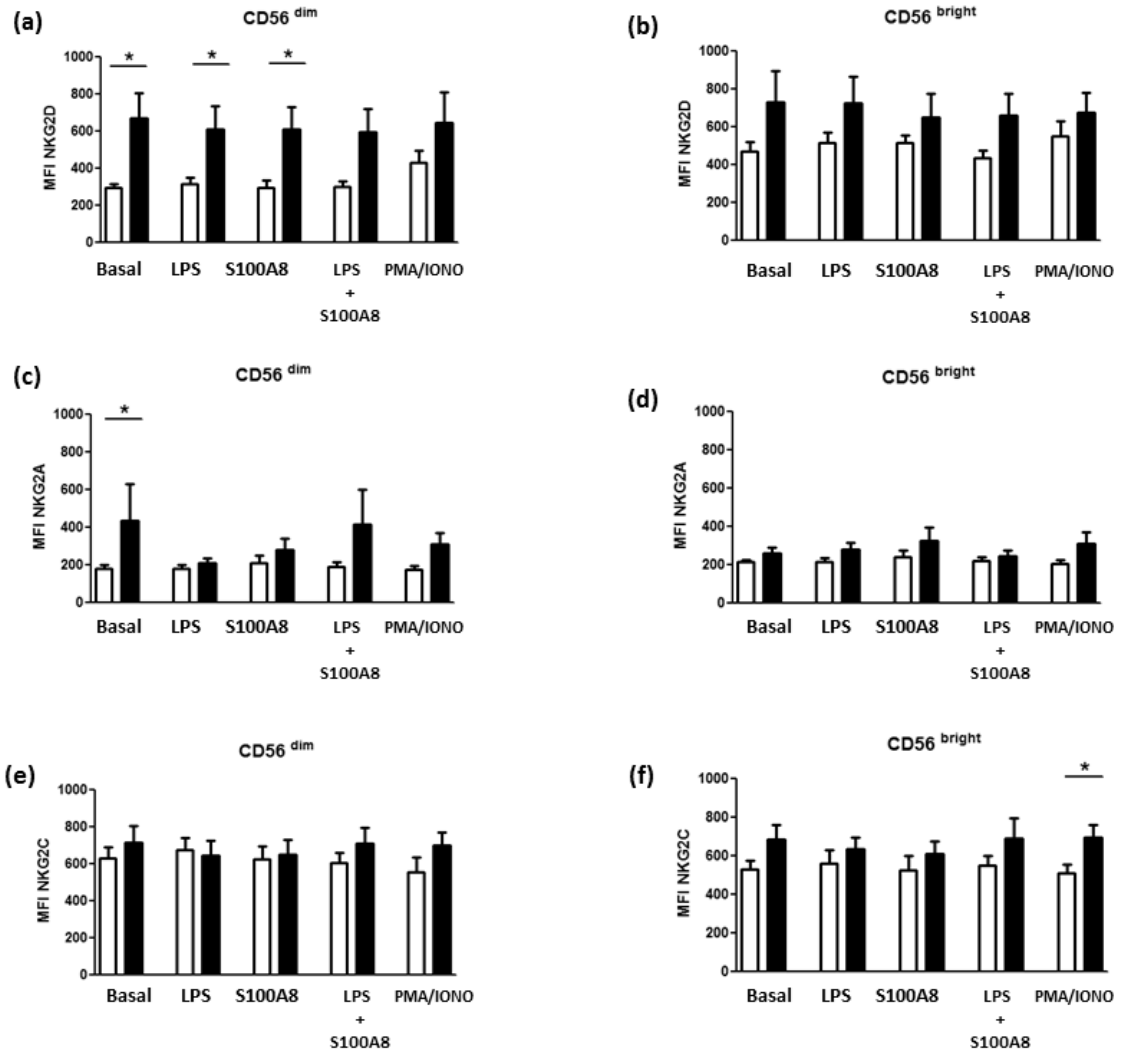


Figura 10: Expressão de marcadores de ativação e inibição em células NK estimuladas. A intensidade de expressão (MFI) de marcadores de inibição NKG2A, ativação NKG2D, NKG2C foi avaliada em subpopulações de células NK CD56 ^{dim} **(a)**, **(c)** e **(e)** e NK CD56 ^{bright} **(b)**, **(d)** e **(f)** em CMNs de indivíduos com LP (n=10) e indivíduos saudáveis (n=10) por citometria de fluxo. Os dados estão representados como média ± erro padrão. * P <0,05.

O NKG2D é capaz de interagir com moléculas induzidas por stress, como MICA e MICB expressas na superfície de células tumorais e/ou infectadas por vírus. A **Figura 11** mostra que os níveis de MICB solúveis dos indivíduos LP são equivalentes aos controles saudáveis. Apesar dos níveis de expressão do receptor NKG2D estarem mais elevados nas células NK de indivíduos com LP os níveis de MICA não foram detectáveis em ambos os grupos.

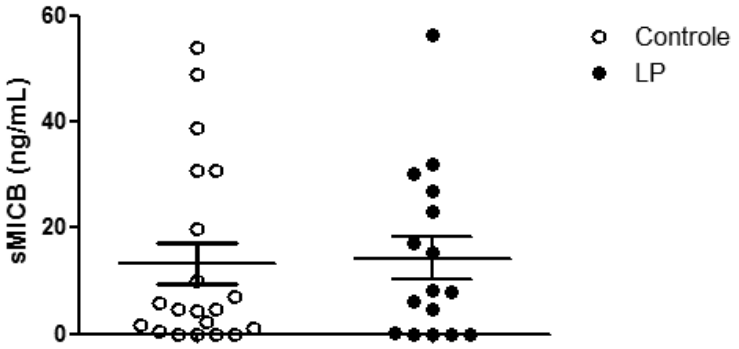


Figura 11: Níveis circulantes de MICB em pacientes LP. Os níveis de MICB no soro de pacientes com LP (n = 16) e controle saudáveis (n = 20) foram determinados por ELISA. Os dados são apresentados como média ± erro padrão.

4.8 Análise da expressão de mRNA de TLR4 em lesões de pele em indivíduos com LP

Para avaliar a expressão de TLR4 na epiderme e derme de pacientes com LP (n=12), foi realizada a marcação por imunoistoquimica em biopsias dos leões cutâneas, e comparadas com biópsias de pele de indivíduos sadios (n=12). A **Figura 12a** ilustra a alta expressão de TLR-4 na epiderme nas biopsias de pele de indivíduos sadios enquanto a F**igura 12b** mostra que nos indivíduos com LP há uma baixa expressão de TLR4 na epiderme, porém uma maior evidência na região do infiltrado, na derme.

Em seguida, foi realizado o calculo da distribuição de TLR-4 (**Figura 12c e d)** na epiderme e derme de indivíduos com LP, onde foi considerada a área positiva em relação à área total analisada para cada camada. Os resultados mostram uma diminuição de TLR-4 na epiderme e uma elevada expressão nas lesões de indivíduos com LP em relação aos indivíduos saudáveis. Embora exista uma diferença de intensidade da proteína entre a camadas, a expressão do mRNA de TLR-4 não diferiu entre os grupos analisados **(Figura 12 e)**

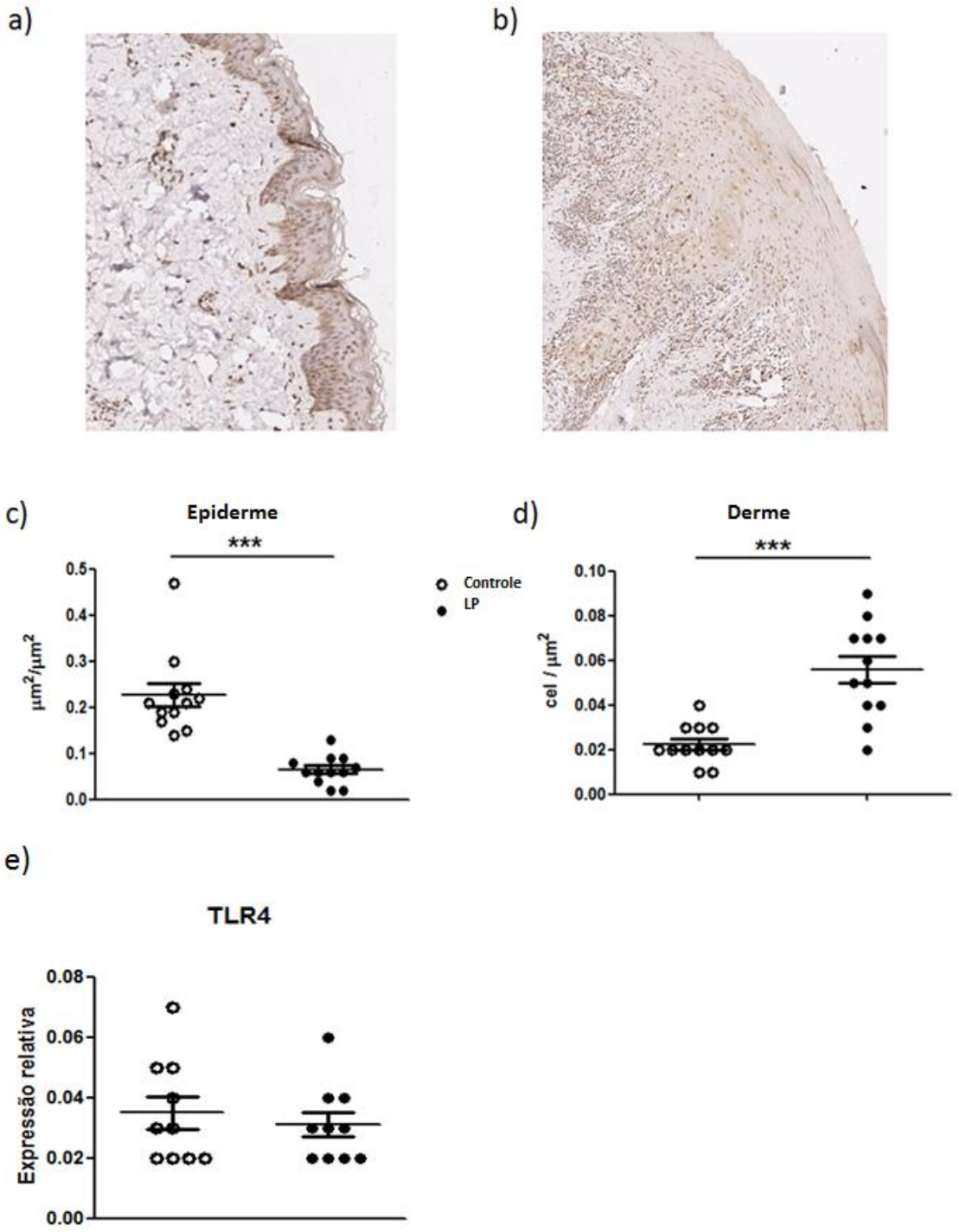


Figura 12. Aumento da expressão de TLR-4 na derme de lesões cutâneas de pacientes com LP. A expressão de TLR-4 foi avaliada por imunoistoquímica em biópsias cutâneas de controles saudáveis (n = 12) (a) ou indivíduos com LP (n = 12) (b). A distribuição de TLR-4 nas camadas da epiderme (c) e derme (d) foi calculada dividindo a área positiva para o TLR-4 pela área total. A expressão de mRNA TLR-4 (e) foi realizada por PCR em tempo real.. Os dados são apresentados como média ± erro padrão *** P <0,0001.

4.9 Análise da expressão de mRNA de RAGE em lesões de pele em indivíduos com LP

A expressão de RAGE na epiderme e derme de pacientes com LP (n=13) foi avaliada por imunoistoquimica em biopsias de leões cutâneas e comparada com biópsias de pele de indivíduos sadios (n=12). A **Figura 13a** ilustra a expressão de RAGE na epiderme e derme de controles sadios e a **Figura 13b** mostra nos indivíduos com LP, a expressão de RAGE na epiderme com uma maior expressão na derme.

Em seguida, foi realizado o calculo da distribuição de RAGE (**Figura 13c e d)** na epiderme e derme de indivíduos com LP, onde foi considerada a área positiva em relação à área total analisada para cada camada. O cálculo da **Figura 13c** mostra uma expressão similar de RAGE na epiderme de ambos os grupos, enquanto a **Figura 13d** mostra que nos indivíduos com LP há uma alta expressão de RAGE em células do infiltrado na região derme. No entanto, embora exista um aumento da intensidade da proteína na derme, foi observada uma redução da expressão do mRNA de RAGE em indivíduos com LP (**Figura 13 e**)

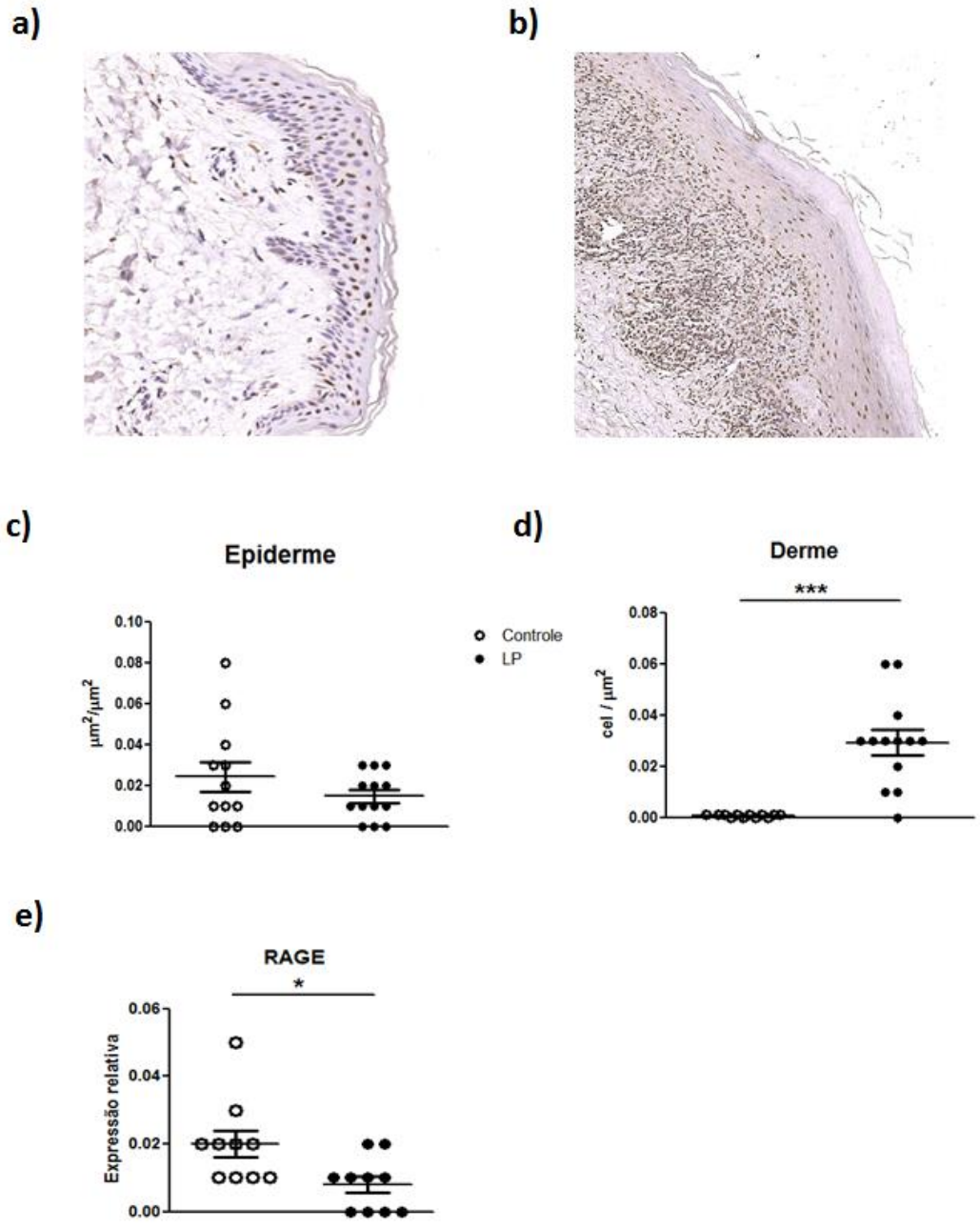


Figura 13. Aumento da expressão de RAGE na derme de lesões cutâneas de pacientes com LP. A expressão de RAGE foi avaliada por imunoistoquímica em biópsias cutâneas de controles saudáveis (n = 12) (a) ou indivíduos com LP (n = 13) (b). A distribuição de RAGE nas camadas da epiderme (c) e derme (d) foi calculada dividindo a área positiva para o RAGE pela área total. A expressão de mRNA RAGE (e) foi realizada por PCR em tempo real.. Os dados são apresentados como média ± erro padrão * P <0,05

4.1.1 Expressão do DAMP HMGB-1 nas lesões cutâneas de LP e níveis séricos

Assim como o DAMP S100A8, a proteína HMGB-1 possui um importante papel modulador em processos inflamatórios que podem direcionar o perfil de ativação celular.Para avaliar a expressão da proteína HMGB-1 na epiderme e derme de pacientes com LP (n=12), foi realizada a marcação por imunoistoquimica em biopsias dos leões cutâneas, e comparadas com biópsias de pele de indivíduos sadios (n=12). A **Figura 14a** ilustra a alta expressão de HMGB-1 na epiderme de indivíduos sadios enquanto a **Figura 14b** mostra que nos indivíduos com LP há uma baixa marcação de HMGB-1 na epiderme, porém uma maior evidência na região do infiltrado, na derme.

Em seguida, foi realizado o calculo da distribuição da proteína HMGB-1 (**Figura 14c e d)** na epiderme e derme de indivíduos com LP onde foi considerada a área positiva em relação à área total observada para cada camada. Os resultados mostram diminuição do receptor HMGB-1 na epiderme e uma elevada marcação na derme das lesões de indivíduos com LP em relação às amostras de indivíduos saudáveis. Similarmente a expressão de TLR4, a expressão do mRNA de HMGB-1 no tecido não diferiu entre os grupos analisados **(Figura 14e).**

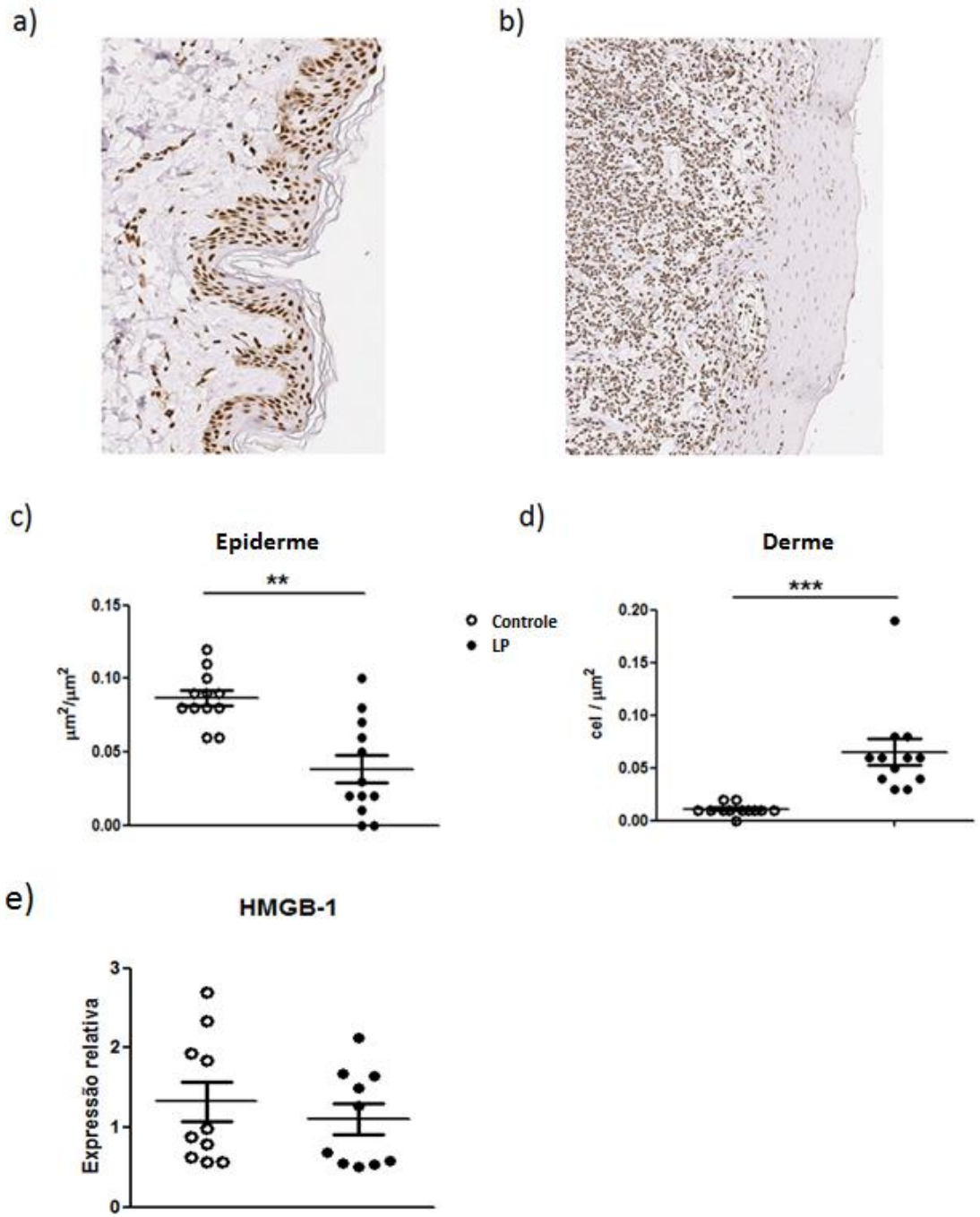


Figura 14. Aumento da expressão de HMGB-1 na derme de lesões cutâneas de pacientes com LP. A expressão da proteína HMGB-1 foi avaliada por imunoistoquímica em controles saudáveis (n = 12) (a) ou indivíduos com LP (n = 12) (b). A distribuição de HMGB-1 nas camadas da epiderme (c) e derme (d) foi calculada e a expressão de mRNA HMGB-1 (e) detectada por PCR em tempo real.. O cálculo da área de HMGB-1 positiva na derme foi obtido dividindo a área positiva para o receptor HMGB-1 pela área total analisada. Os dados são apresentados como média ± erro padrão **p<0,001 *** P <0,0001.

Em seguida para analisar se o aumento da expressão de HMGB-1 nas lesões cutâneas poderia representar os níveis séricos da proteína, foi realizado o ensaio imunoenzimático. A **Figura 15** mostra que não há diferença de HMGB-1 no soro de indivíduos com LP em relação ao grupo controle. Contudo, os dados HMGB-1 mostram que o padrão de DAMPs a nível sorológico em indivíduos com LP pode variar e que a proteína S100A8 mostra ser um melhor marcador sérico na doença (71)

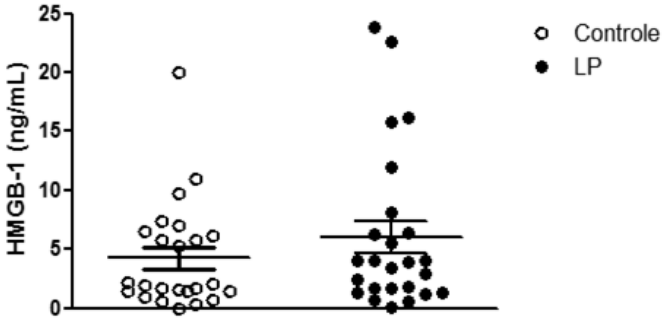


Figura 15. Níveis circulantes do DAMP HMGB-1 em indivíduos com LP. Os níveis da proteína HMGB-1 no soro de pacientes com LP (n = 25) e controle saudáveis (n = 24) foram determinados por ELISA. Os dados são apresentados como média ± erro padrão.

5. Discussão

Embora existam vários estudos das células ou de componentes do sistema imune nas lesões cutâneas de pacientes com LP, poucos trabalhos evidenciam as alterações extra-cutâneas, como em células do sangue periférico. Desta forma, foram analisadas as CMNs de sangue periférico de pacientes e controles com a finalidade de estudar os componentes do sistema imune inato e adaptativo. Como representantes desses sistemas, foram analisadas as células NK e os linfócitos TCD8+, ambos estimulados com ligantes de TLR4, o S100A8 e o LPS.

Nas lesões de pele de indivíduos com LP, já observamos um aumento na expressão de transcritos e da proteína de S100A8, S100A9 assim como dos níveis séricos do complexo S100A8/A9. Além disso, o S100A8 foi capaz de aumentar a resposta citotóxica de células NK e células TCD8+, principalmente a subpopulação de memória efetora TEM (CCR7- CD45RA-).

A habilidade do S100A8 in vitro em induzir aumento da resposta citotóxica de células NK e TCD8+ e de citocinas pró-inflamatórias pode sugerir que estas células *in situ*, levem à destruição dos queratinócitos. De fato, observamos uma intensa expressão da proteína S100A8 na epiderme e derme nas lesões de pele dos indivíduos com LP, em especial nos queratinócitos.

Elevados níveis das proteínas S100A8 e S100A9 também são encontrados em condições patológicas associadas à inflamação como: artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, doença inflamatória crônica do intestino, esclerose sistêmica cutânea difusa, psoríase e câncer (72); (73); (74); (75); (76); (77); (41).

No LP, os altos níveis séricos de S100A8/A9 devem favorecer à ativação de células imunes circulantes. Verificamos que há um aumento percentual na condição basal de células TCD8+CD107a+, ou seja na ausência de estímulo, o que representa o status *in*

vivo. A ativação *in vitro* de CMNs com S100A8 foi capaz de induzir um aumento na frequência de células TCD8+CD107a+ em indivíduos com LP comparando aos controles saudáveis. As células TCD8+ de indivíduos com LP parecem ser mais susceptíveis aos efeitos da proteína S100A8 do que as células TCD4+CD107a+ citotóxicas; que é menos responsiva à ativação por LPS e S100A8 (dados não mostrados). As células TCD4+ com potencial citotóxico têm sido descritas em infecções virais crônicas como o HIV, capazes de reduzirem o pico inicial de carga viral (78). No entanto o papel citotóxico das células TCD4+ no LP ainda não havia sido investigado.

A habilidade similar do LPS e S100A8 em induzir a secreção de TNF em células TCD8+ foi observada em ambos os grupos estudados. Em contraste, a ativação simultânea dos agonistas aumentou a produção de IL-1β nas células TCD8+ nos indivíduos com LP. Existe a possibilidade da ativação via TLR4 poder atuar na ativação da plataforma de inflamassoma e apesar do complexo S100A8/A9 poder intermediar a ativação de NFκB, a proteína NLR3 e a pro- IL-1β em CMNs (46), no presente trabalho foi utilizado somente a fração S100A8 recombinante para avaliação da ativação do inflamassoma diretamente em células TCD8+.

Chama atenção de maneira inédita a observação de moléculas do inflamassoma em células TCD8+ de indivíduos com LP. As células ativadas ou não com S100A8 são capazes de expressar, mesmo em baixas quantidades, transcritos de inflamassomas, como NLRP1, NLRP3 e AIM-2. Além disto, nossos dados prévios, publicados, confirmam que os linfócitos TCD8+ isolados de indivíduos com LP e ativados com S100A8 possuem uma maior capacidade de produção de IL-1β, o que pode sugerir ativação da via dos inflamassomas.

A participação de receptores do tipo NLR tem sido estudada em células mielóides, no entanto, novas abordagens têm surgido com a finalidade de compreender o papel

desses receptores em células epiteliais ou linfocíticas (79); (80). A participação dos receptores NLR já foi mostrada ser independente da ativação de inflamassoma em células TCD4+, e também com papel na diferenciação de fenótipo celular. O receptor NLR3 é capaz de atuar como fator de transcrição no processo de diferenciação de células T para o perfil Th2 (81).

Apesar de que ambos, o LPS e o S100A8 serem ligantes de TLR4, não foi observado alteração da intensidade de expressão de TLR4 em células TCD8+, o que sugere que não é decorrente do aumento da expressão do receptor que induz maior ativação celular. Contudo, a avaliação do perfil de expressão de genes relacionados à via de sinalização em células TCD8+ purificadas, é um parâmetro que foi avaliado nos pacientes com LP.

As células TCD8+ purificadas de sangue periférico de pacientes com LP e estimuladas com S100A8 mostram aumento do perfil pró-inflamatório com regulação positiva de genes para IL-6, TNF e IL-1β. Em contraste, células TCD8+ de controles saudáveis ativadas com S100A8 mostraram um perfil regulador com aumento da expressão de IL-10. O papel inibidor da IL-10 em monócitos na síntese de IL-1β, IL-6 e TNF após a ativação por LPS (TLR-4) já é bem estabelecido (82). Nossos resultados mostram que a produção de IL-10 por células TCD8+ após o estímulo por S100A8 somente foi detectada em controles saudáveis, sugere que os indivíduos com LP possuem um perfil mais pro-inflamatório. Nossos resultados prévios mostram ainda que no LP, há uma diminuição na secreção de IL-10 induzida por LPS em CMNs (34). Em conjunto, os resultados mostram que a redução de secreção da IL-10, contribui para a manutenção do perfil pró-inflamatório das células TCD8+ evidenciado pela expressão gênica de IL-1β, IL-6 e TNF e também pelo nível basal aumentado de molécula de desgranulação.

O S100A8 é um potente quimiotático para células mielóides, regulado positivamente pelo LPS em macrófagos (83). Desta forma, a transcrição do gene S100A8 pode ser regulada indiretamente, como consequência da ativação via TLR-4. Estudos em macrófagos mostram que a indução de mRNA do S100A8 pelo LPS é aumentada com o PMA, e reduzido com uso de inibidores da via proteina quinase C e A (PKC e PKA), sugerindo que o S100A8 é um importante modulador dessas duas vias. Um fato interessante é que em macrófagos é o heterodimero S100A8 e não a S100A9 que é regulada positivamente por alguns mediadores como IFN-γ, IL-1β, e TNF (83). Similarmente, no presente trabalho quando estimulamos as células TCD8+ com S100A8, foi evidenciado um perfil similar ao descrito por macrófagos quanto a expressão de mRNA para IL-1β, e TNF (84).

Os nossos dados mostram regulação negativa do fator antiviral, IFN-α por células TCD8+ no LP, sugerindo que a proteína S100A8 pode modular negativamente a resposta viral. Em contraste, a ativação de células TCD8+ de controles saudáveis com S100A8 resulta em uma resposta antiviral com regulação positiva da expressão genes como IFN-β and TLR-7. Nosso estudo anterior mostra que os indivíduos com LP possuem uma diminuída resposta de IFN-α quando CMNs são estimuladas via TLR-7 pelo agonista imiquimod e essa resposta é restaurada com o agonista CL097 (TLR-7/TLR-8) (34). Contudo, neste presente trabalho nós detectamos que no LP, as células TCD8+ quando ativadas com S100A8 mostram uma regulação positiva na expressão de TLR-8 e uma regulação negativa de TLR-7. A regulação negativa da expressão de TLR-4 após o estímulo com S100A8 em células TCD8+ de indivíduos com LP também foi detectada, no entanto é necessário mais estudos para avaliar a função da interação da proteína S100A8 com o receptor TLR-4 no LP. A regulação negativa de transcritos para TLR-4

em células TCD8+ pode ser o resultado da demanda do receptor para provável controle do processo inflamatório na doença.

Nas lesões de pele de indivíduos com LP, observamos um aumento na produção de TLR-4, RAGE e HMGB-1, além do S100A8. O aumento da expressão das proteínas foi identificado na região da derme, onde se encontra um intenso infiltrado celular e possível local de interação celular que pode contribuir para o perfil inflamatório na doença. A relação de transcritos também foi avaliada e não foi possível observar uma diferença significativa na expressão de TLR-4 e HMGB-1 entre os grupos analisados, no entanto, a expressão de RAGE mostrou ser diminuída em indivíduos com LP. Na biópsia é extraída um fragmento de tecido composto pela epiderme e derme, e para a análise do transcrito, o material não foi separado em camadas. Já com a imunohistoquimica, é possível analisar a expressão separadamente, o que salienta a importância do emprego das duas metodologias. Contudo, a possível diminuição da expressão de RAGE pode estar associada ao excesso de sua produção na condição inflamatória e a regulação negativa devido à interação com ligantes.

A proteína HMGB-1 sérica foi detectada em níveis similares entre os grupos analisados. O aumento da expressão do HMGB-1 é relatado em doenças autoimunes como a artrite reumatoide, em particular no tecido sinovial onde a inflamação é predominante. No entanto assim como no LP, os níveis séricos de HMGB-1 na artrite reumatóide mostram ser baixos (85) em relação ao Lupus eritematoso sistêmico (LES) e o possível aumento sérico da proteína HMGB-1 pode estar associado ao padrão de células inflamatórias e apoptóticas encontradas na circulação periférica no LES (86). Além disso, a proteína HMGB-1 pode complexar com outras moléculas imunoativas (87); (88), que pode inteferir na sua mensuração, assim a determinação do HMGB-1 livre ou em forma de complexo pode ser um parâmetro importante a ser considerado.

Os resultados referentes as células NK CD56^{dim} ativadas via TLR4 e o processo de desgranulação foram similares entre os grupos analisados. Os dados na população de células NK CD56^{bright} mostram um aumento na desgranulação nos pacientes com LP, quando induzidos por S100A8. É possível que este subtipo de células NK seja recrutado aos sítios de lesão cutânea, considerando que são as células CD56^{bright} as predominantes nos sítios inflamatórios de LP cutâneo (17). Uma vez presente no sítio inflamatório e em contato direto o DAMP (S100A8), esta subpopulação de célula NK pode mostrar maior susceptibilidade a este fator na desgranulação, ao contrário das células NK CD56^{dim}. Se as células NK que migram à pele, adquirem o perfil NK CD56^{bright}, a partir de NKCD56^{dim}, sob a influência de fatores do microambiente, ainda não está determinado.

A ativação via TLR4 e produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF, IL-1β foram similares entre os grupos analisados em subpopulações de células NK. Os dados da freqüência das células NK CD56^{dim} secretoras de TNF nos pacientes com LP estimulados com PMA, evidencia que a produção de TNF é induzida pela ativação da via PKC, não dependendo da interação via TLR4, e indução da via NFkB.

Em relação aos receptores ativadores e inibidores de células NK, nossos dados destacam o efeito modulador do S100A8 na expressão receptor inibidor NKG2A nas células CD56^{dim}. No estado basal CMNs de indivíduos com LP mostram uma maior expressão do receptor NKG2A nas células NK CD56^{dim}, quando estimuladas com S100A8 a expressão do receptor inibidor é similar entre os grupos analisados. Além disso, a indução com LPS ou S100A8 não foi capaz de interferir na expressão do receptor ativador NKG2D nas NK CD56^{dim}. A ação de outro receptor ativador NKG2C parece não ter relação com a indução por agonistas TLR4.

Estudos evidenciam que o HLA-E, ligante de NKG2A é uma molécula não clássica de MHC de classe I capaz de se associar a outro membro da família MRP

(MRP7). A ligação HLA-E-MRP7 junto ao receptor NKG2A é capaz de inibir a lise mediada por células NK (89). O S100A8 como membro da mesma família de proteínas poderia também ser um potencial ligante de HLA-E e exercer influência sobre as células NK CD56^{dim} impedindo sua ação lítica. A participação do NKG2D na resposta de em células NK foi mostrado em modelo experimental que está associado com ativação induzida pela proteína S100A8/A9 via receptor RAGE, no entanto, a resposta das células NK só é eficaz quando ocorre o contato célula-célula tumoral (90).

A análise da expressão do receptor NKG2A e NKG2D tem sido demonstrada em biopsias de carcinoma celular escamoso ou em LPO (91). Enquanto o NKG2A é expresso em altos níveis no câncer e um nível menor no LPO, o receptor NKG2D mostra-se com uma alta expressão nas duas doenças em relação a biópsias na região oral de controles saudáveis. Isto indica uma forte participação do receptor NKG2D, no infiltrado de células inflamatórias das lesões. No LP, evidenciamos elevados níveis basais de NKG2D nas células NK CD56^{dim}, isto indica uma possível participação extracutânea deste subtipo de células NK independente do local da lesão.

As células NK CD56^{bright} isoladas de lesões de pele de indivíduos com LP cutâneo, mostram elevada expressão de do receptor NKG2A, sendo que 50-60% são NKG2D+ (17). O nosso dados mostram que em células NK CD56^{bright} circulantes, não há diferença na expressão do receptor NKG2D em relação ao NKG2A. É possível que a freqüência similar de NKG2A e NKG2D em células NK CD56^{bright} de ambos os grupos reforce a ideia que os níveis de sMICB solúveis são similares entre os grupos. No entanto, as células NK CD56^{dim} de indivíduos com LP mostram estar ativadas devido a presença de outros fatores.

Em resumo, os nossos dados evidenciam que na lesão cutânea no LP um possível fator desencadeador da resposta inflamatória será capaz de aumentar a produção de

S100A8 de queratinócitos. A proteína secretada na circulação pode ativar células com potencial citotóxico, como as células TCD8+ e células NK a participarem da reposta pro-inflamatória no sítio da lesão. As células TEM, uma vez ativadas pelo S100A8 atuam na resposta citotóxica e na produção de TNF e IL-1β enquanto as células NK CD56bright mostram um potencial desgranulador. A célula NK CD56dim mantém o seu perfil ativador e expressão de do receptor NKG2D e regula negativamente a expressão do receptor NKG2A na presença da S100A8. O perfil de resposta celular pode ainda ser intensificado na doença com a presença do LPS, carreado pelo doente por exemplo quando ocorre o prurido cutâneo. Nesse contexto, as células que participam do infiltrado na derme passam a expressar uma quantidade maior de receptores que ativam a inflamação e a via NFκB como TLR-4 e RAGE e o processo inflamatório pode prevalecer com o aumento de outro DAMP, a proteína HMGB-1 **(Figura 16).**

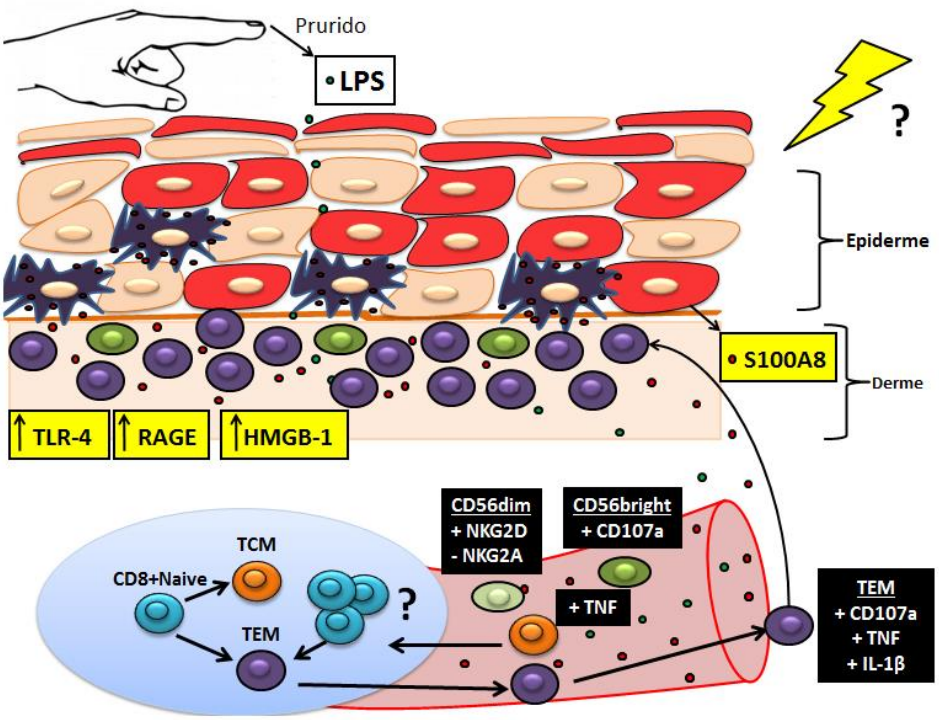


Figura 16. Representação esquemática do perfil inflamatório mediado por DAMPs, receptores pro-inflamatórios e células TCD8+ e NK no LP

Contudo, os nossos resultados destacam o papel da S100A8 como um importante DAMP que regula a atividade citotóxica nas lesões de pele, como também em sítios extra-cutâneos, como no sangue periférico nos LP pacientes. Além disso, outro DAMP, como a molécula HMGB-1 poderia atuar sinergicamente amplificando a resposta inflamatória na doença. Estes dados sugerem que S100A8 pode ser utilizado estrategicamente como imunomodulador de respostas citotóxicas, seja vacinais ou anti-tumorais.

6. Conclusão

- Os DAMPs S100A8 e HMGB-1 circulantes e nas lesões cutênas de indivíduos com LP, assim como a maior expressão dos receptores TLR-4 e RAGE na derme mostra a importância de possíveis biomarcadores na doença.

-A elevação sérica da proteína S100A8 na doença é um importante indicativo para progressão da resposta inflamatória/citotóxica em indivíduos com LP e da ativação de células tanto do sistema imune inato quanto adaptativo.

7. Anexos

ANEXO 1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:..... .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA "Análise do perfil fenotípico e funcional das células Natural killer e linfócitos T CD8+ no Líquen plano".

PESQUISADOR: Maria Notomi Sato
CARGO/FUNÇÃO: Professor Doutor INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 1690
UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Dermatologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos e 12 meses.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – **Desenho do estudo e objetivo(s):** O estudo tem como objetivo estudar e entender melhor a sua doença de pele (Líquen Plano). O Líquen plano é uma doença inflamatória crônica da pele e das mucosas. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa analisar a defesa pelas células brancas do sangue periférico em pacientes com Líquen plano.

2 – **Descrição dos procedimentos que serão realizados:** com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: serão realizados exames laboratoriais, não rotineiros, para estudar os fatores de defesa do organismo mediados pelas células brancas do sangue e em tecido de pele. Os exames serão feitos no próprio Hospital das Clínicas sem nenhum custo para o paciente, que pode aproveitar o dia das consultas para realizar a coleta de das amostras de sangue ou biópsia de pele. Os pacientes continuarão a ser acompanhados como sempre no ambulatório da dermatologia. Se houver a necessidade de mais algum exame, você poderá ser ainda convocado via telefone ou carta para vir a uma consulta, mesmo antes do seu retorno e terá todos os esclarecimentos e assistência que precisar. Todos os pacientes terão acesso aos resultados de seus exames no momento em que quiserem e com as explicações necessárias para seu entendimento.

O paciente pode em qualquer momento não concordar em fazer os exames que serão pedidos.

3 – **Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:** será realizada coleta 50 mL (dez colheres de sopa) de sangue, por punção periférica da veia do antebraço. Para coleta da amostra de pele os pacientes receberão anestesia local, e serão obtidas biópsias de pele da lesão (3mm de diâmetrto). As amostras serão enviadas para o laboratório para serem analisadas;

4 – **Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3:**

A picada da agulha pode levar a um leve desconforto que passará em poucos minutos. Um dia após pode se sentir em torno da picada uma mancha roxa que desaparece em poucos dias sem maiores problemas; em alguns pacientes será realizada a biopsia na pele sob anestesia local. Durante o procedimento da biópsia, você poderá sentir dor mínima no momento da aplicação da anestesia, parecida com uma picada de formiga. No local da biopsia, pode ocorrer uma pequena cicatriz.

5 **– Benefícios para o participante:** Não há benefício direto para o participante, pois se trata de estudo que visa analisar as células brancas do sangue periférico quanto à capacidade de inflamação em pacientes com Líquen plano.

6 – **Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar:** Você não é obrigado a realizar estes procedimentos específicos se não quiser, o que não implica que sofrerá alguma penalidade. Mesmo que não concorde em participar do estudo, terá todos os benefícios de atendimento e de informações sobre novas descobertas com relação à doença.

7 – **Garantia de acesso:** em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Maria Notomi Sato que pode ser encontrado no endereço Instituto de Medicina Tropical, Prédio II, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 500. Telefone(s) 3061-7499/3061-7457. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel.: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20. FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa;

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Análise do perfil fenotípico e funcional das células Natural killer e linfócitos T CD8+ no Líquen plano”.

Eu discuti com a Dra. Maria Notomi Sato sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os

procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/___

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

ANEXO 2

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

N° Protocolo: 0924/11

Título: ANÁLISE DO PERFIL FENOTÍPICO E FUNCIONAL DAS CÉLULAS NATURAL KILLER E LINFÓCITOS T CD8+ NO LÍQUEN PLANO

Pesquisador Responsável: Maria Notomi Sato

Pesquisador Executante: Gabriel Costa de Carvalho

Co-autores: Maria Notomi Sato, Alberto José da Silva Duarte, Valéria Aoki, Raquel Leão Orfali, Eliana Akemi Futata, Rosana Domingues.

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: DERMATOLOGIA

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA ad-referendum** em 09/05/2012, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 09 de Maio de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP
Fone: 55 11 2661-6442 ramais 16, 17, 18 e 20 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

ANEXO 3

CUTANEOUS BIOLOGY

BJD
British Journal of Dermatology

The dysfunctional innate immune response triggered by Toll-like receptor activation is restored by TLR7/TLR8 and TLR9 ligands in cutaneous lichen planus

R. Domingues, G. Costa de Carvalho, L.M. da Silva Oliveira, E. Futata Taniguchi, J.M. Zimbres, V. Aoki, A.J. da Silva Duarte and M.N. Sato

Laboratory of Dermatology and Immunodeficiencies, LIM-56, Department of Dermatology, Medical School of the University of São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 500, 3rd floor, 05403-000 São Paulo, Brazil

Correspondence
Maria Notomi Sato.
E-mail: marisato@usp.br

Accepted for publication
18 June 2014

Funding sources
No external funding.

Conflicts of interest
None declared.

R.D. and G.C.deC. contributed equally to this work.

DOI 10.1111/bjd.13214

Summary

Background Lichen planus (LP) is a chronic inflammatory mucocutaneous disease. Toll-like receptors (TLRs) bind numerous exogenous and endogenous antigens by recognizing conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and have the ability to induce the production of proinflammatory cytokines. Therefore, alterations in innate immunity could explain the inflammation and T-cell autoreactivity leading to the development of LP disease.

Objectives To evaluate how the host innate immune response to PAMPs is affected by cutaneous LP, primarily by using TLR agonists to induce proinflammatory cytokine secretion from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Methods PBMCs from patients with LP and healthy control (HC) individuals were stimulated with agonists of TLR2/TLR1 (pam3csk4), TLR3 [poly(I:C)-RIG], TLR4 (lipopolysaccharide), TLR5 (flagellin), TLR7 (imiquimod), TLR7/TLR8 (CL097) and TLR9 (CpG). Cytokines from culture supernatants ($n = 10–12$) and serum chemokines and cytokines ($n = 22–24$) were measured using flow cytometry.

Results Activation through the TLR2, TLR4 and TLR5 pathways induced increased tumour necrosis factor (TNF)-α secretion by PBMCs from individuals with LP compared with the HC group. In contrast, activation through TLR3 and TLR7 was impaired in the LP group, leading to decreased TNF-α secretion. Moreover, intracellular TLR activation resulted in reduced interleukin (IL)-1β and IL-6 secretion. Notably, individuals with LP became responders on stimulation with TLR7/TLR8 and TLR9 agonists; responses were measured as increases in interferon (IFN)-α production. Detectable TNF-α and high CXCL9 and CXCL10 serum levels were observed in patients with LP, suggesting their potential use as markers of the inflammatory status in LP.

Conclusions These findings point to a defect in the TLR signalling pathways in cutaneous LP. Agonists of TLR7/TLR8 or TLR9 overcame impaired IFN-α secretion in LP, strategically acting as adjuvants to improve the type I response.

What's already known about this topic?

- Existing information on innate immunity in lichen planus (LP) has largely come from studies of Toll-like receptor (TLR) expression in skin lesions.

 © 2014 British Association of Dermatologists

What does this study add?

- A dysfunctional innate immune response was observed with LP, as demonstrated by enhanced tumour necrosis factor responsiveness to extracellular TLR activation and an absent type I interferon (IFN) response induced by TLR3 and TLR7 agonists.
- Agonists for the TLR7/TLR8 or TLR9 pathways were able to drive IFN-α secretion, suggesting that they may serve as effective adjuvants to improve the antiviral immune response.

Lichen planus (LP) is a chronic inflammatory disease involving both the skin and mucous membranes, with characteristic violaceous polygonal flat-topped papules and plaques.[1,2] The exact pathogenesis of LP is still unclear, but there is evidence for a role for autoreactive cytotoxic T lymphocytes as effector cells, causing the destruction of keratinocytes.[3] The interrelationship between environmental stimuli and the exacerbation of the autoreactive T-lymphocyte response, which culminates in lichenoid lesions, has recently seen increased interest.[4,5] The activation of the innate immune response due to the apoptosis of keratinocytes as well as cytokine generation may lead to the activation of pattern recognition receptors.[6]

A critical role in host–microbial interactions has been described for the Toll-like receptors (TLRs), which recognize molecules containing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), leading to the rapid stimulation of the innate immune system. TLRs also sense the alarmins, or damage-associated molecular patterns (DAMPs), which are factors found in high amounts in the skin lesions of several diseases.[7,8] Ten of these receptors have been identified in humans and are localized either extracellularly to the plasma membrane (TLRs 1, 2, 4, 5, 6 and 10) or intracellularly to the endoplasmic reticulum and endosomes (TLRs 3, 7, 8, 9). These receptors are able to recognize lipoproteins (TLRs 1, 2, 6), double-stranded RNA (TLR3), single-stranded RNA (TLR7/TLR8), nonmethylated CpG motifs (TLR9), lipopolysaccharide (LPS) (TLR4) and bacterial flagellin (TLR5). On recognition of their respective PAMPs, the TLRs recruit a specific set of adaptor molecules, such as MyD88 and TRIF, and initiate downstream signalling events that lead to the secretion of inflammatory cytokines, type I interferon (IFN), chemokines and antimicrobial peptides, which all direct the magnitude of the adaptive immune response.[9]

Several studies have observed altered TLR expression in the skin lesions of oral lichen planus (OLP). Lower expression levels of both TLR1 and TLR2[4,5] and an increased ratio of TLR4 to TLR2 expression in the epithelial tissue has been detected in LP, associated with elevated levels of soluble TLR4 in the saliva.[10] Moreover, TLR4 and TLR9 expression is induced in the skin lesions of OLP.[11] Although LP has an unknown aetiology, there is a strong association between LP and viral infections, such as human hepatitis C (HCV),[12,13] or human herpes virus type 7 (HHV-7).[14] However, TLRs sensing viral antigens, such as TLR7, were found to be decreased in skin lesions independent of HCV infection.[15] Despite the altered TLR expression in LP skin lesions, the effect on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of TLR agonist activation is unknown. The use of agonists for the TLRs involved in pathogen sensing could contribute to a better understanding of the immunopathogenesis of this disease. Moreover, TLR agonists may represent potential adjuvants for vaccines and immunotherapy.[16,17]

In this study, we investigated the profile of the proinflammatory cytokine response induced by TLR2–TLR9 activation in PBMCs obtained from individuals with cutaneous LP without the involvement of the mucosa. We sought to determine the serum levels of chemokines and cytokines to understand the homing of specific subsets of immune cells to inflammatory sites such as skin lesions. Monitoring mononuclear cell responsiveness to TLR agonists may clarify the role of innate immunity in LP and T-cell autoreactivity.

Methods

Study population

The study enrolled patients with cutaneous LP ($n = 20$, 2 male, 18 female) from the Dermatology Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-FMUSP) and healthy control (HC) individuals ($n = 24$, 4 male, 20 female). The cohort of patients with LP was selected based on exclusive cutaneous form. Other forms of LP such as OLP, lichen planopilaris, or drug-induced LP, as well as association with autoimmune diseases and other skin diseases were not included in this evaluation. The majority of patients had at least two affected limbs, with papules involving up to approximately 30% of the trunk. The patients were not taking any kind of topical, or systemic corticosteroids, retinoids or immunosuppressants prior to skin biopsy and blood collection. Serological screening for hepatitis C was determined. The median age was $37{\cdot}4 \pm 13{\cdot}5$ (range 19–66) years for LP and $40{\cdot}5 \pm 14{\cdot}5$ (range 20–71) years for HC individuals. All individuals gave written informed consent, and the study protocol was approved by the institutional ethics committee of the HC-FMUSP.

© 2014 British Association of Dermatologists

Cell culture

PBMCs were isolated from heparinized venous blood by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) and diluted in RPMI medium supplemented with 10% AB human serum (Sigma, St Louis, MO, U.S.A.). PBMC cultures ($2{\cdot}0 \times 10^5$ cells/well) were incubated in 96-well plates (Costar, Cambridge, MA, U.S.A.) in medium with ligands for TLR2 (pam3csk4, 0·5 μg mL^{-1}); TLR3 [poly (I:C)-RIG, 20 ng mL^{-1}]; TLR4 (LPS, 1·25 μg mL^{-1}); TLR5 (flagellin, 0·5 ng mL^{-1}); TLR7 (imiquimod, 1·25 μg mL^{-1}); TLR7/TLR8 (CL097, 2·5 μg mL^{-1}) and TLR9 (CpG, 4 μmol L^{-1}) for 48 h at 37 °C and 5% CO_2. All ligands were obtained from InvivoGen (San Diego, CA, U.S.A.). Cell-free supernatants were harvested and stored at −70 °C until cytokine measurements were made with a cytometric bead array.

Cytokine and chemokine measurements

Supernatants obtained from PBMC cultures were measured for TNF-α, IL-1β, IL-6, IFN-α and IL-10 levels using a cytometric bead array (Becton Dickinson, San Diego, CA, U.S.A.). The limits of detection (LD) were as follows: TNF-α, 1·5 pg mL^{-1}; IL-1β, 2·3 pg mL^{-1}; IL-6, 1·6 pg mL^{-1}; IFN-α, 1·5 pg mL^{-1} and IL-10, 0·13 pg mL^{-1}. Cytokine levels in the serum were assessed using enhanced sensitivity flex (LDs: TNF, 67·3 fg mL^{-1}; IL-1β, 48·4 fg mL^{-1} and IL-10, 13·7 fg mL^{-1}). Chemokine serum levels were evaluated with a chemokine kit (LDs: CXCL8, 0·2 pg mL^{-1}; CXCL9, 2·8 pg mL^{-1}; CCL2, 2·7 pg mL^{-1} and CXCL10, 2·8 pg mL^{-1}). Samples were analysed by flow cytometry (LSRFortessa, BD, San Jose, CA, U.S.A.).

Statistical analysis

The Mann–Whitney U-test was used to compare variables between the LP and HC groups. Spearman's correlation was used to verify the relationships between TNF-α and IL-1β. $P \leq 0{\cdot}05$ was considered significant.

Results

Activation of proinflammatory cytokine secretion via Toll-like receptors in individuals with lichen planus

Activation through TLR ligands could allow us to evaluate how the host can sense the innate immune response to bacteria or viruses as well as to DAMPs, triggering the production of proinflammatory cytokines. We evaluated the ability of PBMCs from patients with LP (n = 13) and HC individuals (n = 10) to produce proinflammatory cytokines, such as TNF-α, IL-1β, IL-6 and IFN-α, following activation for 48 h with agonists for TLR2/TLR1 (pam3csk4); TLR3 [poly(I:C)-RIG]; TLR4 (LPS); TLR5 (flagellin); TLR7 (imiquimod); TLR7/TLR8 (CL097) and TLR9 (CpG).

Figure 1 shows similar baseline TNF-α secretion in PBMCs from LP and HC individuals. After activation of extracellular TLRs, including TLR2, TLR4 and TLR5, increased TNF-α secretion was detected in individuals with LP compared with the HC group. In contrast, activation through intracellular ligands, including TLR3 and TLR7, was impaired in the LP group, leading to decreased TNF-α secretion. Notably, stimulation with the TLR7/TLR8 agonist CL097 rescued the impaired TNF-α secretion, possibly via the activation of TLR8 signalling or improvement TLR7 activation. Normal TNF-α secretion was detected in the LP group following TLR9 activation.

Another prototype of proinflammatory cytokines, IL-1β, was also evaluated (Fig. 2). Similar responsiveness to TLRs 2, 4 and 5 was observed in LP and HC individuals. In contrast to TNF-α secretion, which was barely detected in PBMCs from the HC group, IL-1β production was increased following extracellular TLR activation. Again, TLR3 and TLR7 activation induced diminished levels of IL-1β secretion in patients with LP. CL097 was able to increase IL-1β secretion in LP subjects; however, IL-1β secretion remained at a lower level compared with the HC group. Activation via TLR9 induced increased levels of IL-1β in patients with LP.

We next sought to verify whether there was a correlation between the cytokines induced by TLR ligands in individuals with LP, and we found that there was a positive correlation between the TNF-α and IL-1β secretion induced by TLR7/TLR8 stimulation with CL097 ($r = 0{\cdot}77$; $P = 0{\cdot}0034$) and also between these same cytokines following TLR9 stimulation with CpG ($r = 0{\cdot}89$; $P < 0{\cdot}0001$) (Fig. 3). An association between the proinflammatory cytokines was observed only in the LP group.

IL-10 secretion was barely detected on activation of extracellular or intracellular TLRs, except for TLR4 activation, for which IL-10 secretion was significantly decreased in patients with LP compared with HC subjects (Fig. 4). Other cytokines secreted by PBMCs following stimulation with TLR agonists, such as IL-6, demonstrated increased secretion levels following stimulation with the TLR2 agonist (pam3csk4, TLR2/1) in the LP group (Fig. 4), while they were not different between the two groups following TLR4 and TLR5 stimulation (data not shown). For intracellular TLR activation with CL097 and CpG stimuli, we observed enhanced IL-6 secretion in LP subjects compared with the HC group. As expected, IFN-α secretion was induced only with CL097 in individuals with LP and was increased on TLR9 activation, although it was less pronounced than in the control group (Fig. 4).

These findings demonstrate that individuals with LP have impaired PBMC responsiveness to the activation of certain TLRs, primarily those involved with the antiviral response, such as the TLR3 and TLR7 pathways. Notably, ligands for TLR7/TLR8 and TLR9 were able to enhance cytokine secretion.

Cytokine and chemokine serum levels in lichen planus

To verify the serum cytokine levels in patients with LP, we assessed IL-1β, TNF-α, IL-10 and IFN-γ levels using a high-sensitivity cytometric bead array. Normally, cytokine levels in the serum are barely detectable, even when using an enhanced

 © 2014 British Association of Dermatologists

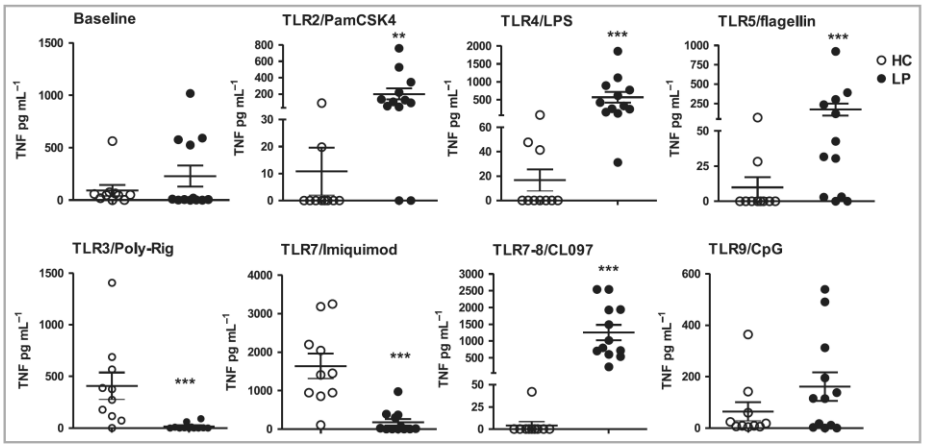


Fig 1. Dysfunctional TNF-α secretion induced by TLR agonists in LP. PBMCs obtained from patients with LP (n = 13) and HC (n = 10) were stimulated or left unstimulated (baseline) for 48 h with agonists of extracellular TLRs (TLR2, pam3csk4; TLR4, LPS; TLR5, flagellin) or intracellular TLRs [TLR3, poly(I:C)-RIG; TLR7, imiquimod; TLR7-8, CL097; TLR9, CpG]. Cell-free supernatants were assessed for TNF-α secretion with a cytometric bead array. Baseline cytokine levels were subtracted from data for stimulated cytokine induction. The results are shown as the mean ± SEM. **$P \leq 0{\cdot}01$, ***$P \leq 0{\cdot}001$ when compared with the HC group. TNF, tumour necrosis factor; TLR, Toll-like receptor; LP, lichen planus; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; HC, healthy controls; LPS, lipopolysaccharide; TLR7-8, TLR7/TLR8.

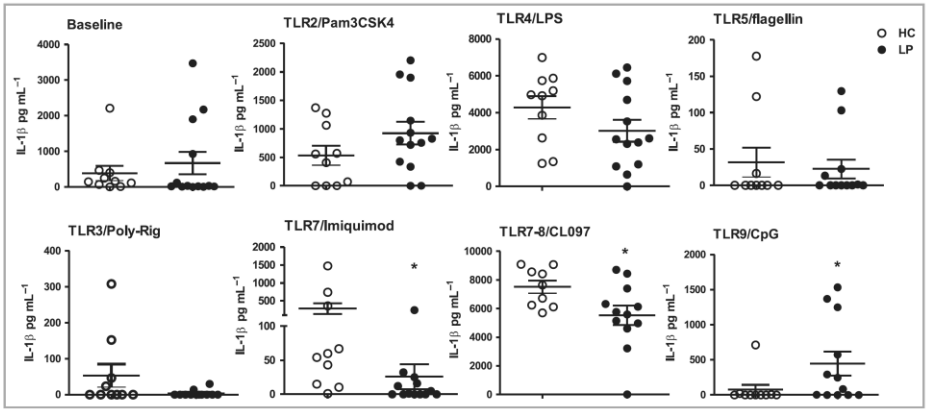


Fig 2. Profile of IL-1β secretion induced by TLR agonists in LP. PBMCs obtained from patients with LP (n = 13) and HC (n = 10) were stimulated or unstimulated (baseline) for 48 h with agonists of extracellular TLRs (TLR2, pam3csk4; TLR4, LPS; TLR5, flagellin) or intracellular TLRs [TLR3, poly(I:C)-RIG; TLR7, imiquimod; TLR7-8, CL097; TLR9, CpG]. Cell-free supernatants were assessed for IL-1β secretion by cytometric bead array. Baseline cytokine levels were subtracted from data for stimulated cytokine induction. The results are shown as the mean ± SEM. *$P \leq 0{\cdot}05$ when compared with the HC group. IL, interleukin; TLR, Toll-like receptor; LP, lichen planus; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; HC, healthy controls; LPS, lipopolysaccharide; TLR7-8, TLR7/TLR8.

sensitivity assay. Therefore, we also assessed the serum levels of CXCL10/IP-10 (inducible protein), CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG and CCL2/MCP.

Similar levels of IL-1β, TNF-α and IL-10 were detected in LP and HC individuals (Table 1). However, considering that the limit of detection of the high-sensitivity cytometric bead array for TNF was 67·3 fg mL^{-1}, TNF-α was undetectable for all HC serum samples, while 40% of LP individuals had detectable TNF-α levels. IFN-γ was undetectable in all serum samples evaluated.

© 2014 British Association of Dermatologists

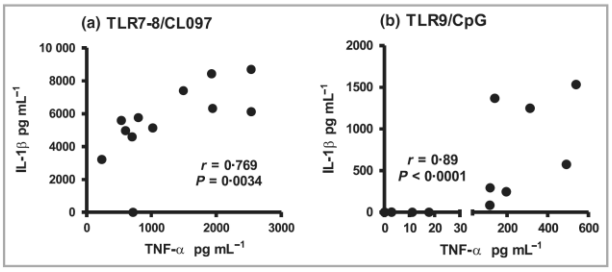


Fig 3. Correlation between TLR activation and TNF-α and IL-1β secretion in LP. Correlation between TLR7-8 (a) and TLR9 (b) activation and TNF-α and IL-1β secretion by PBMCs from individuals with LP. TLR, Toll-like receptor; TNF, tumour necrosis factor; IL, interleukin; LP, lichen planus; TLR7-8, TLR7/TLR8; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells.

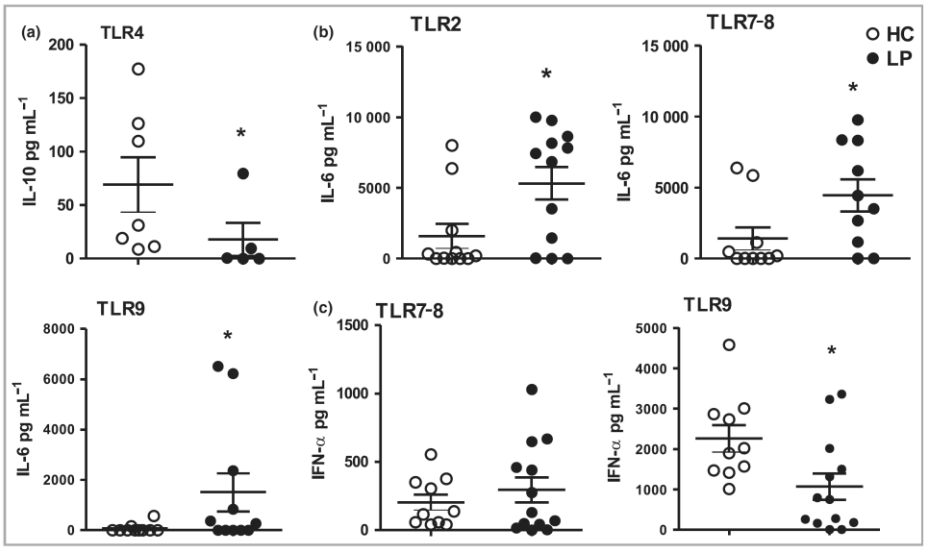


Fig 4. Activation of the TLR7-8 or TLR9 pathways elicits IL-6 and IFN-α production in individuals with LP. PBMCs obtained from patients with LP (n = 13) and HC (n = 10) were stimulated or left unstimulated (baseline) for 48 h with agonists of TLRs (TLR2–TLR9). (a) Activation of IL-10 secretion by a TLR4 agonist (LPS); (b) activation of IL-6 secretion by agonists of TLR2 (pam3csk4), TLR7-8 (CL097) and TLR9 (CpG); (c) IFN-α secretion was induced only by TLR7-8 (CL097) and TLR9 (CpG) activation. Cell-free supernatants were assessed for IL-6 and IFN-α secretion with a cytometric bead array. Baseline cytokine levels were subtracted from data for stimulated cytokine induction. The results are shown as the mean ± SEM. *$P \leq 0{\cdot}05$ when compared with the HC group. TLR, Toll-like receptor; TLR7-8, TLR7/TLR8; IL, interleukin; IFN, interferon; LP, lichen planus; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; HC, healthy controls; LPS, lipopolysaccharide.

Serum chemokines were measured at 1000-fold increased levels compared with cytokines (Table 1). Serum CCL2 and CXCL8 levels did not differ between LP and HC subjects, whereas CXCL9 and CXCL10 levels were detected at higher levels in LP than in HC individuals.

Discussion

In the present study, we verified the dysregulated innate immune response in cutaneous LP, which is triggered by extracellular or intracellular TLR activation. The altered cytokine production by PBMCs induced by TLR agonists likely plays a critical role in the inflammation that is characteristic of LP. Although LP has been recognized as an inflammatory disease that is limited to the skin and/or oral mucosa, our findings highlight an extracutaneous immunological element. Defective cytokine production induced by TLR3 or TLR7 activation was restored by ligands for TLR7/TLR8 or TLR9, indicating a role for TLR agonists as adjuvants of the innate immune response.

We observed increased TNF-α responsiveness induced by TLR2/TLR1, TLR4 and TLR5 ligands in patients with LP, but

 © 2014 British Association of Dermatologists

Table 1 Cytokines and chemokines serum levels in lichen planus (LP)

Cytokines/chemokines	HC	LP
IL-1β fg mL^{-1}	59·8 ± 72·9[a]	85·6 ± 131·0
TNF-α fg mL^{-1}	44·7 ± 55·0	88·9 ± 138·4[b]
IL-10 fg mL^{-1}	44·2 ± 35·6	36·6 ± 24·5
CCL2/MCP-1 pg mL^{-1}	30·6 ± 21·3	23·2 ± 13·0
CXCL9/MIG pg mL^{-1}	64·5 ± 53·5	212·8 ± 217·0*
CXCL8/IL-8 pg mL^{-1}	28·3 ± 35·3	10·1 ± 13·2
CXCL10/IP-10 pg mL^{-1}	59·1 ± 30·7	122·2 ± 75·7**

HC, healthy controls; IL, interleukin; TNF, tumour necrosis factor; IP, inducible protein. [a]Mean ± SD of cytokines and chemokines measurements in HC (n = 22–24) and LP (n = 17–20) samples. [b]HC below limit detection. *P = 0·013, **P = 0·004.

this responsiveness was barely detectable in the HC group. Furthermore, proinflammatory IL-1β and IL-6 were induced in considerable amounts by PBMCs activated by the pam3csk4/TLR2 interaction, which is a potent activator of the proinflammatory transcription factor NF-κB. IL-1β plays a central role in modulating adaptive effector T-cell responses by preferentially inducing T-helper (Th)1 and Th17 differentiation.[18] IL-1β is a major cytokine involved in the activation of the NALP3 inflammasome in blood monocytes to drive the release of mature IL-1β.[19,20] Activation of proinflammatory pathways in circulating blood monocytes is the gateway to enhanced inflammation in various tissues.

Increased TNF-α in parallel with the decreased IL-10 response induced by TLR4 activation in PBMCs from patients with LP may partially explain the chronic inflammatory status observed in LP. The disequilibrium of regulatory factors, such as IL-10 or peripheral regulatory T cells, must be further investigated in cutaneous LP. The chronic inflammatory status of individuals with LP may contribute to PBMC activation, leading to lymphocyte migration to skin lesions as well as to the generation of chemotactic factors.

Patients with LP also demonstrated increased CXCL9 and CXCL10 serum levels. Both chemokines are induced by IFN-γ and use the same receptor, CXCR3. CXCR3 is expressed in normal and inflamed tissue and in cells, including plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and myeloid DCs.[21,22] CXCL9 is implicated in chronic inflammation and viral infections such as herpes simplex virus type 2.[23]

CXCL10 and the CXCR3 receptor appear to contribute to the pathogenesis of many autoimmune diseases[24] and this has been suggested to be useful as a predictive marker for the management of patients with several inflammatory diseases, including chronic hepatitis C.[25] It is speculated that viral infections, such as HCV, may act as causal agents for LP. Despite the fact that anti-HCV circulating antibodies are more common in patients with LP than in controls, such an association may not be significant in some geographical areas.[13] The possibility that CXCL10 levels in patients with LP are the result of autoimmune inflammatory dermatosis or viral infection must be considered. Nevertheless, the high CXCL9/CXCL10 serum levels in patients with LP may not be attributable to HCV infection or association with an autoimmune disease, given that we found only one case of seropositivity for HCV, and autoimmune disease was considered as an exclusion criteria in our LP cohort. High CXCL10 and CXCL9 levels could be markers of the inflammatory status of cutaneous LP in the absence of autoimmune disease. Moreover, we verified that TNF-α serum levels were detectable in 40% of LP samples, while TNF-α was undetectable in all HC samples. These findings demonstrate that serum cytokine levels do not always correlate with dysfunctional cytokine production by PBMCs following TLR stimulation. However, increased TNF-α serum levels in cutaneous LP has been described mainly in female patients from a Turkish population,[26] or increased levels in patients with OLP[27] and detectable, at lower levels, in 35% of Japanese patients with OLP (nine of 26).[28] In contrast, another study demonstrated no change in TNF levels but did observe high IL-10 serum levels in OLP.[29] We used a high-sensitivity method with limits of detection at femtogram levels, and verified detectable TNF in 40% of LP samples, which corroborates with the results of OLP cases described by Yamamoto *et al.* in 1991.[28] This emphasizes the importance of evaluating not only the cytokine levels between groups, but also the frequency of detectable TNF in the study population, because it is not usually observed in healthy individuals.

In fact, TNF-α plays an important role in LP and is considered to be a susceptibility factor for OLP. The −308G/A polymorphism in the *TNF-α* gene has been described as a risk factor for patients with OLP without HCV infection.[30] Defects in the *TLR2*, *TLR4* and *CD14* genes do not appear to be associated with an OLP risk, whereas the *TLR3* gene polymorphism rs5743312 may be considered a risk factor for OLP susceptibility.[31]

Given that an association has been proposed between LP and viral infections such as HCV or HHV-7,[14] we assessed the ability of PBMCs to produce cytokines on activation of TLR3, TLR7/TLR8 and TLR9. We verified an impaired PBMC response to TLR3 and TLR7 activation in LP, with an absence of IFN-α production and decreased TNF-α and IL-1β secretion. Both TLR3 and TLR4 activate interferon regulatory factor (IRF)3 and IRF7, while TLR7 and TLR8 activate IRF5 and IRF7, which play a critical role in antiviral defence.[32] The reason for the defective TLR3/TLR7 response in LP is unknown; however, it does not appear to be attributable to a defect in IRF-7, as TLR8 and TLR9 activation leads to intense signalling. Moreover, some virus evasion may potentially suppress the factors involved in these signalling pathways. An example of this is HCV, which evades type I IFN responses by expressing the viral NS3-NS4A protease, which cleaves TRIF and IPS, suppressing type I IFN production in infected hepatocytes.[33,34]

One promising adjuvant, CL097, a derivative of the imidazoquinoline compound R848, induced noticeable results, such as promoting IFN-α and the recovery of TNF-α and IL-6 secretion in individuals with LP. Previously, we verified that TLR7/TLR8 activation was able to restore defective cytokine

© 2014 British Association of Dermatologists

secretion by myeloid DCs in a viral infection model of human immunodeficiency virus-infected pregnant women and newborns.[35] CL097, which activates both TLR7 and TLR8, may provoke the type I response via the TLR8 pathway or may potentiate impaired TLR7 responsiveness induced by the imiquimod ligand. Promotion of IFN-α secretion in LP was also achieved with CpG, the TLR9 agonist, although at lower levels than in the control group. One important source of IFN-α is pDCs, which comprise approximately 0·2–0·8% of PBMCs and secrete high levels of IFN in response to viral infections.[36] pDCs express predominantly TLR7 and TLR9, making them responsive to single-stranded RNA and CpG DNA as well as to TLR7/TLR8 ligands. Notably, LP skin exhibits increased pDC infiltration compared with nonlesional skin samples; this has been associated with HHV-7 replication,[14] suggesting an active role for pDCs in improving the antiviral immune response. Our results support a role for viral infections in the dysregulation of innate immune response, leading to an impaired antiviral response. This evidence at a systemic level can contribute to the cutaneous inflammatory process in LP, whereas the initial triggers of such disease remain elusive.

Altogether, our findings highlight the importance of evaluating the functional aspects of the TLR signalling pathways that function as gateways for PAMPs or DAMPs in cutaneous LP. Altered extracellular TLR activation leading to high TNF-α responsiveness with impaired intracellular TLR3 and TLR7 activation was observed in our patients with LP. Moreover, activation of the TLR7/TLR8 or TLR9 pathways overcame impaired IFN-α secretion, suggesting their potential use as adjuvants to improve the type I response.

Acknowledgments

We are grateful to all individuals participating in the study. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (2011/20740-3) and the Laboratório de Investigação Médica, Unidade 56 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo.

References

1 Irvine C, Irvine F, Champion RH. Long-term follow-up of lichen-planus. *Acta Dermatol Venereol* 1991; **71**:242–4.
2 Boyd AS, Neldner KH. Lichen planus. *J Am Acad Dermatol* 1991; **25**:593–619.
3 Iijima W, Ohtani H, Nakayama T *et al.* Infiltrating CD8+ T cells in oral lichen planus predominantly express CCR5 and CXCR3 and carry respective chemokine ligands RANTES/CCL5 and IP-10/CXCL10 in their cytolytic granules: a potential self-recruiting mechanism. *Am J Pathol* 2003; **163**:261–8.
4 Janardhanam SB, Prakasam S, Swaminathan VT *et al.* Differential expression of TLR-2 and TLR-4 in the epithelial cells in oral lichen planus. *Arch Oral Biol* 2012; **57**:495–502.
5 Salem SA, Abu-Zeid RM, Nada OH. Immunohistochemical study of Toll-like receptors 1 and 2 expression in cutaneous lichen planus lesions. *Arch Dermatol Res* 2013; **305**:125–31.
6 Borkowski AW, Gallo RL. UVB radiation illuminates the role of TLR3 in the epidermis. *J Invest Dermatol* 2014; **134**:2315–20.
7 Abdulahad DA, Westra J, Reefman E *et al.* High mobility group box1 (HMGB1) in relation to cutaneous inflammation in systemic lupus erythematosus (SLE). *Lupus* 2013; **22**:597–606.
8 Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ *et al.* Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest* 2012; **122**:2711–19.
9 Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; **11**:373–84.
10 Zunt SL, Burton LV, Goldblatt LI *et al.* Soluble forms of Toll-like receptor 4 are present in human saliva and modulate tumour necrosis factor-alpha secretion by macrophage-like cells. *Clin Exp Immunol* 2009; **156**:285–93.
11 Siponen M, Kauppila JH, Soini Y, Salo T. TLR4 and TLR9 are induced in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2012; **41**:741–7.
12 Sanchez-Perez J, De Castro M, Buezo GF *et al.* Lichen planus and hepatitis C virus: prevalence and clinical presentation of patients with lichen planus and hepatitis C virus infection. *Br J Dermatol* 1996; **134**:715–19.
13 Lodi G, Giuliani M, Majorana A *et al.* Lichen planus and hepatitis C virus: a multicentre study of patients with oral lesions and a systematic review. *Br J Dermatol* 2004; **151**:1172–81.
14 De Vries HJ, van Marle J, Teunissen MB *et al.* Lichen planus is associated with human herpesvirus type 7 replication and infiltration of plasmacytoid dendritic cells. *Br J Dermatol* 2006; **154**:361–4.
15 El Tawdy A, Rashed L. Downregulation of TLR-7 receptor in hepatic and non-hepatic patients with lichen planus. *Int J Dermatol* 2012; **51**:785–9.
16 Kaczanowska S, Joseph AM, Davila E. TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2013; **93**:847–63.
17 Raman VS, Bhatia A, Picone A *et al.* Applying TLR synergy in immunotherapy: implications in cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 2010; **185**:1701–10.
18 Netea MG, van der Meer JW, van Deuren M, Kullberg BJ. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends Immunol* 2003; **24**:254–8.
19 Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; **140**:821–32.
20 Church LD, Cook GP, McDermott MF. Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; **4**:34–42.
21 Cella M, Jarrossay D, Facchetti F *et al.* Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; **5**:919–23.
22 Garcia-Lopez MA, Sanchez-Madrid F, Rodriguez-Frade JM *et al.* CXCR3 chemokine receptor distribution in normal and inflamed tissues: expression on activated lymphocytes, endothelial cells, and dendritic cells. *Lab Invest* 2001; **81**:409–18.
23 Huang W, Hu K, Luo S *et al.* Herpes simplex virus type 2 infection of human epithelial cells induces CXCL9 expression and CD4+ T cell migration via activation of p38-CCAAT/enhancer-binding protein-beta pathway. *J Immunol* 2012; **188**:6247–57.
24 Antonelli A, Ferrari SM, Giuggioli D *et al.* Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2014; **13**:272–80.
25 Casrouge A, Bisiaux A, Stephen L *et al.* Discrimination of agonist and antagonist forms of CXCL10 in biological samples. *Clin Exp Immunol* 2012; **167**:137–48.
26 Erdem MT, Gulec AI, Kiziltunc A *et al.* Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha in lichen planus. *Dermatology* 2003; **207**:367–70.
27 Karagouni EE, Dotsika EN, Sklavounou A. Alteration in peripheral blood mononuclear cell function and serum cytokines in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1994; **23**:28–35.

 © 2014 British Association of Dermatologists

28 Yamamoto T, Yoneda K, Ueta E *et al.* Serum cytokine levels in patients with oral mucous membrane disorders. *J Oral Pathol Med* 1991; **20**:275–9.
29 Pekiner FN, Demirel GY, Borahan MO, Ozbayrak S. Cytokine profiles in serum of patients with oral lichen planus. *Cytokine* 2012; **60**:701–6.
30 Jin X, Wang J, Zhu L *et al.* Association between −308G/A polymorphism in TNF-alpha gene and lichen planus: a meta-analysis. *J Dermatol Sci* 2012; **68**:127–34.
31 Stanimirovic D, Zeljic K, Jankovic L *et al.* TLR2, TLR3, TLR4 and CD14 gene polymorphisms associated with oral lichen planus risk. *Eur J Oral Sci* 2013; **121**:421–6.
32 Schoenemeyer A, Barnes BJ, Mancl ME *et al.* The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *J Biol Chem* 2005; **280**:17005–12.
33 Lemon SM. Induction and evasion of innate antiviral responses by hepatitis C virus. *J Biol Chem* 2010; **285**:22741–7.
34 Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest* 2009; **119**:1745–54.
35 Cardoso EC, Pereira NZ, Mitsunari GE *et al.* TLR7/TLR8 activation restores defective cytokine secretion by myeloid dendritic cells but not by plasmacytoid dendritic cells in HIV-infected pregnant women and newborns. *PLoS ONE* 2013; **8**:e67036.
36 Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**:594–606.

© 2014 British Association of Dermatologists

ANEXO 4

Arch Dermatol Res (2015) 307:259–264
DOI 10.1007/s00403-014-1524-0

ORIGINAL PAPER

Human endogenous retrovirus expression is inversely related with the up-regulation of interferon-inducible genes in the skin of patients with lichen planus

Marcelle Almeida de Sousa Nogueira · Camila Fátima Biancardi Gavioli · Nátalli Zanete Pereira · Gabriel Costa de Carvalho · Rosana Domingues · Valéria Aoki · Maria Notomi Sato

Received: 25 April 2014 / Revised: 15 October 2014 / Accepted: 4 November 2014 / Published online: 11 November 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Lichen planus (LP) is a common inflammatory skin disease of unknown etiology. Reports of a common transactivation of quiescent human endogenous retroviruses (HERVs) support the connection of viruses to the disease. HERVs are ancient retroviral sequences in the human genome and their transcription is often deregulated in cancer and autoimmune diseases. We explored the transcriptional activity of HERV sequences as well as the antiviral restriction factor and interferon-inducible genes in the skin from LP patients and healthy control (HC) donors. The study included 13 skin biopsies from patients with LP and 12 controls. Real-time PCR assay identified significant decrease in the HERV-K *gag* and *env* mRNA expression levels in LP subjects, when compared to control group. The expressions of HERV-K18 and HERV-W *env* were also inhibited in the skin of LP patients. We observed a strong correlation between HERV-K *gag* with other HERV sequences, regardless the down-modulation of transcripts levels in LP group. In contrast, a significant up-regulation of the cytidine deaminase APOBEC 3G (apolipoprotein B mRNA-editing), and the GTPase MxA (Myxovirus resistance A) mRNA expression level was identified in the LP skin specimens. Other transcript expressions, such as the master regulator of type I interferon-dependent immune responses, STING (stimulator of interferon genes) and IRF-7 (interferon regulatory factor 7), IFN-β and the inflammassome NALP3, had increased levels in LP, when compared to HC group. Our study suggests that interferon-inducible factors, in addition to their role in innate immunity against exogenous pathogens, contribute to the immune control of HERVs. Evaluation of the balance between HERV and interferon-inducible factor expression could possibly contribute to surveillance of inflammatory/malignant status of skin diseases.

Keywords Lichen planus · Human retrovirus endogenous · Antiviral restriction factors · Interferon-inducible genes

M. A. de Sousa Nogueira and C. F. Biancardi Gavioli contributed equally to this work.

M. A. de Sousa Nogueira · C. F. Biancardi Gavioli · V. Aoki
Dermatological Outpatient Clinic, Hospital das Clínicas, Medical School of the University of São Paulo, São Paulo, Brazil

N. Z. Pereira · G. C. de Carvalho · R. Domingues · M. N. Sato (✉)
Department of Dermatology, Laboratory of Dermatology and Immunodeficiencies, LIM-56, Medical School of the University of São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 500, 3rd floor, São Paulo 05403-000, Brazil
e-mail: marisato@usp.br

Introduction

Lichen planus (LP) is an inflammatory skin disease with a chronic course that affects skin, mucous membranes, scalp (resulting in alopecia) and nails [6, 28, 32]. Prevalence of LP in the total population varies from 0.5 to 1.0 %. It usually occurs at 30–60 years of age, with no gender or racial preference. LP is characterized by lichenoid, polygonal, violaceous papules with fine white lines [32].

The etiology of LP is still unclear, although possible causes include genetic predisposition, combined with environmental triggers, such as viral and bacterial agents. Viral infections maybe associated with LP, such as human herpesvirus type 7 (HHV-7) [7] or human hepatitis C (HCV) [18].

The genome of vertebrates contains human endogenous retroviruses (HERVs) [28], which are implicated certain

skin diseases (psoriasis [5, 22], scleroderma [14], or melanoma). Human chromosomes contain numerous HERV sequences that account up to 8 % of our genome [12]. HERVs integrated into the human genome following ancient germline infections by exogenous retroviruses around 2–40 million years ago, and persisted through successive generations. Most HERV sequences are defective due to mutations, deletions or termination signals within coding sequences, and are not infectious [12].

Over 20 HERV families have been identified [4]. HERVs contain four major genes: *gag* (determines the core structure); *pro* (protease gene which contains reverse transcriptase); *pol* (responsible for viral replication); and *env* (envelope proteins), flanked by two long terminal repeat (LTR) regions [3]. HERV-K family of endogenous retroviruses is probably the most recently incorporated, with some inserts having occurred after the rise of hominids [8].

HERVs are also frequently silenced by epigenetic mechanisms as DNA methylation [20]. Moreover, HERVs are inhibited by a variety of restriction factors such as APOBEC family [9, 16]. APOBEC (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like) comprises a group of cytidine deaminases that are able to edit DNA and/or RNA sequence. APOBEC3G, by editing viral genetic material, provides an ancestral wide cellular defense against exogenous viruses and endogenous retroelements. The myxovirus resistance A (MxA) is an interferon-induced dynamin-like GTPase that acts as a cell-autonomous host restriction factor against many viral pathogens [10]. These factors are induced by type I IFNs (IFN-α and IFN-β), involving STING (stimulator of interferon genes) that regulates innate immune signaling processes and is able to activate both NF-κB and interferon regulatory factor (IRF-3) transcription pathways exerting a potent antiviral state following expression [13]. NALP3 inflammasome, an innate immune complex that controls inflammatory caspase 1 and IL-1β activation, is a sensor for cytosolic detection of DNA and RNA viruses, leading to activation of pro-inflammatory cytokines [1].

Abnormal expression of HERV-K is present in various autoimmune [11, 23] and inflammatory diseases, as follows: [20] in psoriatic lesions, 3 variants (W, K, E) of HERV are expressed [22]; in melanoma tissue, retrovirus-like particles and HERV-K mRNA and proteins have been detected; [29] in morphea, there is altered pattern of HERV expression; [19] HERV-W transcription levels in mycosis fungoides, but negative expression in lichen planus. However, to date, analyses of HERV expression in the skin of individuals diagnosed with LP are scarce.

In this study, we investigated the profile of HERV-K *gag* and *env*, HERV-K18 and HERV-W *env* in skin specimens of LP patients. We also proposed to determine the expression of antiviral restriction factors such as APOBEC 3G and MxA, and interferon stimulatory genes (ISG), including STING, IRF-7, IFN-β, as well as inflammassome NALP3. The surveillance of HERV and antiviral factors expression in skin lesions of patients with LP may contribute to a better understanding of the inflammatory status and T cell autoreactivity.

Materials and methods

Patients

Surgical biopsies of lesional skin were obtained from 13 patients (10 women and 3 men; median age 42 ± 14.8, range 23–61 years) with cutaneous lichen planus, recruited at the Dermatology Clinic at the Hospital das Clinicas of São Paulo. Healthy controls ($n = 12$) were donors for skin biopsies (7 women and 4 men; median age: 39 ± 12, range 21–54 years). All experiments were approved by the local medical ethics committee prior to the study and written informed consent was given by all patients before inclusion. We included patients with cutaneous LP who were aged ≥18 years, confirmed by biopsy with or without mucosal lesions. Exclusion criteria included melanoma, autoimmune diseases and use of immunosuppressive medication. Serological status of LP patients for cytomegalovirus (CMV), hepatitis A virus (HAV), hepatitis B virus (HBV), HCV, herpes simplex virus (HSV), varicella-zoster virus (VZV), Epstein–Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV) was determined.

Real-time polymerase chain reaction

One punch biopsy (6 mm) was performed on skin lesions after local anesthesia. Samples were stored with RNA later solution (Sigma, CA, U.S.A.) at −20 °C. Frozen samples were processed and the tissue was homogenized with a Tissue Ruptor (Qiagen). After removal of debris by centrifugation, supernatants were used for RNA extraction. Total RNA was extracted from skin biopsy with an RNeasyPlus Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Reverse transcription was performed with a Reverse Transcriptase Kit (Biorad). The primers utilized for the real-time PCR assay were:

APOBEC 3G: forward GGCTCCACATAAACACGGT TTC,
reverse: AAGGGAATCACGTCCAGGAA;
MxA: forward: AGCTGATCCGCCTCCACTT,
reverse: TGCAATGCACCCCTGTATACC;
IFN-β: forward: GGCTGGCCCTGTGATATTTCTGTG,
reverse: ACCTGGCTCTCCTCCTCCCTTCCT;

STING: forward: ATATCTGCGGCTGATCCTGC, reverse: GGTCTGCTGGGGCAGTTTAT;
NALP3: forward: GGCATATCACGTGGGATTC, reverse: GATCTTCGCTGCGATCAAC;
IRF-7: forward: TGGTCCTGGTGAAGCTGGAA, reverse: GATGTCGTCATAGAGGCTGTTG
HERV-K (gag): forward: GTAATGGCTCAGTCAA CGCA, reverse: GCCCCATTAATTCTGGACCT
HERV-K (env): forward: GTGACACAAACCCCAGA GAGT, reverse: GGTTTGGCAGGGCAGTGA
HERV-K18: forward: CCCAAGGAAATTCCTAAAG GATCAAAG, reverse: GAGGTTGTGATACCGCCAAT
HERV-W 18: forward: TCATATCTAAGCCCCG CAAC, reverse: GAGGTTGTGATACCGCCAAT
GAPDH: forward: GAAGGTGAAGGTCGGAGT, reverse: GAAGATGGTGATGGGATTTC

Real-time qPCR was performed in an Applied Biosystems 7500 Fast system using specific primers and SYBRGreen (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), as described by Pereira et al. [25]. Primers for qPCR (Life Technologies) were only accepted if their efficiency was 100 ± 10 %. Corrections were made for primer efficiency. The specificity of the reaction was examined by dissociation curve. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA levels of the samples in the same plate were analyzed to normalize the mRNA contents among the samples tested. The cycling protocol consisted of 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C. The amplification results were analyzed using Sequence Detection System (SDS) software (Applied Biosystems). Normalized expression was calculated following the indications of Livak et al. [17].

Statistical analysis

The Mann–Whitney *U* test was used to compare variables between LP and healthy controls. Spearman's correlation was used to investigate the relationships between HERV-K gag with other HERVs. A value of $p \leq 0.05$ was considered significant.

Result

Thirteen LP patients were included, with a median disease duration of 5.0 months (range 1–60 months). Two patients were seropositive for HCV and none for HBV. Previous infection with HSV and CMV was found in 9/9 patients, 5/5 for HAV and 8/9 patients had EBV infection.

To evaluate the HERV expression in skin fragments of LP patients, we selected HERV-K *gag* and *env*, HERV-K18 and HERV-W *env* genes to assess by qPCR, in comparison to HC.

Figure 1 shows that mRNA expression of HERV-K genes as *gag* or *env*, HERV-K18 and HERV-W *env* was down-modulated in LP subjects, when compared to HC. HERV expression in HC group was higher for HERV-K *gag*, followed by HERV-K *env*, and similar levels were detected for HERV-K18 and HERV-W *env*. In addition, strong correlation between HERV-K *gag* and HERV-K *env*, HERV-18 and HERV-W *env* was verified for both HC and LP (Fig. 2). In contrast, no correlation was observed between HERV-K *gag* and APOBEC 3G, in both analyzed groups.

We also verified the expression of two antiviral restriction factor (APOBEC 3G and MxA), and the genes involved in their regulation, related to type I IFN axis (STING, IRF-7 and IFN-β), including the inflammassome NALP3.

The levels of antiviral restriction transcription factor (APOBEC 3G and MxA), the IFN-inducible genes STING, IRF-7, IFN-β and NALP3 were higher in the skin of LP patients, when compared to HC subjects (Fig. 3).

Discussion

Our findings showed a down-regulation of endogenous retrovirus expression in skin biopsies of LP patients, in comparison to healthy controls. In parallel, we detected an induction of antiviral restriction genes (APOBEC 3G and MxA), as well as the IFN-inducible genes, that together, may exert an immune control of HERVs transcripts activation.

Endogenous retroviruses may also be deleterious for their host and often seen during carcinogenesis and in autoimmune diseases; however, it remains unclear whether its increased expression is cause or consequence of the disease. In diseases with a multifactorial etiology, such as pityriasis rosea or LP, the trigger can be explained by a common transactivation of a quiescent HERV [26].

In this study, we faced an unexpected inhibition of HERV-K *env* or *gag*, HERV-K18 and HERV-W *env* in skin biopsies of LP subjects. These findings revealed an active regulatory mechanism controlling HERVs transcripts in the skin lesions. A differential HERV sequence expression has been described in skin of morphea patients, in which HERV-K *env* was up-regulated, with decreased transcription for HERV-H *env*, HERV-K10 *gag*, HERV-R *pol-env*, and HERV-W *env* [14]. The coexistence of up- and down-regulating process in morphea may be linked to the lowered number of sebaceous gland [14]. Moreover, in LP, the expression of Syncytin-1, which is encoded by HERV-W env, was not detected [19].

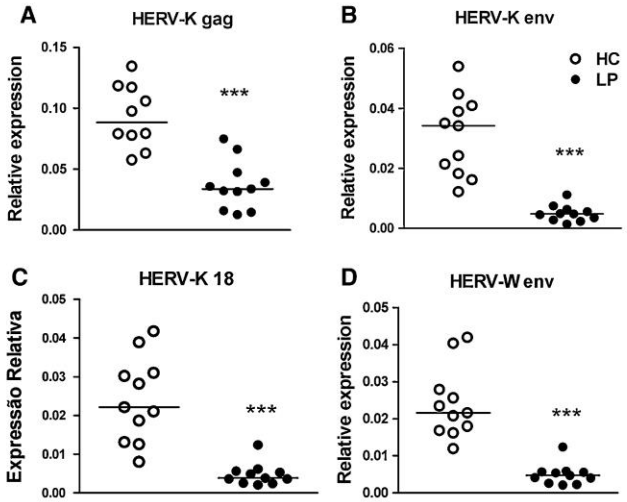


Fig. 1 Inhibition of HERV mRNA expression levels in skin from LP patients. The mRNA expression levels of HERV, such as HERV-K *gag* (**a**), HERV-K *env* (**b**), HERV-K 18 (**c**) and HERV-W *env* (**d**) from skin of healthy control (HC, $n = 11$) and Lichen planus (LP, $n = 12$), were assessed by real-time PCR. The data represent median values. $***p \leq 0.001$ compared with the healthy control group

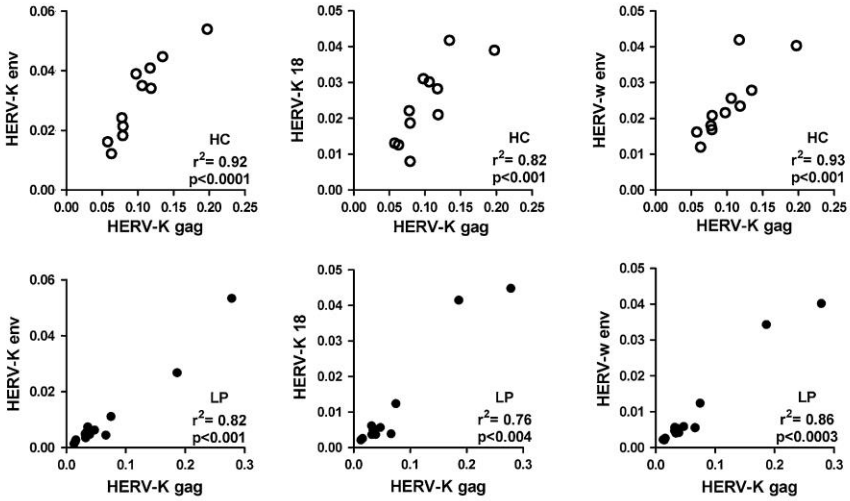


Fig. 2 Correlation between HERV-K *gag* expression and HERV–K *env*, HERV-K18, and HERV-W *env* in LP and HC groups

Some possibilities to explain the down-regulation of HERV in LP skin could be due to the increased levels of cytidine deaminase, APOBEC 3G and also MxA. APOBEC3G might protect the mammalian genome against the spread of some retroelements, since it can bind either to single-stranded DNA (ssDNA) or RNA, and to insert mutations into ssDNA and/or RNA as a result of their ability to deaminate C to U [20]. The genome of endogenous retroviruses is generally methylated and not expressed in most somatic cells [3], where APOBEC3G is abundantly expressed [21]. Loss of methylation may result in activation of HERV proviruses [20]. Therefore, it is possible that the hypermethylation of HERV LTR contributes to inhibition of HERV in LP skin.

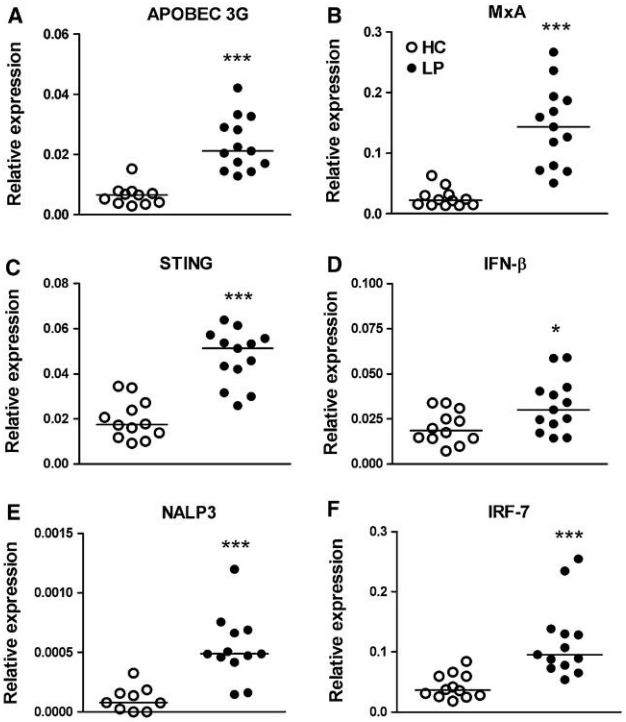


Fig. 3 Up-regulation of mRNA expression of antiviral restriction factors and interferon-inducible genes in skin from LP patients. The mRNA expression levels of antiviral restriction factor: APOBEC 3 G (**a**) and MxA (**b**) and interferon-inducible factors, STING (**c**), IRF-7 (**d**), IFN-β (**e**) and NALP3 (**f**) of skin from healthy control (HC, $n = 11$) and Lichen planus (LP, $n = 14$) individuals were assessed by real-time PCR. The data represent median values. $^{*}p \leq 0.05$, $^{***}p \leq 0.001$ compared with the control group

It has been described higher level of MxA expression in LP skin, which was significantly higher in HCV-positive than in HCV-negative patients [27]. The role of MxA expression to control HERV is unknown. It is a key mediator of the interferon-induced antiviral response against a wide range of viruses, in turn, interferon may induce the expression of more than 300 ISGs. We selected some ISG as STING, IRF-7, IFN-β and NALP3, and all factors were up-regulated in LP skin. These factors suggest the existence of an important innate immune platform for sensing viral infections.

A complex regulatory mechanism related with type I IFN axis seems to be highly active in LP. One important source of IFN-α is pDC, which secretes high levels of IFN in response to viral infections. Notably, LP skin exhibits increased pDC infiltration, when compared to non-lesional skin samples, and has been associated with HHV-7 replication [7].

In our LP cohort, we observed high prevalence for some virus infections (CMV, EBV, and HSV), but not for HCV, the usual association. These pathogens are able to trigger HERV transcription, and HCMV infection induces HERV transcriptional activity in different cell types [2]; HSV-1 can specifically activate the HERV-W LTR, and induce expression of HERV-W Gag and Env proteins in cell lines [15]. EBV induces transcription of the *env* gene of HERV-K18 [30], as well as human herpesvirus 6A and 6B [31]. It is possible that viral infection in LP subjects could be the initial target to induce IFN-type I signaling pathway, leading to regulation of activation of HERV transcriptional level.

Despite the protective role of the type I IFN in antiviral response, this overproduction can provoke autoimmune disease [24], due to the inflammatory cytokines production, though NFκB or NALP3 inflammassome activation. It is not known whether the up-regulation of these molecules could contribute to the inflammatory status in LP, despite immune response to HERVs transcription.

Altogether, our findings suggest that interferon-inducible factors/antiviral restriction factors may regulate endogenous retrovirus transcription levels in patients with cutaneous LP.

Acknowledgments We are grateful to all individuals who participated in the study. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (2011/20740-3) and the Laboratório de Investigação Médica, Unidade 56 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo.

Conflict of interest None declared.

References

1. Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, Guthrie EH, Pickles RJ, Ting JP (2009) The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. Immunity 30:556–565
2. Assinger A, Yaiw KC, Gottesdorfer I, Leib-Mosch C, Soderberg-Naucler C (2013) Human cytomegalovirus (HCMV) induces human endogenous retrovirus (HERV) transcription. Retrovirology 10:132
3. Bannert N, Kurth R (2004) Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. Proc Natl Acad Sci USA 101:14572–14579
4. Belshaw R, Katzourakis A, Paces J, Burt A, Tristem M (2005) High copy number in human endogenous retrovirus families is associated with copying mechanisms in addition to reinfection. Mol Biol Evol 22:814–817
5. Bessis D, Moles JP, Basset-Seguin N, Tesniere A, Arpin C, Guilhou JJ (2004) Differential expression of a human endogenous retrovirus E transmembrane envelope glycoprotein in normal, psoriatic and atopic dermatitis human skin. Br J Dermatol 151:737–745
6. Crincoli V, Di Bisceglie MB, Scivetti M, Lucchese A, Tecco S, Festa F (2011) Oral lichen planus: update on etiopathogenesis, diagnosis and treatment. Immunopharmacol Immunotoxicol 33:11–20
7. De Vries HJ, van Marle J, Teunissen MB, Picavet D, Zorgdrager F, Bos JD, Weel J, Cornelissen M (2006) Lichen planus is associated with human herpesvirus type 7 replication and infiltration of plasmacytoid dendritic cells. Br J Dermatol 154:361–364
8. Dewannieux M, Blaise S, Heidmann T (2005) Identification of a functional envelope protein from the HERV-K family of human endogenous retroviruses. J Virol 79:15573–15577
9. Esnault C, Heidmann O, Delebecque F, Dewannieux M, Ribet D, Hance AJ, Heidmann T, Schwartz O (2005) APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. Nature 433:430–433
10. Gao S, von der Malsburg A, Dick A, Faelber K, Schroder GF, Haller O, Kochs G, Daumke O (2011) Structure of myxovirus resistance protein a reveals intra- and intermolecular domain interactions required for the antiviral function. Immunity 35:514–525
11. Garcia-Montojo M, de la Hera B, Varade J, de la Encarnacion A, Camacho I, Dominguez-Mozo M, Arias-Leal A, Garcia-Martinez A, Casanova I, Izquierdo G, Lucas M, Fedetz M, Alcina A, Arroyo R, Matesanz F, Urcelay E, Alvarez-Lafuente R (2014) HERV-W polymorphism in chromosome X is associated with multiple sclerosis risk and with differential expression of MSRV. Retrovirology 11:2
12. Hohn O, Hanke K, Bannert N (2013) HERV-K (HML-2), the best preserved family of HERVs: endogenization, expression, and implications in health and disease. Front Oncol 3:246
13. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN (2009) STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. Nature 461:788–792
14. Kowalczyk MJ, Danczak-Pazdrowska A, Szramka-Pawlak B, Zaba R, Silny W, Osmola-Mankowska A (2012) Expression of selected human endogenous retroviral sequences in skin and peripheral blood mononuclear cells in morphea. Arch Med Sci 8:819–825
15. Lee WJ, Kwun HJ, Jang KL (2003) Analysis of transcriptional regulatory sequences in the human endogenous retrovirus W long terminal repeat. J Gen Virol 84:2229–2235
16. Lee YN, Malim MH, Bieniasz PD (2008) Hypermutation of an ancient human retrovirus by APOBEC3G. J Virol 82:8762–8770
17. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25:402–408
18. Lodi G, Giuliani M, Majorana A, Sardella A, Bez C, Demarosi F, Carrassi A (2004) Lichen planus and hepatitis C virus: a multicentre study of patients with oral lesions and a systematic review. Br J Dermatol 151:1172–1181
19. Maliniemi P, Vincendeau M, Mayer J, Frank O, Hahtola S, Karenko L, Carlsson E, Mallet F, Seifarth W, Leib-Mosch C, Ranki A (2013) Expression of human endogenous retrovirus-w including syncytin-1 in cutaneous T-cell lymphoma. PLoS One 8(10):e76281
20. Manghera M, Douville RN (2013) Endogenous retrovirus-K promoter: a landing strip for inflammatory transcription factors? Retrovirology 10:16
21. Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, Konig R, Bollman B, Munk C, Nymark-McMahon H, Landau NR (2003) Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. Cell 114(1):21–31
22. Moles JP, Tesniere A, Guilhou JJ (2005) A new endogenous retroviral sequence is expressed in skin of patients with psoriasis. Br J Dermatol 153:83–89
23. Moyes DL, Martin A, Sawcer S, Temperton N, Worthington J, Griffiths DJ, Venables PJ (2005) The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease. Genomics 86:337–341
24. Nagata S, Hanayama R, Kawane K (2010) Autoimmunity and the clearance of dead cells. Cell 140:619–630
25. Pereira NZ, Cardoso EC, Oliveira LM, de Lima JF, Branco AC, Ruocco RM, Zugaib M, de Oliveira Filho JB, Duarte AJ, Sato MN (2013) Upregulation of innate antiviral restricting factor expression in the cord blood and decidual tissue of HIV-infected mothers. PLoS One 8(12):e84917
26. Rebora A (2005) Human endogenous retroviruses and their possible impact on dermatology. J Am Acad Dermatol 52(5):E7
27. Shaker OG, Hantar N, El-Tahlawi S, El-Tawdi A, El-Hadidi H, Hantar S, El-Refai A, William R (2009) Detection of myxovirus resistance protein A in lichen planus lesions and its relationship to hepatitis C virus. Br J Dermatol 160:980–983
28. Sharma A, Bialynicki-Birula R, Schwartz RA, Janniger CK (2012) Lichen planus: an update and review. Cutis 90:17–23
29. Singh S, Kaye S, Gore ME, McClure MO, Bunker CB (2009) The role of human endogenous retroviruses in melanoma. Br J Dermatol 161:1225–1231
30. Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT (2001) Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. Immunity 15:579–589
31. Turcanova VL, Bundgaard B, Hollsberg P (2009) Human herpesvirus-6B induces expression of the human endogenous retrovirus K18-encoded superantigen. J Clin Virol 46:15–19
32. Wagner G, Rose C, Sachse MM (2013) Clinical variants of lichen planus. J Dtsch Dermatol Ges 11:309–319

ANEXO 5

Tabela 2. Sorologia para vírus dos indivíduos com LP

Sorologias	LP	
	(n)	%
CMV	12	66
VHA	10	55
VHB	0	0
VHC	2	11
HSV 1/2	6	33
VEB	9	50

LP=Líquen plano, CMV=Citomegalovírus, VHA= Vírus da Hepatite A, VHB= Vírus da Hepatite B, VHC= Vírus da Hepatite C, HSV 1/2= Herpes simples vírus tipo 1 e 2, VEB= Vírus Epstein-Baar.

Tabela 3. Dados clínicos de indivíduos com LP

Nome	Idade	Sexo	Tempo de Doença (meses)	Exposição solar	Vacinação recente	Prurido	Sintomas oculares	Disfagia	Exame físico (boca)
Pac 1	66	F	36	ATÉ INÍCIO DA VIDA ADULTA ERA FREQUENTE.	NAO	SIM	NAO	NAO	NAO
Pac 2	37	F	6	PROLONGADA POR APROXIMADAMENTE 25 ANOS	NAO	SIM	NAO	NAO	NAO
Pac 3	59	F	60	RARAMENTE.	INFLUENZA HÁ 3 MESES	SIM	NAO	NAO	SIM (ESTRIAS DE WICKHAM)
Pac 4	23	M	1	FREQUENTE	INFLUENZA Á 6 MESES	SIM	NAO	NAO	ARBORIFORMES NA MUCOSA JUGAL BILATERAL
Pac 5	25	F	6	POUCA.	NAO	SIM	NAO	NAO	NAO
Pac 6	34	F	6	FREQUENTE DURANTE 10 ANOS.	NAO	SIM	NAO	NAO	NAO
Pac 7	28	F	3	RARAMENTE.	NAO	SIM	NAO	NAO	NAO
Pac 8	51	F	7	FREQUENTE	NAO	SIM	NAO	RARAMENTE	ARBORIFORMES NA MUCOSA JUGAL BILATERAL
Pac 9	61	F	4	RARAMENTE.	INFLUENZA	SIM	NAO	NAO	ARBORIFORMES NA MUCOSA JUGAL BILATERAL
Pac 10	41	F	2	RARAMENTE.	NAO	SIM	NAO	NAO	ARBORIFORMES NA MUCOSA JUGAL BILATERAL
Pac 11	55	M	6	RARAMENTE.	HEPATITE B + TÉTANO, HÁ 1 MÊS.	NAO	NAO	NAO	NAO
Pac 12	60	M	3	FREQUENTE	NAO	SIM	NAO	NAO	NAO
Pac 13	53	F	4	FREQUENTE, ATÉ OS 35 ANOS.	HEPATITE B, HÁ 2 ANOS.	SIM	NAO	NAO	LESÕES LIQUENÓIDES
Pac 14	48	F	2	PROLONGADA ATÉ A ADOLESCÊNCIA. HOJE, RARAMENTE.	NAO	SIM	NAO	NAO	ARBORIFORMES NA MUCOSA JUGAL BILATERAL

Nome	Exame físico (genital)	Exame físico (pele)	Topografia das lesões	Anatomopatológico (topografia
Pac 1	NAO	TÍPICO	PUNHO ESQ, PERNA ESQ	Antebraço esquerdo
Pac 2	NAO	TÍPICO	PUNHOS	Punho esquerdo
Pac 3	NAO	TÍPICO	RAIZES DAS COXAS, INFRAMAMARIAS, AXILARES	Coxa direita
Pac 4	PÁPULAS VIOLÁCEAS NA GLANDE E PREPÚCIO	TÍPICO	INTERESCAPULAR, FLANCOS, PUNHOS, FACE INTERNA DAS COXAS, FACE INTERNA DAS PERNAS	Antebraço esquerdo
Pac 5	NAO	TÍPICO	TRONCO ANTERIOR E POSTERIOR, JOELHOS E TORNOZELOS	Dorso
Pac 6	NAO	TÍPICO	PUNHOS, MMSS, ABDOME INFERIOR, SACRAL	Antebraço esquerdo
Pac 7	NAO	TÍPICO	PUNHOS, TORNOZELOS, SACRAL	Dorso pé D
Pac 8	PÁPULAS VIOLÁCEAS NA VULVA	TÍPICO	PUNHOS, ANTEBRAÇOS, ABDOME INFERIOR, RAIZES DAS COXAS.	Lombar
Pac 9	NAO	TÍPICO	PUNHOS, COXAS (ANTERIOR E POSTERIOR), PERNAS (ANTERIOR E POSTERIOR).	Punho esquerdo
Pac 10		HIPERTRÓFICAS	PRÉ TIBIAL ESQUERDA	NAO REALIZADO
Pac 11	NAO	TÍPICO	PUNHOS, ANTEBRAÇOS, FACE INTERNA DAS COXAS	Antebraço direito
Pac 12	NAO	TÍPICO	PUNHOS, MMSS, FLANCOS, COXAS.	Tronco à D
Pac 13	NAO	TÍPICAS	PUNHOS, MMSS, FLANCOS, COXAS, MMII	Antebraço esquerdo
Pac 14	NAO	TÍPICAS	PUNHOS, AXILAS, FACE INTERNA DAS COXAS, INFRAMAMÁRIA.	

Tabela 4. Exames Laboratoriais de indivíduos com LP

Nome	TGO	TGP	ANTI-RO	ANTI-LA	CREATININA	FAN	FIBRINOGÊNIO	HEMOGLOBINA	HEMATÓCRITO	LEUCÓCITOS TOTAIS	SEGMENTADOS
Pac 1	16	13	NEGATIVO	NEGATIVO	0,75	NEGATIVO	323	12,5	36,3	7970	4570
Pac 2	15	8	NEGATIVO	NEGATIVO	0,75	NEGATIVO	349	14	41,9	5480	3850
Pac 3	32	38	NAO REALIZADO	NAO REALIZADO	0,99	NAO REALIZADO	461	13,1	38,9	7100	4490
Pac 4	33	31	NEGATIVO	NEGATIVO	1,24	NEGATIVO	294	16,2	45,9	6890	4170
Pac 5	17	10	NEGATIVO	NEGATIVO	1,26	NEGATIVO	NAO REALIZADO	10,5	32,1	8950	6980
Pac 6	20	17	NEGATIVO	NEGATIVO	0,82	NEGATIVO	NAO REALIZADO	13,7	40,2	6550	4140
Pac 8	36	37	NEGATIVO	NEGATIVO	0,81	NEGATIVO	372	11,4	35,5	4200	1130
Pac 9	12	16	NEGATIVO	NEGATIVO	0,7	NEGATIVO	NAO REALIZADO	13,8	43,1	9010	4760
Pac 10	23	15	NEGATIVO	NEGATIVO	0,74	NEGATIVO	NAO REALIZADO	13,2	37,5	7560	5070
Pac 11	125	263	NAO REALIZADO	NAO REALIZADO	1,02	NAO REALIZADO	NAO REALIZADO	13,7	38,3	5940	3040
Pac 12	17	21	NEGATIVO	NEGATIVO	0,89	NEGATIVO	295	15,2	45,3	3960	2290

Nome	EOSINÓFILOS	LINFÓCITOS	BASÓFILOS	PLAQUETAS	HDL	COLESTEROL TOTAL	TRIGLICERÍDEOS	VLDL	LDL	PCR	T3	T4 LIVRE	TSH	URÉIA
Pac 1	170	2670	20	186	48	141	116	23	70	7,9	107	1,3	1,81	32
Pac 2	140	1090	20	229	61	168	72	14	93	1,2	132	1,24	3,23	22
Pac 3	110	2090	10	229	48	270	152	30	192	2,8	132	1,12	1,88	51
Pac 4	140	1960	40	227	43	145	56	11	91	0,3	135	1,55	1,35	47
Pac 5	90	1410	20	329	51	122	120	24	47	13,5	126	1,25	3,9	29
Pac 6	200	1690	30	245						2,4	186	1,2	1,7	28
Pac 8	300	2360	40	372	62	179	123	25	92	1,9	128	0,87	0,67	34
Pac 9	500	3090	70	242	43	185	137	27	115	8,8	161	1,18	3,47	46
Pac 10	140	1820	20	172	35	224	199	40	149	4	121	1,22	6,36	31
Pac 11	150	2070	10	186	43	169	152	30	96	0,7		1,6	5,49	42
Pac 12	100	1230	20	227	46	169	152	30	93	1,4		1,37	1,8	23

8. Referências

1. Boyd AS, Neldner KH. Lichen planus. J Am Acad Dermatol. 1991;25(4):593-619.
2. Rashtak S, Pittelkow MR. Skin involvement in systemic autoimmune diseases. Curr Dir Autoimmun. 2008;10:344-58.
3. Crowe DR, Mutasim DF. Lichen planus mimicking seborrheic keratoses. Int J Dermatol. 2011;50(6):720-1.
4. Bhattacharya M, Kaur I, Kumar B. Lichen planus: a clinical and epidemiological study. J Dermatol. 2000;27(9):576-82.
5. Scully C, Beyli M, Ferreiro MC, Ficarra G, Gill Y, Griffiths M, et al. Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. Crit Rev Oral Biol Med. 1998;9(1):86-122.
6. Irvine C, Irvine F, Champion RH. Long-term follow-up of lichen planus. Acta Derm Venereol. 1991;71(3):242-4.
7. Wagner G, Rose C, Sachse MM. Clinical variants of lichen planus. J Dtsch Dermatol Ges. 2013;11(4):309-19.
8. Carrozzo M, Pellicano R. Lichen planus and hepatitis C virus infection: an updated critical review. Minerva Gastroenterol Dietol. 2008;54(1):65-74.
9. Carrozzo M, Thorpe R. Oral lichen planus: a review. Minerva Stomatol. 2009;58(10):519-37.
10. Huber MA. Oral lichen planus. Quintessence Int. 2004;35(9):731-52.
11. Lehman JS, Tollefson MM, Gibson LE. lesional tissues and peripheral blood monocytes of patients with oral lichen. Int J Dermatol 2009; 48: 682–94.
12. Ismail SB, Kumar SK, Zain RB. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. J Oral Sci. 2007;49(2):89-106.
13. Walton KE, Bowers EV, Drolet BA, Holland KE. Childhood lichen planus: demographics of a U.S. population. Pediatr Dermatol. 2010;27(1):34-8.

14. Norris DA. Cytokine modulation of adhesion molecules in the regulation of immunologic cytotoxicity of epidermal targets. J Invest Dermatol. 1990;95(6 Suppl):111S-20S

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

16. Le Cleach, Laurence, Olivier C. Lichen planus. New Eng Journ of Medic 2012; 66:(8) 723-732

17. Carbone T, Nasorri F, Pennino D et al CD56 highCD16 – NK cell involvement in cutaneous lichen planus. Eur J Dermatol. 2010; 20:724–730

18. Sklavounou-Andrikopoulou A, Chrysomali E, Iakovou M, Garinis GA, Karameris A. Elevated serum levels of the apoptosis related molecules TNF-alpha, Fas/Apo-1 and Bcl-2 in oral lichen planus. J Oral Pathol Med. 2004;33(7):386-90.

19. Shin, J., Seo, J. M., Oh, S., Cho, S. D., & Lee, K. E. Myeloid cell leukemia-1 is a molecular indicator for malignant transformation of oral lichen planus. Oncology Letters, 2016; 11(2), 1603-1607.

20. Sugerman PB, Savage NW. Oral lichen planus: causes, diagnosis and management. Aust Dent J. 2002;47(4):290-7

21. Brănişteanu DE, Dimitriu A, Vieriu M, Boda D, Stoleriu G, Molodoi DA, et al. Cutaneous manifestations associated with thyroid disease. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2014;118(4):953-8

22. Usatine RP, Tinitigan M. Diagnosis and treatment of lichen planus. Am Fam Physician. 2011;84(1):53-60.

23. de Sousa Nogueira, MA, Gavioli, CFB, Pereira, NZ, de Carvalho, GC, Domingues, R, Aoki, V, Sato, MN. Human endogenous retrovirus expression is inversely related with the up-regulation of interferon-inducible genes in the skin of patients with lichen planus. Arch of dermat research. 2015; 307(3), 259-264.

24. Shiohara T, Kano Y. Lichen planus and lichenoid dermatoses. 3rd ed. Bolognia JL JJ, Schaffer JV, editors, editor: London: Mosby Elsevier. p. 183-96; 2012.

25. Rosenblatt AE, Stein SL. Cutaneous reactions to vaccinations. Clin Dermatol. 2015;33(3):327-32

26. Montebugnoli L, Venturi M, Gissi DB, Cervellati F. Clinical and histologic healing of lichenoid oral lesions following amalgam removal: a prospective study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2012;113(6):766-72.

27. Iijima W, Ohtani H, Nakayama T, Sugawara Y, Sato E, Nagura H, et al. Infiltrating CD8+ T cells in oral lichen planus predominantly express CCR5 and CXCR3 and carry respective chemokine ligands RANTES/CCL5 and IP-10/CXCL10 in their cytolytic granules: a potential self-recruiting mechanism. Am J Pathol. 2003 Jul;163(1):261-8.inflammation." Int J Biochem Cell Biol 42(4): 506-518.

28. Carrozzo, M. Understanding the pathobiology of oral lichen planus.Current Oral Health Reports. 2014;1(3), 173-179.

29. Drexler, Stefan K., and Brian M. Foxwell. "The role of toll-like receptors in chronic inflammation." The international journal of biochemistry & cell biology 42.4 2010: 506-518.

30. Kumar, Himanshu, Taro K, Shizuo A. "Toll-like receptors and innate immunity." Biochem and bioph research comm 2009: 621-625.

31. Salem, S AM, Abu-Zeid, RM, Nada, OH. Immunohistochemical study of toll-like receptors 1 and 2 expression in cutaneous lichen planus lesions. Archives of dermatological research, 2013; 305(2), 125-131.

32. Siponen, M, Kauppila, J H, Soini, Y, Salo, T. TLR4 and TLR9 are induced in oral lichen planus. Journ of Oral Pathol & Med. 2012; 41(10), 741-747.

33. Ohno, S, Tateishi, Y, Tatemoto, Y, Morishita, K., Sasabe, E, Yamamoto, T. Enhanced expression of Toll-like receptor 2 in lesional tissues and peripheral blood monocytes of patients with oral lichen planus. The Journ of dermat, 2011; 38(4), 335-344.

34. Domingues, R, Carvalho, GC, Silva Oliveira, LM, Futata Taniguchi, E, Zimbres, JM, Aoki, V, Sato, M N. (). The dysfunctional innate immune response triggered by Toll-like receptor activation is restored by TLR7/TLR8 and TLR9 ligands in cutaneous lichen planus. British Journal of Dermat, 2015; 172(1), 48-55.

35. Foell, D. Wittkowski, H; Vogl, T; Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage- associated molecular pattern molecules. J. Leukocyte Biol. 2007; 81:28-37.

36. Vogl, T, Tenbrock, K.., Ludwig, S; Leukert, N, Ehrhardt, C, van Zoelen, MA, Nacken, W, Foell, D, van der Poll, T, Sorg, C. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. Nat. Med. 2007, 13, 1042–1049.

37. Payen, D, Lukaszewicz, AC, Belikova, I, Faivre, V, Gelin, C, Russwurm, S, Sevenet, N. Gene profiling in human blood leucocytes during recovery from septic shock. Intensive care medicine. 2008, 34(8), 1371-1376.

38. Marenholz, I., Heizmann, C. W., & Fritz, G.. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). Biochemical and biophysical research communications, 2004; 322(4), 1111-1122.

39. Salama, I.; Malone, P. S.; Mihaimeed, F.; Jones, J. L..A review of the S100 proteins in cancer. Eur. J. Surg Oncol. 2008;34: 357-64.

40. Benoit, S, Toksoy, A, Ahlmann, M., et al. Elevated serum levels of calcium-binding S100 proteins A8 and A9 reflect disease activity and abnormal differentiation of keratinocytes in psoriasis. Brit Journ of Dermat. 2006; 155(1), 62-66

41. Aochi, S, Tsuji, K, Sakaguchi, M, Huh, N, et al. Markedly elevated serum levels of calcium-binding S100A8/A9 proteins in psoriatic arthritis are due to activated monocytes/macrophages. Journ of the Americ Ac of Dermat. 2011 64(5), 879-887.1

42. Rammes, A., Roth, J., Goebeler, M., Klempt, M., Hartmann, M., & Sorg, C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100

family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. Journal of Biological Chemistry, 1997;272(14), 9496-9502

43. Nacken, W., Roth, J., Sorg, C., & Kerkhoff, C. S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. Microscopy research and technique, 2003; 60(6), 569-580

44. Lee, Y., Jang, S., Min, J. K., Lee, K., Sohn, K. C., Lim, J. S., ... & Lee, J. H. S100A8 and S100A9 are messengers in the crosstalk between epidermis and dermis modulating a psoriatic milieu in human skin. Biochemical and biophysical research communications. 2012; 423(4), 647-653.

45. Skrzeczyńska-Moncznik, A. Stefańska, B. A. Zabel, et al.. Chemerin and the recruitment of NK cells to diseased skin. Acta Biochimica Polonica, 2009 ; 56:(2), 355–360.

46. Simard, JC, Cesaro, A, Chapeton-Montes, J, Tardif, M, Antoine, F, Girard, D, Tessier, P. A.. S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF-κB 1. PloS one, 2013; 8(8), e72138.

47. Stros, M., Ozaki, T., Bacikova, A., Kageyama, H. & Nakagawara, A. HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequencespecific Sullivan, B. M., A. Juedes, S. J. Szabo, M. von Herrath, and L. H. Glimcher. Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 15818–15823 (2003).

48. Park, J. S. et al. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2003;284, 870–879.

49. West, KL, Castellini, MA, Duncan, MK.. Bustin, M. Chromosomal proteins HMGN3a and HMGN3b regulate the expression of glycine transporter 1. Mol. Cell. Biol. 2004; 24, 3747–3756

50. Zeh, H J, Lotze, MT. Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. J. Immunother. 2005; 28, 1–9.

51. Andersson, UH, Wang, K.P, et al.. High mobility group 1 protein (HMGB-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. J. Exp. Med. 2000; 192:565–570.

52. Trinchieri, G. "Biology of natural killer cells. Advances in immunology 47 1989: 187-376.

53. Lanier, LL. NK cell recognition. Annu. Rev. Immunol. 2005 23, 225–274

54. Robertson, MJ, Jerome R. Biology and clinical relevance of human natural killer cells." Blood 1990: 76.12 2421-2438

55. Lanier, LL, et al. "Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function." TheJournal of Immunology 1986:137(9), 2735-2739.

56. Maghazachi, AA. G protein-coupled receptors in natural killer cells. J. Leukoc. Biol, 2003:74, 16–24,

57. Fehniger, TA, Cooper, MA, Nuovo, GJ; Cella, M; Facchetti, F. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. Blood, 2003:101, 3052–3057.

58. Moretta, A, Bottino, C, Vitale, M, Pende, D, Cantoni, C, Mingari, MC, Moretta, L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis. Annual review of immunology, 2001; 19(1), 197-223.

59. Sáez-Borderías, A, Gumá, M, Angulo, A, Bellosillo, B, Pende, D, López-Botet, M. Expression and function of NKG2D in CD4+ T cells specific for human cytomegalovirus. European journal of immunology, 2006, 36(12), 3198-3206.

60. Jensen, H; Folkersen, L; Skov, S. Regulation and Gene Expression Profiling of NKG2D Positive Human Cytomegalovirus-Primed CD4+ T-Cells. PLoS ONE, 2012:8,. 123-130,

61. Narumi, K, Miyakawa, R, Ueda, R, Hashimoto, H, Yamamoto, Y, Yoshida, T. Aoki, K.. Proinflammatory proteins S100A8/S100A9 activate NK cells via interaction with RAGE. The Journal of Immunology, 2015:194(11), 5539-5548.

62. Kabat, J; Borrego, F; Brooks, A; Coligan, JE. Role that each NKG2Aimmunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif plays in mediating the human CD94/NKG2A inhibitory signal. J Immunol. 2002, 169, 1948-1958.

63. Braud, VM, Allan, DS, O'Callaghan, CA, Söderström, K., D'Andrea, A, Ogg, G. S; McMichael, AJ. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. Nature, 1998, 391(6669), 795-799.

64. Carbone, T, Nasorri, F, Pennino, D, Eyerich, K., Foerster, S, Cifaldi, L, Cavani, A. CD56highCD16− CD62L− NK cells accumulate in allergic contact dermatitis and contribute to the expression of allergic responses. The journal of immunology, 2010:184(2), 1102-1110.

65. Betts, MR, Brenchley, JM, Price, DA, De Rosa, SC, Douek, DC, Roederer, M, Koup, RA. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. Journ of immunol meth. 2003 281(1), 65-78.

66. Sugerman, PB, Satterwhite, KM. Bigby M. "Autocytotoxic T-cell clones in lichen planus." British Journal of Dermatology. 2000: 142(3) 449-456

67. Loser, K., Vogl., T, Voskort. M, Lueken, A., Kupas, V, Nacken, W, Klenner, L, vKuhn., A., Foell, D, Sorokin, L., Luger, T. A., Roth, J, Beissert, S. The Toll-like receptor 4 ligands MRP8 and MRP14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. Nature Medicine 2010, 16. 713-18.

68. Sallusto, F, Lenig, D, Förster, R, Lipp, M, Lanzavecchia, A.. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature, 1999:401 (6754), 708-712.

69. Tomiyama, H, Matsuda, T, Takiguchi, M. Differentiation of human CD8+ T cells from a memory to memory/effector phenotype.The Journal of Immunology, 2002:168(11), 5538-5550.

70. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. 2001 25 (4):402-408.

71. De Carvalho, GC, Domingues, R, Almeida, DSNM., Calvielli, CBA., Gomes, MK., Vieira, P N, Notomi, SM.. Up-regulation of Proinflammatory Genes and Cytokines Induced by S100A8 in CD8+ T Cells in Lichen Planus. Acta dermato-venereologica. 2015

72. Bogumil T, Rieckmann P, Kubuschok B, Felgenhauer K, Bruck W. Serum levels of macrophage-derived protein MRP-8/14 are elevated in active multiple sclerosis. Neurosci Lett 1998;247(2/3):195–7

73. Foell D, Hernandez-Rodriguez J, Sanchez M, Vogl T, Cid MC, Roth J. Early recruitment of phagocytes contributes to the vascular inflammation of giant cell arteritis. J Pathol 2004;204(3):311–6.

74. Lugering N, Stoll R, Kucharzik T, Schmid KW, Rohlmann G, Burmeister G, et al. Immunohistochemical distribution and serum levels of the Ca2+-binding proteins MRP8, MRP14 and their heterodimeric form MRP8/14 in Crohn's disease. Digestion 1995 56(5):406–14.

75. Xu, X, Wu, WY, Tu, WZ, Chu, HY, Zhu, XX, Liang, MR, Zou, HJ. Increased expression of S100A8 and S100A9 in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. A correlation with organ involvement and immunological abnormalities. Clinical rheumatology. 2013 32(10), 1501-1510.

76. Haga, HJ, Brun, JG, Berntzen, HB, Cervera, R, Khamashta, M, Hughes, GR. Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity. Lupus 1993, 2(1), 47-50.

77. Berntzen, HB, Fagerhol, MK, Ostensen, M, Mowinckel, P, Høyeraal, HM. The L1 protein as a new indicator of inflammatory activity in patients with juvenile rheumatoid arthritis. The Journal of rheumatology, 1991 18(1), 133-138.

78. Soghoian, D. Z., Jessen, H., Flanders, M., et al.. HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. Science translational medicine, 2012 (4) 123.

79. Anderson, O.A., Finkelstein, A. & Shima, D.T. A2E induces IL-1ss production in retinal pigment epithelial cells via the NLRP3 inflammasome. PLoS ONE 2013:8, e67263.

80. Doitsh, G. et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. Nature 2014, 505, 509–514.

81. Bruchard, M., Rebé, C., Derangère, V., Togbé, D., Ryffel, B., Boidot, R., ... & Ghiringhelli, F.. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. Nature immunology, 2015:16(8), 859-870.

82. de Waal Malefyt, R., et al. IL-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autocrine role of IL-10 produced by monocytes. J. Exp. Med, 250. Jg., S. 1991, 1302-1305.

83. Hu, S. P., C. Harrison, K. Xu, C. J. Cornish,. Geczy, C. L. Induction of the chemotactic S100 protein, CP-10, in monocyte/macrophages by lipopolysaccharide. Blood 1996, 87:3919.

84. Xu, Ken, and Carolyn L. Geczy. "IFN-γ and TNF regulate macrophage expression of the chemotactic S100 protein S100A8." The Journal of Immunology 2000: 164.9 4916-4923.

85. Taniguchi, N., Kawahara, K. I., Yone, K., Hashiguchi, T., Yamakuchi, M., Goto, M., Nakajima, T. . High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. Arthritis & Rheumatism, 2003:48(4), 971-981.

86. Abdulahad, D. A., Westra, J., Bijzet, J., Limburg, P. C., Kallenberg, C. G., & Bijl, M. High mobility group box 1 (HMGB1) and anti-HMGB1 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther, 2011:13(3), R71

87. Park, J. S. et al. Involvement of Toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group Box 1 protein. J. Biol. Chem2004. 279, 7370–7377.

88. Ivanov. S. et al. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. Blood 2007: 110, 1970–1981.

89. Wooden, S. L., Kalb, S. R., Cotter, R. J., Soloski, M. J. Cutting Edge: HLA-E Binds a Peptide Derived from the ATP-Binding Cassette Transporter Multidrug Resistance-Associated Protein 7 aSnd Inhibits NK Cell-Mediated Lysis. The Journal of Immunology, 2005: 175(3), 1383-1387.

90. Narumi, K., Miyakawa, R., Ueda, R., Hashimoto, H., Yamamoto, Y., Yoshida, T., Aoki, K. (). Proinflammatory proteins S100A8/S100A9 activate NK cells via interaction with RAGE. The Journal of Immunology. 2015:194(11), 5539-5548.

91. Katou, F., Ohtani, H., Watanabe, Y., Nakayama, T., Yoshie, O., Hashimoto, K. Differing phenotypes between intraepithelial and stromal lymphocytes in early-stage tongue cancer. Cancer research, 2007: 67(23), 11195-11201.