

Niels Salles Willo Wilhelmsen

**Estudo preliminar da correlação entre Antígenos de  
Histocompatibilidade (HLA) e Estomatite Aftóide  
Recorrente em População Brasileira**

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

Área de concentração:  
Otorrinolaringologia  
Orientador: Prof. Dr. Ivan Dieb  
Miziara

São Paulo

2007

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Wilhelmsen, Niels Salles Willo

Estudo preliminar da associação entre antígenos de histocompatibilidade (HLA) e estomatite aftóide recorrente em população brasileira / Niels Salles Willo Wilhelmsen. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Área de concentração: Otorrinolaringologia.

Orientador: Ivan Dieb Miziara.

Descritores: 1.Estomatite aftosa 2.Medicina bucal 3.Reação em cadeia da polimerase 4.Antígenos HLA 5.Hereditariedade

USP/FM/SBD-356/07

**“Na vida só crescemos perantes  
as dificuldades”**

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Walter e Stela, exemplos de amor, carinho e honestidade, sempre me apoiando e orientando nas horas difíceis. Agradeço pela confiança, respeito e incentivo depositados em mim, sem medir esforços, os quais me ajudam a vencer na vida.

A Nilza, minha amada esposa, amiga e companheira, meu ponto de equilíbrio, co-autora dos meus sonhos, pelo incentivo e palavras corretas nas horas difíceis, por compreender com respeito minhas ausências em momentos importantes.

A minhas irmãs, Vanessa e Alena, pelo amor, carinho e apoio, sempre sem medir esforços em me ajudar.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ivan Dieb Miziara**, pelo apoio na formulação e elaboração deste trabalho, exemplo de seriedade, dedicação e competência. Agradeço as oportunidades, os ensinamentos, a inspiração, as orientações e as cobranças, tão importantes para o meu crescimento e amadurecimento científico. Tê-lo como orientador e amigo, além de um privilégio, foi e será sempre uma honra.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**, Professor Titular da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), pelo incentivo à pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes**, por sua idoneidade, princípios, apoio e coordenação da Pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Jorge Kalil Filho**, por nos permitir utilizar a estrutura do Laboratório de Imunologia de Transplantes do Instituto do Coração para realizar a extração, tipificação e análise de HLA.

Ao **Sr. Hélcio Rodrigues**, exemplo de dedicação e seriedade, pela disposição em sempre ajudar e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao **Prof. Dr. Francisco Monteiro**, o Chico, pela amizade, incentivo e ajuda na elaboração deste trabalho.

Ao **Dr. Raimar Weber**, amigo e companheiro que gentilmente fez, refez e explicou cada detalhe da análise estatística dos dados do presente estudo, agradeço sua amizade e sua paciência.

Aos membros da banca de qualificação: **Dr. Michel Burihan Kahali**, **Dr. Rui Imamura** e **Dr. Ronaldo Frizzarini**, pelos questionamentos e sugestões que

levaram ao aprimoramento desta pesquisa.

A **TODA equipe de técnicos, funcionários, Pós-graduandos e estagiários** do Laboratório de Imunologia de Transplantes do Instituto do Coração, pela amizade, carinho e paciência dedicada para me ensinar e corrigir na extração e tipificação HLA.

Aos **Prof. Dr. João Ferreira de Mello Júnior e Prof. Dr. Olavo de Godoy Mion**, pelos exemplos de ética, competência e profissionalismo.

A **Marileide**, funcionária do Departamento de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, pela sua amizade e atenção especial.

A **Lucy, Márcia, Jacira, Jorge, Bárbara, Ofélia, Lúcia e Edizira** funcionários do Departamento de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, pela atenção, carinho, disponibilidade e colaboração nos aspectos burocráticos e assistenciais na execução desta pesquisa.

À **equipe de enfermagem, auxiliares de enfermagem, administração e recepção** do ambulatório, por todo respeito e auxílio.

Aos **residentes** do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da USP, os quais de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

A **Profa. Dra. Valéria Aoki** pela interpretação dos exames de imunofluorescência direta.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da bolsa de Auxílio Pesquisa (Processo nº 05/51085-0).



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

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

## **SUMÁRIO**

### **Lista de figuras, fluxogramas e gráficos**

### **Lista de tabelas**

### **Lista de abreviaturas**

### **Resumo**

### ***Summary***

<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>41</b>
1.1 - Complexo principal de histocompatibilidade e sistema HLA	43
1.2 - Resposta imune e sistema HLA	49
1.3 - Sistema HLA e EAR	51
<b>2 – OBJETIVOS</b>	<b>53</b>
<b>3 – REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>55</b>
3.1 – Definição	56
3.2 – Incidência	56
3.3 – Fisiopatologia da EAR	57
3.3.1 - Imunidade humoral	57
3.3.2 – Imunidade celular	59
3.4 - Etiologia da EAR	62
3.4.1 – Fatores locais	62
3.4.2 – Fatores sistêmicos	63
3.4.2.1 - Desordem nutricional	63
3.4.2.2 – Hipersensibilidade a alimentos	65
3.4.2.3 – Fatores hereditários	66
3.5 – Diagnóstico	67
3.5.1 – Exames sorológicos	68
3.5.2 – Exame histopatológico	68
3.5.3 – Exame de imunofluorescência direta	69
3.6 - Associação da EAR com outras doenças	70

3.7 – Frequência HLA na população brasileira	71
3.8 – Associação do sistema HLA e EAR	72
3.8.1 – Moléculas HLA classe I e EAR	72
3.8.2 – Moléculas HLA classe II e EAR	74
<b>4 – CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	<b>76</b>
4.1- Casuística	77
4.1.1 – Pacientes	77
4.1.1.1 – Critérios de inclusão	77
4.1.1.2 – Critérios de exclusão	78
4.1.2 – Grupo controle	78
4.3 – Método	78
4.3.1 – Colheita de exames	79
4.3.2 – Biópsia	79
4.4 – Imunofluorescência direta (IFD)	80
4.5 – Extração do dna e tipagem HLA	81
4.5.1 – Método de extração	81
4.5.2 - Extração de dna de sangue total pelo método DTAB/CTAB	81
4.5.2.1 – Princípio	81
4.5.2.1.1 – Procedimento	82
4.5.2.1.2 - Medida da concentração de DNA	83
4.5.2.1.3 - Armazenamento do DNA	84
4.5.2.2 - tipificação HLA por PCR-SSO utilizando kits para testes de tipagem HLA-classe I, locos A, B e C, e HLA-classe II locos Dr e Dq - Labtype <sup>tm</sup>	84
4.5.2.2.1- Princípio	84
4.5.2.2.2 – Procedimento	84
4.5.2.2.3 – Desnaturação / Neutralização	86
4.5.2.2.4 – Hibridização	87
4.5.2.2.5 – Marcação	87
4.5.2.2.6 – Leitura da amostra	89
4.5.2.3- Tipificação HLA por PCR SSP utilizando kits comerciais HLA-classe I e HLA-classe II	89
4.5.2.3.1- Princípio	89
4.5.2.3.2- Procedimento	90
4.5.2.4. Eletroforese em gel	93

4.5.2.5. Interpretação	94
4.6 - Análise estatística	96
<b>5 – RESULTADOS</b>	<b>100</b>
<b>6 – DISCUSSÃO</b>	<b>112</b>
6.1 – Definição	113
6.2 – Incidência e faixa etária	114
6.3 – Exames laboratoriais e EAR	114
6.4 – Histopatologia e EAR	115
6.5 – Imunofluorescência direta e EAR	116
6.6 - Hereditariedade e EAR	117
6.7 – HLA e EAR	118
6.8 – Considerações finais	121
<b>7- CONCLUSÃO</b>	<b>123</b>
<b>8- ANEXOS</b>	<b>125</b>
ANEXO I	126
ANEXO II	127
ANEXO III	130
ANEXO IV	131
<b>9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>135</b>
APÊNDICE	146
APÊNDICE I	147
APÊNDICE II	148



QUINTESSENCE INTERNATIONAL

## GUIDELINES

Manuscripts must be submitted via **QI's online submission service: [www.manuscriptmanager.com/qi](http://www.manuscriptmanager.com/qi)**  
Manuscripts should be uploaded as a PC Word (doc) file with tables and figures included at the end of the document. No paper version is required.

- Original articles are considered for publication on the condition that they have not been published or submitted for publication elsewhere.
- The publisher reserves the right to edit manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval.
- Manuscripts are reviewed and selected in a blinded process by editors and appropriate content experts. Therefore, it is important that submitted manuscripts and illustrations do not contain information that will identify the origin of the paper (except for the title page, which will not be sent to the reviewers).
- Manuscripts that do not follow these outlined instructions will be rejected promptly.

### ACCEPTABLE ARTICLES

- QI accepts original experimental investigations and review articles concerning topics of clinical relevance to the general dental practitioner. Case reports and technique articles will be very critically reviewed in terms of interest to the general dental practitioner and the supporting data provided.

### MANUSCRIPT PREPARATION

Manuscripts should be typed double-spaced with a 1-inch margin all around. Number all pages.

- **Title page.** Page 1 should include the title of the article (descriptive but as concise as possible) and the name, degrees, title, professional affiliation, and location of every author. Fax, e-mail address, and complete mailing address must also be provided for the corresponding author. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be indicated.
- **Abstract/Key words.** Page 2 should include a maximum 250-word structured abstract (with headings Objectives, Method and Materials, Results, Conclusion). Abstracts for case reports and literature reviews need not be structured. A list of 6 to 10 key words should also be included.
- **Introduction.** Summarize the rationale and purpose of the study, giving only pertinent references. Clearly state the **working hypothesis**.

- **Method and materials.** Present method and materials in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.
- **Results.** Present results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasize only important observations.
- **Discussion.** Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data or other material given in the Introduction or Results section. Relate observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations.
- **Conclusion.** Summarize the evidence-based conclusions that can be made according to the material presented in the paper.
- **Acknowledgments.** Grant or other financial support should be specified, citing the name of the supporting organization and grant number.
- **Figure legends.** Figure legends should be grouped at the end of the text and typed double-spaced. Detailed captions are encouraged.
- **Abbreviations.** The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
- **Trade names.** Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer should be included parenthetically at first mention.

### REFERENCES

- All references given must be cited in the text, numbered in order of appearance.
- The reference list should be double-spaced at the end of the article in numeric sequence.
- Do not include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.
- Avoid using abstracts as references.
- Provide complete information for each reference, including names of all authors (up to six). If the reference is to part of a book, also include the title of the chapter (or part) and names of the book's editor(s).

#### Journal reference style:

1. Dietschi D, Schatz JP. Current restorative modalities for young patients with missing anterior teeth. *Quintessence Int* 1997;28:231–240.

#### Book reference style:

1. Hilton TJ. Direct posterior composite restorations. In: Schwartz RS, Summitt JB, Robbins JW (eds). *Fundamentals of Operative Dentistry*. Chicago: Quintessence, 1996:207–228.

### ILLUSTRATIONS AND TABLES

- All illustrations and tables should be numbered and cited in the text in order of appearance.
- All illustrations and tables should be grouped at the end of the text in the same PC word document.
- High-resolution images must be sent to the Production Editor upon article acceptance:  
Production Editor  
Quintessence International  
Quintessence Publishing Co, Inc  
4350 Chandler Drive  
Hanover Park, Illinois 60133
- Original artwork or slides may still be required of the author after acceptance of the article.
- *Note that article acceptance is pending receipt of acceptable original art.*

### MANDATORY SUBMISSION FORM

The Mandatory Submission Form, which can be found in the journal or on the Quintessence Web site ([www.quintpub.com](http://www.quintpub.com)), must be signed by all authors and faxed to the Administrative Editor (+1 630 736-3634) upon notification of article acceptance.

### PERMISSIONS AND WAIVERS

- Permission of author and publisher must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author.
- Waivers must be obtained for photographs showing persons. When such waivers are not supplied, faces will be masked to prevent identification.
- Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory Submission Form to the Administrative Editor.

### REPRINTS

The corresponding author is given 150 free reprints of the article. If additional reprints are desired, they must be ordered from the publisher when the page proofs are reviewed by the authors. Individual article reprints can be ordered online ([www.quintpub.com](http://www.quintpub.com)).

CORRELATION BETWEEN HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS  
AND RECURRENT APHTHOUS STOMATITIS IN THE BRAZILIAN  
POPULATION

**Niels Sales Willo Wilhelmsen\***, **Francisco Monteiro\*\***, **Raimar  
Weber\***, **Ivan Dieb Miziara\*\*\***

\* Pós-graduate students – ENT Department - Sao Paulo University  
School of Medicine, Brazil.

\*\* PhD Nephrology - Laboratory of Transplantation Immunology - Sao  
Paulo University School of Medicine

\*\*\* Partner Professor - ENT Department – Sao Paulo University School  
of Medicine

Mailing address:

Niels Salles Willo Wilhelmsen  
Av. Portugal 397, conj. 1503  
ZIP Code 09041-010  
Santo André – SP – Brazil  
e-mail: [niels\\_willo@yahoo.com](mailto:niels_willo@yahoo.com)

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Recurrent Aphthous Stomatitis is an oral disease characterized by recurrent mucosa ulcers. Heredity may be a risk factor for the disease. It varies according to population studied. The aim of this study was to typify class I and II HLA molecules and evaluate the frequency in 58 Brazilian patients with Recurrent Aphthous Stomatitis, comparing with a control group.

**CASUISTIC AND METHOD:** Prospectively, 58 patients with the suspect diagnosis of Recurrent Aphthous Stomatitis in the period between February 2004 and May 2006 were studied. The patients compatible to the inclusion criteria had their DNA collected through 10ml venous blood sample in order to carry out the HLA typing by the Polymerase Chain Reaction.

**RESULTS:** Minor Recurrent Aphthous Stomatitis showed statistically significant frequencies HLA-A33 and HLA-B35, when compared to the control group.

**CONCLUSION:** The frequencies HLA-A33 and HLA-B35 may be related to minor Recurrent Aphthous Stomatitis in the Brazilian population.

**Keywords:** HLA Antigens, Stomatitis Aphthous, Polymerase Chain Reaction, Immunology

## INTRODUCTION

The Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS) is a common disease that is characterized by the occurrence of recurrent aphthous lesions of the oral mucosa. Its incidence varies around 20% of the world's population. It is more frequent in women. Although having an elevated incidence, and several studies dedicated to its causes, its etiology still raises a lot of controversies [1].

Presently, RAS is defined as a disease characterized by the appearance of aphthous lesions of the oral mucosa, in a recurrent way (quarterly), for a minimum duration of a year, beginning in childhood or adolescence [2], with no evidence of an associated systemic disease. However, some authors affirm that the incidence of RAS is more frequent in the second decade of a person's life [3, 4].

The disease is usually classified into three clinical forms based on the aspect and size of the ulcerations: minor, major and herpetiform. Minor Recurrent Aphthous Stomatitis (MiRAS) affects 80% of patients with RAS and is characterized by painful oval or round shallow ulcers, with a diameter smaller than 5mm. It affects the non-keratinized oral mucosa, specially the vestibule, labial and buccal mucosa, and soft palate, tongue and dorsum of tongue. Healing occurs within a period of 7 to 10 days. Major Recurrent Aphthous Stomatitis (MaRAS) is the strongest form. The diameter of the lesions can be larger than 1 cm, persisting for more than two weeks, many times leaving a scar. The third and the least common form is the Herpetiform Recurrent Aphthous Stomatitis (HuRAS), characterized by painful multiple small lesions (1 to 3 mm) that may fuse forming larger and irregular lesions [5].

Concerning the genesis of the RAS, family history seems to be important and



reports of cases in the same family are found in 24% to 46% of the cases [6, 7]. Besides that, patients with a family history of RAS may develop oral ulcerations earlier and present more severe lesions than those with no family history [8, 9].

Medical literature has registered a variety of findings on the association or non-association between HLA antigens and RAS. The association of the disease with HLA-B12 was described by Lehner et al. [10] and Malmström et al. [11], although not confirmed by other authors [12, 13]. In groups of patients from different ethnical origins, a significant association between HLA-DR2 and RAS was noted [10, 14].

The physiopathology of RAS seems to be linked to a disorder of the immunomodulation [15]. Lymphocytes seem to be the predominant cells in the aphthous lesions, there being a variation in the CD4+/CD8+ proportion during its different stages – prodromic or pre-ulcerative, ulcerative and healing [16, 17, 18].

The main role of the main histocompatibility complex, called HLA in humans, is to present peptides that have been processed in order to be recognized by the receptor of the T cell in the different immunological functions. Since that recognition is carried out involving the peptide and the HLA molecule at the same time, small variations in one of the two components lead to the immunological recognition and to the development of the cellular activation and the specific response [19]. That is the explanation for why HLA molecules are directly implied in the genetic control of immune response.

In Brazil, we do not know any study that relates HLA typing with RAS. Therefore, the object of our work was to typify class I and class II HLA molecules of Brazilian patients diagnosed with RAS and compare with a control group formed by 964 healthy Brazilian individuals.

## CASUISTIC AND METHOD

### CASUISTIC

The group was formed by 58 Brazilian patients with the hypothesis of diagnosed RAS admitted to the Stomatology Outpatient Unit - ENT Division – São Paulo University Medical School - Hospital das Clínicas, in the period from February 2004 to May 2006. This study was approved by the ethics and research committee of the College of Medicine of University of São Paulo under number 876/04 and the patients signed informed consents.

### CONTROL GROUP

The control group was formed by a group selected from 4172 healthy Brazilian volunteers that are members of the data bank of the spinal medulla donors of the Transplant Central of the São Paulo University Medical School - Hospital das Clínicas – LIM 19.

From those, only one member of each family was chosen in order to avoid the presence of haplotypes, totaling, in the end, 962 Brazilian individuals of both genders.

### METHOD

The patients underwent anamnesis, general physical examination, complete

ENT examination, a previous lab examinations protocol besides a biopsy of the lesion and the adjacent mucosa area.

The previous serous fluids exam protocol consisted of glycemia test after overnight fast, protein electrophoresis, complete hemogram, coagulogram (PT + PTT+ APTT), anti-HIV 1 and 2, dosage of total and fraction complement, rheumatoid factor, anti-nucleus factors, serous dosage of IgA, IgG, IgM and VHS, protein C reactive and serology for syphilis.

To set aside the etiology of ulcers related to other illnesses, such as penfigoid lesions, Behcet's Disease, Crohn's Disease or vasculites of another nature all patients underwent a biopsy of the lesions for a posterior histological and direct immunofluorescence examination.

#### INCLUSION AND EXCLUSION CRITERIA

Included in the study were only those patients that reported having had at least one episode of aphthous lesion per month for a minimum period of one year, and signed the informed consent agreeing with procedures that would be adopted.

All those patients that showed alterations in the serologic exams or that, in the histopathological and direct immunofluorescence exams showed alterations that are characteristic of other diseases were excluded. Those patients were sent for the specific treatment for the lesions reported.

#### DNA EXTRACTION

For the DNA collection, a total of 10 ml of venous blood was collected in a flask containing EDTA 25mM. DNA extractions were carried out through the hexadecyltrimethylammoniumbromide/dodecylthimethylammonium (DTAB/CTAB) and the typing of class I and class II HLA through polymerase chain reaction–sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO). The analysis was carried out at the Immunology Laboratory of the Instituto do Coração (Heart Institute) of the Hospital das Clínicas - São Paulo University Medical School – LIM 19.

The blood collection, DNA extraction and HLA typing of both classes of the control group had already been carried out previously in the same lab.

#### STATISTIC ANALYSIS

In order to evaluate if there was an association between the presence of the HLA antigens and their subgroups in the RAS disease, the Qui-square test was applied, and a given association was considered statistically significant when the descriptive level of the test (p) was below 0.05 (or 5%). To estimate the strength of the associations found, relative risks (RR) and their respective confidence intervals of 95% (CI 95%) were calculated.

The data were analyzed with the software: Statistical Package for Social Sciences (SPSS<sup>®</sup> for Windows 10.0; SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA).

#### RESULTS

Of the 58 initial patients, 27 were excluded for several different reasons. Out of those 31 left, 17 (54.8%) were women, 14 (45.2%) were men. Ages varied from 7

to 70 years, obtaining an average of 36.1 years and standard deviation of 15.2 (Table 1).

Concerning the type of aphthous lesions that the participants had, the most predominant were the minor form (67.74%). It should be noted that there were no patients reporting herpetiform aphthous lesions (Table 1).

In relation to the typing of the frequency of class I and class II HLA antigens of the study group, Table 2 shows the frequency of each patient.

Class I and II HLA antigen frequencies, in number and percentage, for the patients of the control group are shown on Table 3.

The Class I HLA frequencies which showed a statistically significant value in the study group, when compared to the control group, without considering the type of aphthous lesions, were A33, B81 and B35 as it is seen on Table 4.

Class II HLA frequencies in the study group which showed a higher rate were Dr7 present in 10 patients (16.13%), Dr11 and Dr17, the later two being present in eight patients (12.90%). When compared to the control group, there was no statistically significant difference.

When taking into account the type of aphthous lesions and the HLA frequency shown, compared to the control group, it is possible to notice that only frequencies A33 and B35, in patients that had minor aphthous lesions, obtained statistical significance (Table 5).

## DISCUSSION

Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS) is a common disease of the oral cavity

and its etiology is still undefined [20, 3, 7]. It can be associated to local and systemic factors; and the basis of its origin can be immunological, microbiological or genetic [21,22].

According to Jurge et al. [4], RAS occurrence of is more common in the third decade of life, between ages 20 and 30. In our study, the occurrence was also greater in that same age group, with a total of eight patients (25.80%). Values very close to those, seven (22.5%), were obtained in the two following age groups (30 to 40 and 40 to 50 years).

Women showed higher occurrence of RAS, 54.84% when compared to men, 45.16%. Those data are in accordance to the findings by Axéll and Henricsson [23], however, they conflict to those found by Miller et al. (9), in which men had a higher occurrence level.

In our study, the HLA frequencies that showed a greater rate in the patients that had RAS were: HLA-A33, HLA-B35 and HLA-B81. When seen according to the subtype of the disease, statistically significant values were obtained for minor aphthous lesions in the frequencies HLA-A33 and HLA-B35. For Major RAS, none of the frequencies showed a relevant statistic value.

In an English population, Challacombe et al. [18] found the frequency HLA-B12 associated to patients with RAS. When analyzed in relation to the subtypes of aphthous stomatitis the same frequency B12 was statistically significant, only for the herpetiform aphthous lesions. For the types Minor and Major, no prevailing frequency was found by the authors. In our study, due to its low incidence, it was not possible to obtain patients with the Herpetiform type.

The same HLA-B12 frequency was found by Malmström et al. [11] when

studying 14 Finnish patients that had RAS. Different from our study, those authors did not use a control group and their sample of RAS patients was small.

Gallina et al. [12], with a sample of 26 patients from Sicily that had RAS found an increased value that was statistically significant for the HLA-DR7 frequency. When carrying out a critical analysis of the experimental group selected, it is noticeable that patients who had had only two episodes of aphthous lesions in a year were diagnosed as RAS patients, a characteristic that is not in accordance to the clinic standard of RAS established by Stanley [5] and Scully [2], which characterize as RAS episodes of at minimum monthly aphthous lesions for at least one year, the same used in this study.

Albanidou-Farmaki et al. [14] carried out a study with 106 Greek patients that had RAS. The HLA-DR5 frequency, different from our findings, appeared as predominant in those patients. On the other hand, the HLA-DR4 frequency showed reduced frequency.

Sun et al. [24] affirm that the HLA-DRw9 frequency can be considered a genetic marker for RAS in the Chinese population. That study consisted of 80 Chinese patients that had RAS. In that study, only the HLA-DR typing was made, differently from our study, where we carried out also the HLA-A and B typing.

As far as the Arabian population is concerned, Jaber et al. [25], in a study with 22 patients that had RAS noticed a statistically significant increase in the HLA-B52 and B44 molecules in patients that had the disease when compared to the control group. The HLA-B51 frequency has been found in some works related to RAS in countries like Israel and Korea [26, 27].

It is important to point out that with the improvement of the HLA typing

methodology, the serologic method is no longer used. Through that method, it was necessary to have the presence of specific ligands (antibodies) to evidence the presence of the corresponding HLA frequency, as it was used by several authors [11, 12, 14, 18, 28, 29]. Our study used the cellular method which applies mixed lymphocytary reactions, making the HLA typing more reliable and allowing for the discovery of new frequencies [30].

On the other hand, according to Braun Prado et al. [31], and Monte et al. [32] the HLA-B35 frequency is extremely common in the Brazilian population in general, a fact that also occurred in our control group. However, it is important to stress that in spite of the fact that the HLA-B35 frequency is also elevated in our experimental group, the fact was not a random occurrence, because there was a statistically significant difference in the occurrence of that gene between the two groups.

We should also remember that, as it was mentioned by Louzada-Junior et al. [33], the reduced HLA typing frequency could be a protection factor for RAS. In our study, we did not notice any event of that kind.

Concluding, the fact that several studies found HLA frequencies for RAS different from the ones found in our study, is due, probably, to the fact that the populations studied were from different nationalities (Danish, Scottish, Israeli, Chinese and Korean) and different ethnic origins from ours, a highly miscigenized country.

Our findings show that the HLA frequencies should be carried out specifically for each population, so that we can map the possible genetic factors involved with the genesis of the disease.

It is important to mention also that, in our study, the absence of patients that



had herpetiform recurrent aphthous stomatitis, as well as the low number of patients having major stomatitis, did not allow for a more precise analysis of the HLA frequencies associated to those forms of the disease.

All in all, the relatively reduced casuistic of RAS patients in our study does not invalidate our results, given the fact that the HLA frequencies found in our patients were very different from those obtained in the control group with patients that did not have RAS.

## CONCLUSION

The results from our study suggest that Minor RAS is related to the frequencies HLA-A33 and HLA-B35 in the Brazilian population.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) (Grant 05/51085-0).

## REFERENCES

1. Natah SS, Konttinen YT., Enattah NS, Ashammakhi N, Sharkey KA, Hayrinen-Immonen R. Recurrent aphthous ulcers today: a review of the growing knowledge. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33(3):221-34.
2. Scully C. Aphthous Ulceration. *N Eng J Med.* 2006; 355(2):165-172.

3. Porter SR, Hegarty A, Kaliakatsou F, Hodgson T, Scully C. Recurrent aphthous stomatitis. *Clinics in Dermatol.* 2000;18:569-78.
4. Jurge S, Kuffer R, Scully C, Porter SR. Recurrent aphthous stomatitis. *Oral Diseases.* 2006;12:1-21.
5. Stanley HR. Aphthous lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972.33(3):407-16.
6. Sircus W, Church R, Kelleher J. Recurrent aphthous ulceration of the mouth; a study of the natural history, aetiology and treatment. *Q J Med.* 1957; 26(102):235-49.
7. Casiglia JM. Recurrent aphthous stomatitis: Etiology, diagnosis, and treatment. *General Dentistry.* 2002;50(2):157-166.
8. Ship II. Inheritance of Aphthous ulcers of the mouth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;44(5):837-44.
9. Miller MF, Garfunkel AA, Ram C, Ship II. Inheritance patterns on recurrent aphthous ulcers: Twin and pedigree data. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1977;43:886-91.
10. Lehner T, Welsh KL, Batchelor JR. The relationship of HLA-B and DR phenotypes to Behçet's syndrome, recurrent oral ulceration and the class of immune complexes. *Immunology.* 1982;47,581-7.
11. Malmström M, Salo OP, Fyhrquist F. Immunogenetic markers and immune response in patients with recurrent oral ulceration. *Int J Oral Surg.* 1983;12:23-30.
12. Gallina G, Cumbo V, Messina P, Caruso C. HLA-A, B, C, DR, MT, and MB antigens in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*

1985;59(4):364-70.

13. Ozbakir F, Yazici H, Mat C, Tuzun Y, Yurdakul S, Yilmazer S. HLA antigens in recurrent oral ulceration: evidence against a common disease spectrum with Behcet's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 1987;5: 263–265.

14. Albanidou-Farmaki A, Kayavis IG, Polymenidis Z, Papanayotou P. HLA-A, B, C na DR Antigens in Recurrent Oral Ulcers. *Ann Dent*. 1988;47(1):5-8.

15. Sistig S, Cekic-Arambasin A, Rabatic S, Vucicevic-Boras V, Kleinheinz J, Piffko J. Natural immunity in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med*. 2001;30:275–80.

16. Greenspan JS, Gadol N, Olson JA, Hoover CI, Jacobsen PL, Shillitoe EJ, Armitage GC. Lymphocyte function in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol*. 1985;14:592–6.

17. Pedersen A, Klausen B, Hougen HP, Ryder LP. Peripheral lymphocyte subpopulations in recurrent aphthous ulceration. *Acta Odontol Scand*. 1991;49:203–6.

18. Challacombe SJ, Barkhan P, Lehner T. Haematological features and differentiation of recurrent oral ulceration. *Br J Oral Surg*. 1977;15:37–48.

19. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology: the immune system in health and disease. 5<sup>a</sup> ed. Garland Publishing, 2001.

20. Porter SR, Scully C, Pedersen A. Recurrent aphthous stomatitis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(3),306-21.

21. Scully C. Oral infections in the immunocompromised patient. *Br Dent J*. 1992;172(11):401-7.

22. Miziara, ID. Estomatite Aftóide Recidivante. *Rev Bras de ORL* 1995;

61(5): 418.

23. Axéll T, Henriesson V. The occurrence of recurrent aphthous ulcers in an adult Swedish population. *Acta Odontol Scand.* 1985;43:121-5.

24. Sun A, Hsieh RO, Chu CT, Wu YC. Strong association of HLA-DRw9 in Chinese patients with recurrent oral ulcers. *J Am Acad Dermatol.* 1991;24(2 Pt 1):195-8.

25. Jaber L, Weinberger A, Klein T, Yaniv I, Mukamel M. Close association of HLA-B52 and HLA-B44 antigens in Israeli arab adolescents with recurrent aphthous stomatitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001;127:184-7.

26. Shohat-Zabarski R, Kalderon S, Klein T, Weinberger A. Close association of HLA-B51 in persons with recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol,* 1992;74(4):455-8.

27. Chang HK, Kim JU, Cheon KS, Chung HR, Lee KW, Lee IH. HLA-B51 and its allelic types in association with Behçet's disease and recurrent stomatitis in Korea. *Clinical and Experimental Rheumatology.* 2001;19 (24): S31-S35.

28. Platz P, Ryder LP, Donatsky O. No deviations of HLA-A and -B Antigens in patients with Recurrent Aphtous Stomatitis. *Tissue Antigens.* 1976;8:279-280.

29. Dolby AE, Walker DM, Slade M, Allan C. HL-A histocompatibility antigens in recurrent aphthous ulceration. *J Dent Res.* 1977;56(2):105-7.

30. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B et al.. Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. *Tissue Antigens.* 1999;53:407-468.

31. Braun-Prado K, Mion ALV, Culpi L, Petzi-Erler ML. HLA class I

polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in Brazilian exogamic population.

*Tissue Antigens*. 2000;56:417-27.

32. Monte SJH, Neto JMM, Rampim GF, Shulzhenko N, Morgun A, Delima MG. Polimorfismo do sistema HLA em uma amostra de mestiços da população de Teresina, Piauí. *Rev Assoc Méd Bras*. 2004;50(4):422-6.

33. Louzada-Junior P, Smith AG, Hansen JA, Donadi EA. HLA-DRB1 and – DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of São Paulo. *Tissue Antigen*. 2001;57:158-162.

## TABLES

Table 1. Demographic data from 31 patients with RAS by type, sex and ages.

	Type of aphthous			p	Total (n = 31) (100,00 %)
	Minor (n = 21) (67,74 %)	Major (n = 10) (32,26 %)	Herpetiforme (n = 0) (0,00 %)		
Sex					
men	10 (47,6 %)	4 (40,0 %)	0 (0,0 %)	1,0 <sup>†</sup>	14 (45,2 %)
women	11 (52,4 %)	6 (60,0 %)	0 (0,0 %)		17 (54,8 %)
Ages (years)	35,6 ± 14,5	37,2 ± 17,5	-	0,79 <sup>‡</sup>	36,1 ± 15,2
< 20	2 (9,5 %)	2 (20,0 %)		0,35 <sup>†</sup>	4 (12,9 %)
20 a 39	12 (57,1 %)	3 (30,0 %)			15 (48,4 %)
≥ 40	7 (33,3 %)	5 (50,0 %)			12 (38,7 %)

<sup>†</sup>: Chi-square test

<sup>‡</sup>: Student't test

Table 2. Distribution according to the Class I and Class II HLA frequency in 31 patients suffering form RAS.

Patient	HLA-A	HLA-B	HLA-Dr
1	A1 A11	B35 B63	DR13 DR16
2	A23 A26	B50 B51	DR4 DR13
3	A24 A24	B35 B65	DR1 DR16
4	A25 A34	B7 B42	DR7 DR10
5	A33 A68	B65 B71	DR1 DR 17
6	A2 A2	B7 B61	DR10 DR11
7	A2 A32	B18 B35	DR4 DR16
8	A2 A66	B35 B58	DR13 DR17
9	A74 A74	B35 B81	DR9 DR14
10	A3 A29	B35 B44	DR8 DR7
11	A1 A24	B13 B56	DR1 DR15
12	A23 A80	B44 B72	DR4 DR7
13	A24 A33	B35 B49	DR7 DR15
14	A24 A29	B51 B64	DR7 DR11
15	A2 A23	B50 B51	DR7 DR11
16	A2 A30	B18 B39	DR14 DR17
17	A32 A66	B35 B58	DR4 DR11
18	A11 A11	B7 B35	DR15 DR103
19	A2 A24	B18 B35	DR8 DR17
20	A1 A2	B37 B50	DR7 DR103
21	A1 A3	B35 B57	DR11 DR17
22	A1 A23	B18 B81	DR7 DR11
23	A24 A31	B35 B51	DR11 DR13
24	A2 A29	B44 B64	DR7 DR17
25	A2 A3	B51 B62	DR13 DR16
26	A31 A33	B39 B65	DR1 DR8
27	A24 A30	B8 B35	DR11 DR17
28	A3 A33	B35 B49	DR7 DR7
29	A11 A33	B13 B35	DR15 DR15
30	A2 A33	B41 B65	DR1 DR17
31	A2 A24	B18 B62	DR8 DR15

Table 3. Frequency and percentage of Class I and Class II HLA antigens in the control group patients.

Antigen	N	%	Antigen	n	%	n	%	Antigen	n	%	
A1	153	15.9	B1	3	0.3	B47	3	0.3	DR1	187	19.5
A2	443	46.1	B4	40	4.2	B48	5	0.5	DR3	3	0.3
A3	174	18.1	B7	93	9.7	B49	23	2.4	DR4	229	23.8
A10	1	0.1	B8	67	7.0	B50	31	3.2	DR7	239	24.9
A11	85	8.8	B9	14	1.5	B51	52	5.4	DR8	95	9.9
A23	113	11.8	B10	24	2.5	B52	20	2.1	DR9	35	3.6
A24	171	17.8	B11	122	12.7	B53	30	3.1	DR10	37	3.9
A25	21	2.2	B12	23	2.4	B55	13	1.4	DR11	228	23.7
A26	56	5.8	B13	155	16.1	B56	3	0.3	DR12	41	4.3
A28	8	0.8	B14	64	6.7	B57	23	2.4	DR13	212	22.1
A29	81	8.4	B15	111	11.6	B58	41	4.3	DR14	81	8.4
A30	115	12.0	B16	53	5.5	B60	43	4.5	DR15	198	20.6
A31	79	8.2	B17	116	12.1	B61	33	3.4	DR16	75	7.8
A32	51	5.3	B18	44	4.6	B62	46	4.8	DR17	143	14.9
A33	62	6.5	B27	9	0.9	B63	16	1.7	DR18	23	2.4
A34	20	2.1	B35	98	10.2	B64	19	2.0			
A36	8	0.8	B37	10	1.0	B65	57	5.9			
A66	18	1.9	B38	14	1.5	B67	1	0.1			
A68	103	10.7	B39	27	2.8	B71	35	3.6			
A69	2	0.2	B40	1	0.1	B72	37	3.9			
A74	33	3.4	B41	13	1.4	B73	3	0.3			
A80	4	0.4	B42	17	1.8	B75	4	0.4			
			B44	46	4.8	B78	1	0.1			
			B45	24	2.5	B81	8	0.8			
			B46	2	0.2	B1508	6	0.6			

Table 4. Frequency of Class I HLA antigens in patients suffering from Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS) compared to the control group.

	Group		p	RR (CI 95%)
	RAS (n = 31)	Control (n = 961)		
A33	6 (19.4 %)	62 (6.5 %)	0.016	3.48 (1.38 – 8.80)
B35	15 (48.4 %)	204 (21.2 %)	< 0.001	3.48 (1.69 – 7.16)
B81	2 (6.5 %)	8 (0.8 %)	0.036	8.22 (1.67 – 40.41)

RR = Relative Risk; CI = Confidence Interval

Table 5. Frequency of Class I HLA Antigens in patients suffering from Minor and Major Recurrent Aphthous Stomatitis compared to the Control Group.

	Group		p	RR (CI 95%)
	Minor (n = 21)	Controls (n = 961)		
A33	4 (19.0 %)	62 (6.5 %)	0.047	3.27 (1.1 – 9.4)
B35	12 (57.1 %)	204 (21.2 %)	<0.001	4.73 (2.0 – 11.1)
B81	1 (4.8 %)	8 (0.8 %)	0.177	5.41 (0.8 – 36.1)
	Group		p	RR (IC 95%)
	Major (n = 10)	Controls (n = 961)		
A33	2 (20.0 %)	62 (6.5 %)	0.137	3.54 (0.8 – 16.3)
B35	3 (30.0 %)	204 (21.2 %)	0.452	1.58 (0.4 – 6.1)
B81	1 (10.0 %)	8 (0.8 %)	0.089	11.88 (1.7 – 84.2)

RR = Relative Risk; CI = Confidence Interval



## **LISTA DE FIGURAS, QUADROS E GRÁFICOS**

Figura 1 – Cromossomo 6 e região HLA	45
Figura 2 - Representação esquemática resumida, da estrutura dos genes que compõe o CPH humano	48
Quadro 1 - Planilha de aplicação de amostras no gel	93
Figura 3 - Distribuição do número de pacientes com EAR segundo a idade	104

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Programa PCR para LabType™ SSO	86
Tabela 2 - Mistura de amplificação	86
Tabela 3 - Quantidade de solução SAPE estoque (ul) X Tampão SAPE (ul) em relação ao número de testes	88
Tabela 4 - Volumes específicos de água e Taq para cada kit	91
Tabela 5: Diferenças mínimas detectáveis para cada gene, utilizando-se uma amostra de 30 pacientes e estabelecendo-se a possibilidade de erro tipo I em 5% bidirecional e tipo II em 80%	97
Tabela 6 - Dados demográficos dos pacientes estudados	102
Tabela 7 - Distribuição do número e porcentagem dos pacientes portadores de EAR	105
Tabela 8: Frequência e porcentagem dos antígenos HLA classe I e Classe II dos pacientes do grupo controle	105
Tabela 9 - Distribuição quanto à frequência HLA classe I e classe II de 31 pacientes com EAR	107
Tabela 10 - Frequência de Antígenos HLA classe I, em pacientes com Estomatite Aftóide Recorrente (EAR)	108
Tabela 11 - Frequência de Antígenos HLA classe I, em pacientes com Estomatite Aftóide Recorrente Minor comparados com Grupo Controle	109
Tabela 12 - Frequência de Antígenos HLA classe I, em pacientes com Estomatite Aftóide Recorrente Major comparados com Grupo Controle	110
Tabela 13 - Frequência de haplótipos, em pacientes com Estomatite Aftóide Recorrente (EAR)	111

## LISTA DE ABREVIATURAS

APCs - Células Apresentadoras de Antígenos

CD4+ - Linfócito T CD4

CD8+ - Linfócito T CD8

CPH - Complexo Principal de Histocompatibilidade

CTAB 0,5% - Brometo de hexadeciltrimetilamônio

C2 - Proteína do complemento tipo 2

C4 - Proteína do complemento tipo 4

DB – Doença de Behçet

D-Mix - Solução para amplificação especialmente formulada, constituída de Desoxirribonucleotídeos Fosfatados, cloreto de potássio (1%) e Tris (hidroximetil) aminometano (1%)

DNA – Ácido Desoxi Ribonucléico

DTAB 12% (Brometo de dodeciltrimetilamônio)

EAR - Estomatite Aftóide Recorrente

EARh – Estomatite Aftóide Recorrente herpetiforme

EARi - Estomatite Aftóide Recorrente minor

EARj - Estomatite Aftóide Recorrente major

EDTA – Ácido Dietil Tetra Acético

HLA – Antígenos Leucocitários Humanos

HSP - Proteínas do Choque Térmico

H<sub>2</sub>O – Fórmula química da água

IL 2 – Interleucina 2

IC – Intervalo de confiança

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IFD – Imunofluorescência direta

Kb – Kilobase, abreviatura de 1.000 pares de bases no DNA ou 1.000 bases no RNA,  
medida padrão da genômica.

KDa – Kilodáltons

MHC - Major Histocompatibility Complex

ml – Mililitro

NaCl – Hipoclorito de sódio

ng – Nanograma

NK – Células Natural Killer

Nm – Nanômetro

PCR – Reação de polimerização em cadeia

PV – Pênfigo Vulgar

RNA – Ácido Ribonucléico

rpm – Rotações por minuto

RR - Risco relativo

SAPE – Conjugado Streptavidin R-phycoerithrin

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

SSO - Seqüência específica de oligonucleotídeo

SSP – Primers específicos para seqüência

Taq – Thermus aquaticus quinase

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral Alfa

UV – Ultravioleta

V – Volts

$\mu\text{g/ml}$  – Micrograma por mililitro

$\mu\text{L}$  – Microlitro

$^{\circ}\text{C}$  – Graus Celsius

% - Porcento

## RESUMO

Wilhelmsen NSW. Estudo preliminar da correlação entre Antígenos de Histocompatibilidade (HLA) e Estomatite Aftóide Recorrente [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

**INTRODUÇÃO:** A Estomatite Aftóide Recorrente (EAR) é uma doença oral com incidência em 20% da população mundial, caracterizada por úlceras mucosas de caráter recidivante. O seu diagnóstico baseia-se principalmente na história clínica do paciente. Hereditariedade pode ser um fator de risco para a doença. Entretanto, os estudos disponíveis não são conclusivos quanto aos resultados obtidos, variando segundo a população estudada. **OBJETIVOS:** Neste trabalho tipificamos moléculas HLA de classe I e de classe II e avaliamos a frequência destas moléculas em 31 pacientes, da cidade de São Paulo, portadores de Estomatite Aftóide Recorrente bem como em seus subgrupos (minor, major e herpetiforme), comparando com grupo controle, composto de 961 pacientes saudáveis. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** Prospectivamente, 58 pacientes com suspeita diagnóstica de Estomatite Aftóide Recorrente no período de fevereiro de 2004 a maio de 2006, foram estudados. Estes pacientes foram submetidos a protocolo de exames e, daqueles que obedeceram os critérios de inclusão, foi extraído o Ácido Desoxi Ribonucléico (DNA), por meio de amostra de 10 ml de sangue total periférico, com o fim de proceder a tipificação HLA por Reação de Polimerização em Cadeia. **RESULTADO:** Nos pacientes portadores de Estomatite Aftóide Recorrente do tipo minor encontramos as frequências HLA A33 e B35, estatisticamente significantes quando comparadas com o grupo controle. **CONCLUSÃO:** As frequências HLA-A33 e HLA-B35 podem estar associadas à Estomatite Aftóide Recorrente minor na população brasileira.

Unitermos: Estomatite aftosa, Medicina bucal, Reação em cadeia da Polimerase, Antígenos HLA, Hereditariedade.

## SUMMARY

Wilhelmsen NSW. Preliminary study the correlation between human histocompatibility antigens (HLA) and recurrent aphthous stomatitis [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007.

**INTRODUCTION:** Recurrent aphthous stomatitis (RAS) is a common oral mucosa disorders and affects 20% of the world’s population, this disease is characterized by recurring painful ulcers of the mouth. The diagnosis is based on the clinic and the lesion’s history. Hereditary may be involved in the morbidity of Recurrent aphthous stomatitis. Despite extensive investigations of etiology’s Recurrent aphthous stomatitis, they are not conclusive and vary by different ethnic backgrounds.

**OBJECTIVES:** In this work HLA class I and class II was typed from 31 subjects affected by Recurrent aphthous stomatitis, and compared with 961 healthy controls.

**CASUISTIC and METHOD:** Fifty eight patients with diagnostic hypothesis of Recurrent aphthous stomatitis were treated, in the period of February of 2004 to May of 2006. A protocol of exams were obtained from those that obeyed the inclusion criteria. To obtain the DNA, 10 ml venous blood sample was collected to type HLA using Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide (PCR-SSO).

**RESULTS:** The investigation revealed that HLA-A33 and HLA-B35 were more frequent in minor Recurrent aphthous stomatitis patient, when compared with control group. **CONCLUSION:** HLA-A33 and HLA-B35 may be associated with Recurrent aphthous stomatitis type minor in the Brazilian’s population.

Key words: Aphthous stomatitis, Stomatology, Polymerase Chain Reaction, HLA, Heredity.

## **1- INTRODUÇÃO**



A Estomatite Aftóide Recorrente (EAR) é a segunda doença mais comum que afeta a mucosa oral, com incidência de 20% na população mundial e encontrada mais frequentemente em mulheres. Embora sua incidência seja tão elevada é uma das doenças que mais desperta controvérsias quanto à sua etiologia (Natah et al., 2004).

É observado em vários estudos que a incidência da EAR é preponderante na segunda década de vida (Sircus et al., 1957; Graykowski et al., 1966; Challacombe et al., 1977a; Axéll e Fenricsson, 1985; Porter et al., 2000; Jurge et al., 2006). História familiar é encontrada em 24% a 46% dos casos (Casiglia, 2002).

Atualmente, define-se EAR como uma doença caracterizada pelo aparecimento de aftas em mucosa oral, de forma recorrente (quinzenal ou mensalmente), por um período mínimo de um ano (Scully, 2006).

As lesões da Estomatite Aftóide Recorrente se localizam na mucosa oral não queratinizada, especialmente no vestibulo, mucosa labial e bucal, palato mole, língua e assoalho de língua e possui três modos de manifestação (Truelove & Morris-Owen, 1958; Stanley, 1972):

- Estomatite Aftóide Recorrente Minor (EARi): é a forma mais comum desta doença, afetando 80% dos pacientes adultos e infantis. É caracterizada inicialmente por uma sensação de queimação. Após 24 a 48 horas há o surgimento de úlcera rasa, dolorosa, oval ou arredondada, de diâmetro menor que 5mm com uma pseudomembrana envolvida por um halo eritematoso. Sua cicatrização ocorre num período de 7 a 10 dias.

- Estomatite Aftóide Recorrente Major (EARj): é uma forma severa e incomum da EAR. Surge normalmente após a puberdade, caracteriza-se pelo formato oval maior que 5mm, chegando às vezes a mais de 1cm de diâmetro, persistindo na

cavidade oral por um período maior que seis semanas, chegando a deixar cicatrizes.

- Estomatite Aftóide Recorrente Herpetiforme (EARh): é muito comum, tendo, como característica clínica, múltiplas bolhas, pequenas, de 1 a 3 mm de diâmetro, e dolorosas, que ulceram e podem se coalescer, formando úlceras maiores e irregulares, sendo mais comum em mulheres.

Existem três estágios clínicos da evolução da EAR bem definidos (Lindemann et al, 1985b):

- Prodrômico: estágio inicial, caracterizado por uma sensação de dormência, edema e início de infiltrado linfoplasmocitário na área onde irá surgir a lesão. Seu período dura de 24 a 48 horas.

- Ulcerativo: estágio caracterizado pela formação de úlcera, aumento de dor, vasculite e denso infiltrado de linfócitos e plasmócitos. O período de duração deste estágio leva de dias a semanas, dependendo do tamanho da lesão.

- Cicatrização: estágio final da doença, caracterizado por diminuição da dor e início da regeneração epitelial.

Há na literatura vários fatores descritos como desencadeantes de surtos de EAR: desordem imunopatológica (Sistig et al., 2001), deficiência hemática (Wray et al., 1975; Olson, 1982; Challacombe et al., 1983; Tyldesley, 1983; Field et al., 1987; Porter et al., 1988, 1998, 2000), fatores hormonais (Axéll e Henricsson, 1985), deficiência vitamínica (Nolan et al., 1991), hipersensibilidade a alimentos (Wray et al., 1975; Eversole et al., 1982; Wray et al., 1982; Hay e Reade, 1984; Axéll e Henricsson, 1985), deficiência a zinco (Endre, 1991), fatores psicológicos (Pedersen, 1989; Jaber et al., 2001), fatores genéticos (Ship, 1965; Platz et al., 1976; Miller et al., 1977; Porter et al., 1998, 2000), também fatores infecciosos e virais (Lindemann

et al., 1985a; Pedersen et al., 1993; Leimola-Virtanen et al., 1995).

Suspeita-se que a fisiopatologia da EAR esteja ligada a uma desordem na imunomodulação (Sistig et al., 2001). Os linfócitos parecem ser as células predominantes nas lesões aftóides, ocorrendo uma variação na proporção CD4+ / CD8+ durante seus diferentes estágios (Greenspan et al., 1985; Pedersen et al., 1991).

Doenças sistêmicas como Síndrome de Behçet, infecção por HIV, Síndrome de Sweet, Pênfigo, Doença de Crohn e Líquen Plano possuem, como sinal inicial, manifestações orais ao invés de lesão cutânea. Estas manifestações orais muitas vezes se assemelham às lesões aftóides (Miziara, 1995; Ship e Arbor, 1996; Femiano et al., 2005; Porter e Leao, 2005).

Atualmente não existe exame laboratorial específico para diagnóstico de EAR (Porter et al., 1991, 2000; Scully 2006); seu diagnóstico baseia-se principalmente na coleta dos dados clínicos e no histórico de ocorrência das lesões.

## **1.1 - COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE E SISTEMA HLA**

Um dos sistemas genéticos mais amplamente estudado em mamíferos, devido a sua relevância em transplantes, controle da resposta imune e associação com doenças é o “Major Histocompatibility Complex” (MHC) ou Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH).

Os genes de histocompatibilidade são assim chamados porque, quando descobertos, foram relacionados com a rápida rejeição de tecidos transplantados

entre cobaias de laboratório, particularmente camundongos. O CPH é o conjunto de genes mais polimórficos já conhecido entre os mamíferos, codificando proteínas expressas nas superfícies de vários tipos celulares, e que também é conhecido, em humanos, como sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen* - Antígenos Leucocitários Humanos) (Fernandes et al., 2003).

O CPH humano está localizado no braço curto do cromossomo 6, compreende uma região que se estende aproximadamente a  $4 \times 10^6$  pares de bases (Kb), com 224 genes, 128 expressos (57,1%), sendo 51 genes (39,8%) diretamente envolvidos na resposta imune, sendo organizados nas regiões de HLA classe I, II e III (Figura 01) (Singh et al., 1997).

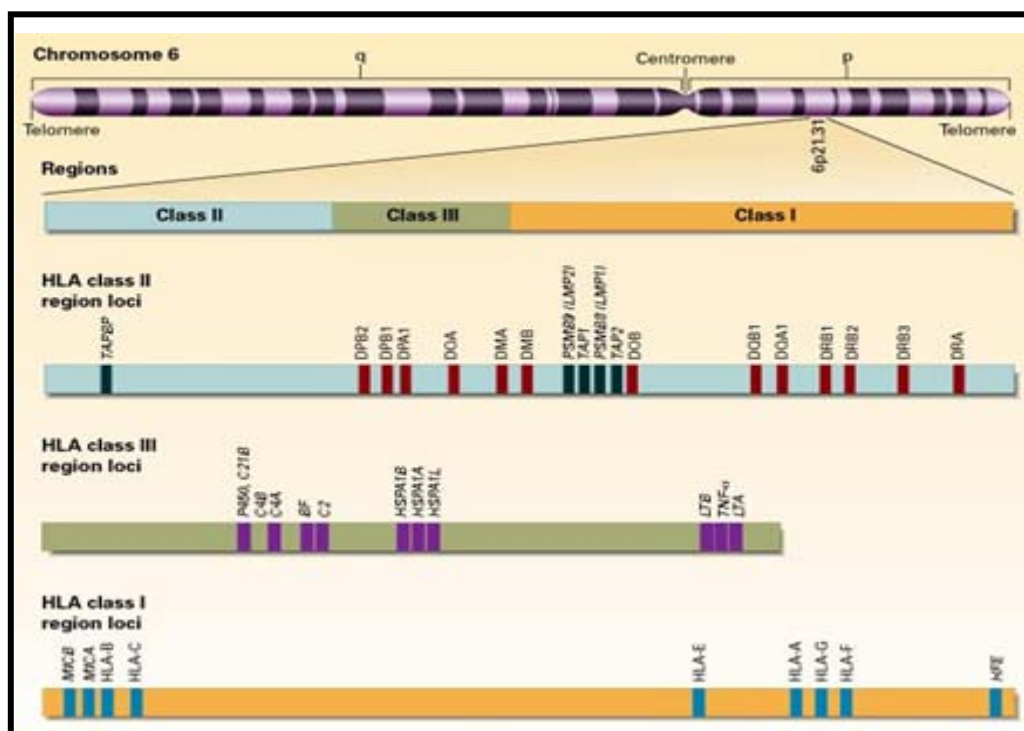


Figura 1 – Cromossomo 6 e região HLA (Janeway et al., 2002)

Uma vez que os genes de histocompatibilidade são codominantes, tanto os

genes de origem materna como os paternos são expressos, assim, para os genes HLA de classe I até seis moléculas podem ser manifestadas nas superfícies celulares, ou seja, duas HLA-A, duas HLA-B e duas HLA-C, totalizando três moléculas de origem materna e três paterna. Pelo fato destes genes estarem muito próximos uns dos outros, são herdados em bloco. O conjunto de genes oriundos do cromossomo materno ou paterno é designado de haplótipo (Fernandes et al., 2003).

As regiões HLA de classe I e de classe II codificam proteínas que são expressas na superfície celular, muitas vezes apresentando um grande polimorfismo genético. Por outro lado, a região HLA de classe III fica no espaço entre a de classe I e classe II, embora esteja incluída dentro do MHC, não codifica moléculas de histocompatibilidade, e sim outras moléculas, algumas fazendo parte do sistema imune, outras não. Assim, os genes que codificam os componentes  $C_2$  e  $C_4$ , da via clássica, e o fator B da via alternativa do sistema complemento, os fatores humorais tais como proteínas do choque térmico (HSP70), proteínas do Fator de Necrose Tumoral ( $TNF-\alpha$  e  $TNF-\beta$ ) e proteínas TAP1 e TAP2, que entre outras são responsáveis pelo transporte de peptídeos (Bodmer et al., 1999).

A região HLA de classe I contém 10 genes: HLA A, B, C, E, F, G, H, I, J e K, sendo que apenas os genes HLA A, B e C são bem definidos. Estes genes codificam as moléculas HLA A, B e C, as quais estão expressas na superfície das células como uma glicoproteína de 45kDa, que se insere na membrana citoplasmática tendo uma porção intracelular, uma porção hidrofóbica transmembranária e três domínios protéicos extracelulares (Monteiro e Kalil, 1998).

Nos dois domínios mais externos da cadeia pesada, chamados de alfa1 e alfa2, existem sítios, onde há substituições de aminoácidos, dando origem às

diferentes especificidades antigênicas detectadas por reações sorológicas. A distribuição destas moléculas é ubiqüitária nas células nucleadas do organismo, sendo que o HLA A e B são fortemente expressos nestas células, enquanto o HLA C tem expressão mais baixa. Já nas células tumorais, a expressão destas moléculas pode ter níveis mais baixos. Tanto a produção de Interferon gama, quanto de fator de necrose tumoral alfa induzem o aumento da expressão destas moléculas (Monteiro e Kalil, 1998).

Dentre os demais HLA de classe I, as moléculas de HLA G têm expressão limitada, principalmente nos trofoblastos placentários com possíveis funções na relação materno-fetal. Já as demais moléculas HLA E, F, H, I, J e K não têm ainda expressão de membrana conhecida.

Cada molécula HLA de classe II está expressa na superfície das células como uma glicoproteína composta de duas cadeias: a alfa de peso molecular 34kDa e a beta de peso molecular 29kDa. Ambas se inserem na membrana citoplasmática tendo uma porção intracelular, uma hidrofóbica transmembranária e dois domínios protéicos extracelulares, que exibem polimorfismo. A distribuição destas moléculas de classe II é bem mais restrita, pois se encontram constitutivamente apenas em células com funções especializadas na apresentação de antígenos. Assim, linfócitos B, células da linhagem monócito/macrofágo têm moléculas HLA de classe II em suas membranas. Outras células também podem expressá-la, como por exemplo, linfócitos T ativados e células endoteliais, estas últimas, quando ativadas por citocinas como o interferon gama (Monteiro e Kalil, 1998).

O CPH tem duas propriedades marcantes, é poligênico e altamente polimórfico, isto é, tanto os genes de classe I como os de classe II apresentam

variações de indivíduo para indivíduo, as quais podem ser detectadas tanto por métodos sorológicos (utilizando anticorpos), como por métodos celulares (reações linfocitárias mistas) (Figura 02). A última nomenclatura dos genes do CPH inclui cerca de 124 alelos para o locus A, 258 alelos para o locus B, e 86 alelos para o locus C. Para as moléculas de classe II foram identificadas 221 alelos para DRB1, 19 para DRB3, 10 para DRB4, 14 para DRB5, 20 para DQA1, 39 para DQB1 (Bodmer et al., 1999).

A nomenclatura dos genes do CPH foi proposta pelo Comitê de nomenclatura do sistema HLA da Organização Mundial de Saúde, com a intenção de padronizar e facilitar o entendimento do complexo gênico. Assim, os genes do CPH são designados pelas letras correspondentes aos loci ou grupos de loci, como HLA-A, HLA-B, HLA-DR, HLA-DQ (Bodmer, 1997).

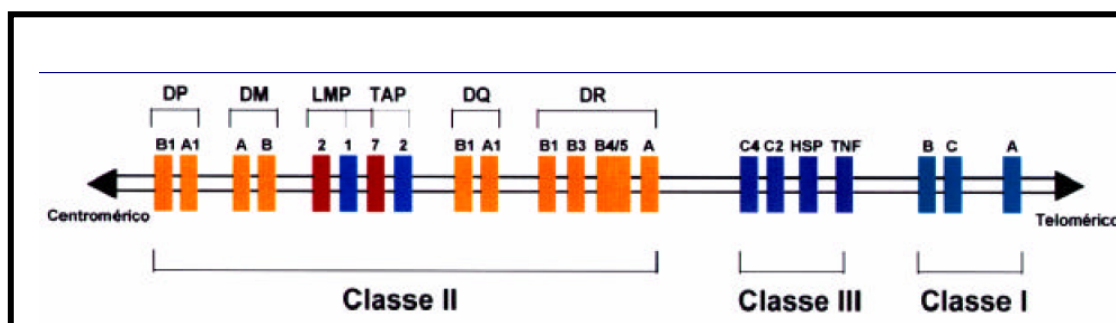


Figura 2 - Representação esquemática resumida, da estrutura dos genes que compõe o CPH humano (Janeway et al., 2002)

A distribuição populacional dos diferentes alelos varia, podendo ser característica de um determinado grupo étnico.

Todo processo de reconhecimento imunológico é realizado através da

interação de células T com seu receptor de moléculas do CPH, e um fragmento de uma proteína estranha (peptídeo). Assim, a função auxiliadora (*Helper*) exercida pelos linfócitos T CD4+, faz-se através do reconhecimento da molécula de classe II que apresenta um peptídeo ao receptor da célula T. Este peptídeo é colocado numa fenda que se forma por ocasião da síntese da molécula de classe II, sendo proveniente do processamento de proteínas exógenas endocitadas por células apresentadoras de antígenos (Van Rood, 1993).

A ativação da célula T com funções auxiliares tem vários efeitos, seja através do auxílio para que os linfócitos B se multipliquem e se diferenciem para a produção de anticorpos, ou através do auxílio aos linfócitos T precursores de células citotóxicas para que adquiram suas capacidades efetoras. Além disto, o auxílio pode ser dado a outros linfócitos T CD4+, responsáveis pelo fenômeno de hipersensibilidade retardada. Os linfócitos T com funções citotóxicas CD8+ reconhecem, através do seu receptor, a molécula de classe I igualmente apresentando um peptídeo, sendo este, em geral, originário de proteínas endógenas geradas na própria célula.

## **1.2 - RESPOSTA IMUNE E SISTEMA HLA**

Os principais componentes da resposta imune são os linfócitos T (sistema imune celular) e linfócitos B (sistema imune humoral). Os linfócitos B maduros secretam anticorpos circulantes que combatem as infecções. Estas células que incluem macrófagos e células dendríticas (células apresentadoras de antígenos – APCs) são capazes de fagocitar microorganismos e apresentar peptídeos exógenos,



que, transportados por uma molécula classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) à superfície das APCs, se projetam para o meio extracelular, e é reconhecido por uma outra célula, o Linfócito T helper, estimulando-o e fazendo-o secretar citocinas. Estas citocinas ajudam a estimular o subgrupo de linfócitos B, chamados de imunoglobulinas, que podem se ligar aos peptídeos do microorganismo invasor, destruindo-os diretamente (Monteiro e Kalil, 1998).

O sistema imune celular (citotóxico) possui uma molécula classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), que é encontrada nas superfícies de todas as células do corpo. A apresentação na superfície da célula do peptídeo exógeno pela molécula classe I de MHC alerta o sistema imune, particularmente as células T (intolerantes a peptídeos exógenos), as quais emitem uma substância química que destrói a célula infectada (Janeway et al., 2002).

O sistema imune humoral é especializado em combater infecções extracelulares, como bactérias e vírus circulantes. O sistema imune celular combate infecções intracelulares, como parasitas e vírus dentro das células. Entretanto, esta divisão não é restrita, e há uma grande interação dos dois componentes do sistema imune adaptativo. Além disto, os componentes do sistema imune inato interagem e ajudam a coordenar os componentes do sistema imune adaptativo.

Os genes de HLA codificam classes diferentes de proteínas MHC, sendo cada classe de molécula envolvida em um aspecto diferente da resposta imune (Monteiro et al., 1996).

Os genes classe I de HLA estão presentes em todas as células, do organismo, e dão às células T *Killer* um mecanismo para distinguir o exógeno do

próprio. Cada proteína classe I de MHC pode ligar um amplo espectro de antígenos e apresentá-los às células T *Killer* (Janeway et al., 2002).

Os genes classe II de HLA codificam polipeptídios que estão situados principalmente nas superfícies dos linfócitos B e macrófagos, células que interagem com células T *helper*. Os genes classe III de HLA codificam proteínas do complemento, que interagem com os complexos antígeno-anticorpo e ajudam a destruí-los por proteólise; como os genes classe III de HLA estão ligados a produtos solúveis não tem relevância com associação em doenças (Janeway et al., 2002).

Desta forma, o principal papel do Sistema HLA em humanos é apresentar peptídeos processados, para que sejam reconhecidos pelo receptor da célula T nas diferentes funções imunológicas. Como este reconhecimento se faz concomitantemente envolvendo o peptídeo e a molécula HLA, pequenas variações em um destes dois componentes levam ao reconhecimento imunológico e ao desencadeamento de ativação celular e resposta específica. Entende-se assim porque as moléculas HLA estão diretamente implicadas no controle genético da resposta imune (Monteiro et al., 1996; Monteiro e Kalil, 1998).

### **1.3 - SISTEMA HLA e EAR**

Trabalhos pioneiros tentaram associar a EAR com antígenos HLA-A e HLA-B, porém não obtiveram sucesso (Platz et al., 1976; Ddolby et al., 1977). Com o aprimoramento da técnica de tipificação HLA outros trabalhos surgiram já encontrando associação, porém com frequências diversas (Challacombe et al., 1977a; Lehner et al., 1982; Malmström et al., 1983; Gallina et al., 1985; Albanidou-Farmaki

et al, 1988; Sun et al., 1991; Jaber et al., 2001). Outros estudos investigaram a associação entre HLA-B51 e HLA-B52, já relacionados com a doença de Behçet, com a EAR, porém obtendo resultados conflitantes (Lehner et al., 1982; Shohat-Zabarski et al., 1992; Chang HK et al., 2001).

Trabalhos populacionais relacionam EAR com antígenos HLA, mas devido a diferenças étnicas seus resultados são controversos (Challacombe et al., 1977a; Malmström et al., 1983; Gallina et al., 1985; Albanidou-Farmaki et al., 1988; Sun et al., 1991; Shohat-Zabarski et al., 1992; Chang et al., 2001; Jaber et al., 2001).

A falta de trabalhos que relacione a tipificação HLA com EAR na população brasileira levou a realização deste estudo.

**2 - OBJETIVOS**

Tipificar e avaliar a frequência de moléculas do Sistema HLA classe I e classe II em pacientes brasileiros portadores de Estomatite Aftóide Recorrente (bem como em seus subgrupos major, minor e herpetiforme) comparando-a com grupo controle.

### **3 - REVISÃO DA LITERATURA**

### 3.1 – DEFINIÇÃO

Em 1957, Sircus et al., listaram as 12 formas utilizadas para descrever os casos existentes de EAR, mostrando o grande grau de desconhecimento da natureza desta doença. Truelove & Morris-Owen (1958) dividiram didática e clinicamente as formas de manifestação da EAR em duas: Minor e Major, mais tarde Cooke<sup>1</sup> (1960) apud Lehner (1968) descreveu a forma Herpetiforme da lesão.

A partir de então, era consenso que a EAR caracterizava-se por lesões ulceradas em mucosa oral, queratinizada ou não, ocorrendo de maneira inespecífica independentemente do sexo e idade. Atualmente, a EAR é definida como uma doença caracterizada pelo aparecimento de afta(s) em mucosa oral, de forma recorrente (quinzenal ou mensalmente), por um período mínimo de um ano, a sua manifestação pode ocorrer em qualquer idade, afeta mais o sexo feminino e não está associada a nenhuma outra doença (Scully, 2006).

### 3.2 – INCIDÊNCIA

Sircus et al. (1957), em um estudo com 1738 pessoas, 335 apresentavam EAR, sendo do total aproximadamente um em cada quatro mulheres, e um em cada seis homens.

Neste mesmo estudo, Sircus et al. (1957) observaram que 50% dos pacientes estavam abaixo dos 30 anos de idade, sendo a terceira década de vida a com maior incidência de EAR.

---

<sup>1</sup> Cooke BED. *Brit Dent J.* 1960;109:83

Graykowski et al. (1966), após realizarem um estudo com 62 pacientes com EAR, observaram que 44 eram do sexo feminino, 59 eram brancos, e as idades dos pacientes variaram de três a 68 anos com uma média de 33 anos de idade.

Challacombe et al. (1977a), após um período de quatro anos, quando foram observados 193 pacientes com EAR, concluíram que a proporção de homens e mulheres afetados por esta doença está em de 1:2, independente da idade e tipo de lesão.

Axéll e Fenricsson (1985) em um estudo na Suécia com 20.333 pessoas, 17,7% apresentaram quadros clínicos de EAR, sendo a faixa etária entre 15-24 anos a com maior incidência (27,1%). Em todas as faixas etárias a maior ocorrência foi do sexo feminino.

Porter et al. (2000) em uma revisão de literatura afirmam que as manifestações da EAR têm predominância no sexo feminino, acometendo em sua grande maioria na terceira década de vida. Esta mesma afirmação foi ratificada na revisão realizada por Jurge et al. (2006).

### **3.3 – FISIOPATOLOGIA DA EAR**

Fatores humorais e celulares estão associados com a fisiopatologia da EAR.

#### **3.3.1 - IMUNIDADE HUMORAL**

Pioneiramente Lehner publicou em 1972, um trabalho com as



características imunológicas dos pacientes com EAR, em que observou um aumento sorológico de IgA nos pacientes com aftas tipo major, e elevado nível de IgG nos pacientes com aftas tipo minor e herpetiforme.

Ben-Aryeh et al. (1976), em um estudo com 21 pacientes portadores de EAR, observaram, através de exames sorológicos, ausência de alteração nos níveis de IgA e IgG. Na saliva também foi observado ausência de alteração nos níveis de IgA. Através destes dados afirmaram que não há correlação entre a condição clínica dos pacientes com EAR e alterações sorológicas e salivares de IgA e IgG.

Lindemann et al. (1985a) não conseguiram observar, através da sorologia de 21 pacientes com EAR, alteração nos níveis de IgA e IgM. Apenas o nível de IgG apresentou baixa queda durante a fase inativa da doença, porém estatisticamente não significativo quando comparado com grupo controle.

Neste mesmo ano, Lindemann et al. (1985b), em um estudo com uma amostra menor, com 17 pacientes com EAR, oito não apresentavam lesões ativas, observaram um aumento na quantidade de IgM nos pacientes sem lesão, e um nível significativamente baixo de IgG nos pacientes com lesão ativa. Concluíram que os valores de IgM e IgG podem alterar, dependendo da presença ou ausência de aftas, nos pacientes com EAR.

Bagg et al. (1987) contrariamente ao publicado por Lehner (1972) e Lindemann et al., 1985b, não conseguiram observar alterações nos níveis sorológicos de IgG, IgM e IgA, em 21 pacientes portadores de EAR.

Porter et al. (1992a) observaram os níveis sorológicos das subclasses de IgG em 71 pacientes portadores de EAR tipo minor. Concluíram que certamente a deficiência de IgG não é o papel principal na etiopatogenia da EAR tipo minor, visto

que, apenas sete pacientes (10%) apresentaram alterações nos níveis de IgG. Destes, seis apresentaram elevada presença marginal de IgG1, e um paciente baixo nível de IgG3.

Vicente et al. (1996), além dos níveis sorológicos das subclasses de IgG, também observaram os níveis de IgG total, IgA e IgM em 34 pacientes com EAR. Concluíram que, contrariamente ao estudo anterior de Porter et al. (1992a), os níveis de IgG2 alteraram-se durante os períodos de ausência e presença de aftas. Durante o período sem aftas os níveis de IgG2 apresentaram-se significativamente baixos, juntamente com os níveis de IgA, enquanto na fase ativa da doença os níveis de IgG2 não se alteraram e os níveis de IgA estavam elevados quando comparados com o grupo controle.

Sistig et al. (2002) publicaram outro trabalho em que foi observado a presença dos subtipos salivares de IgG e IgA nos pacientes com EAR, comparados com grupo controle. Observaram valores elevados para IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub> e IgA<sub>2</sub> nos quadros agudos de EAR, sendo que IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>4</sub> retornaram aos valores normais após a remissão da lesão, enquanto IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgA<sub>2</sub> mantiveram-se elevados.

### **3.3.2 – IMUNIDADE CELULAR**

Em 1980, Mills et al. observaram em biópsias de 14 pacientes com EAR, a presença de infiltrado linfocitário no estágio pré-ulcerativo da lesão aftosa, e em sua margem, quando ulcerada.

Savage et al. (1985) utilizando técnicas de imunohistoquímica com anticorpos monoclonais diretamente contra linfócitos T, observaram as mudanças

que ocorrem nas populações de células T durante o decorrer da EAR. Concluíram que no estágio prodrômico ocorre um aumento na quantidade de CD4+ em relação a CD8+, na proporção de 2:1, no estágio ulcerativo a quantidade de CD8+ aumenta em relação a CD4+ numa proporção de 10:1, invertendo-se esta proporção no estágio de cicatrização tendo o predomínio de CD4+ (10:1).

All et al. (1990), através da mesma técnica utilizada por Savage et al. (1985), estudaram as mudanças que ocorrem nas populações de células T, durante o decorrer dos subtipos major e minor da EAR. Fizeram parte deste estudo 25 pacientes com EAR (15 do tipo minor e 10 do tipo major). Foram observadas células T<sub>3</sub> presentes em maior número na EAR tipo major, provavelmente devido o longo curso da lesão neste subtipo de EAR, funcionando como um marcador de “cronicidade”. Com relação à proporção CD4+/CD8+ resultados semelhantes a Savage et al. (1985) foram observados.

De acordo com estes mesmos autores o aumento da proporção CD4+/CD8+ demonstra uma natureza mais destrutiva do tipo major de EAR, o CD4+ ativado vai produzir interleucina II que funcionará como hormônio de crescimento específico de todos os subtipos de células T, especialmente T Killer, o que vai causar uma destruição profunda da mucosa.

Através da pesquisa dos níveis de CD4+ circulantes, Landesberg et al. (1990) observaram um aumento de CD4+ “helper/inducer” e uma queda de CD4+ “suppressor/inducer” ou “células Natural Killer (NK)”, durante os estágios de surgimento e remissão da lesão aftóide. Este aumento de CD4+ “helper/inducer”, segundo os autores, pode resultar clinicamente em uma doença causada por uma produção excessiva de linfocinas.

Häyrinen-Immonen et al. (1991), através de um estudo imunohistoquímico detalhado, observaram a presença de algumas células CD4+ no interior do epitélio. Grande parte destas células estavam localizadas na membrana basal lateralmente à área da úlcera. Linfócitos T CD8+ estiveram presentes intra-epitelialmente ocasionalmente. Sua presença foi mais marcante na lâmina própria lateralmente à úlcera.

Neste mesmo ano, Pedersen et al. (1991) publicaram um estudo onde, por meio de exames sorológicos, foi encontrada diminuição estatisticamente significativa dos níveis de CD4+ nos pacientes com EAR. Apesar de CD8+ e a proporção CD4+/CD8+ apresentarem pequena diminuição nos pacientes com EAR, quando comparados com grupo controle, este resultado não foi significativo.

No ano seguinte, com análise imunohistoquímica e anatomopatológica de biópsias de 43 pacientes com EAR, Pedersen et al. (1992) observaram as proporções CD4+/CD8+ e a proporção de células mononucleares destes pacientes na presença e ausência de aftas. Foram encontrados resultados como a ausência de CD4+ no epitélio mucoso dos pacientes com e sem aftas. A presença de células mononucleares foi significativamente menor nos pacientes com EAR do que nos pacientes do grupo controle, e a presença de CD8+ esteve aumentada, nos pacientes com EAR durante e após os episódios de aftas.

Pelo fato do receptor da interleucina 2 (IL 2) ter um papel essencial no crescimento de células T e ser necessário para toda expressão da resposta imune, Sun et al. (2000), por meio de citometria de fluxo, determinaram os níveis plasmáticos de IL 2 em 34 pacientes com EAR. Concluíram que, devido às mudanças na proporção CD4+/CD8+ durante os estágios da EAR, as alterações dos níveis de IL 2 podem ser

uma conseqüência da evolução da doença.

Sistig et al. (2001) observaram a ausência de alteração nos níveis sorológicos de Linfócitos T CD8+ durante os três estágios da EAR. Em contrapartida, os níveis de CD4+ apresentaram-se significativamente mais baixos, a não ser no período inativo da doença. As células NK mantiveram valores baixos nos pacientes com EAR, quando comparadas com o grupo controle, na presença e ausência de aftas.

Bazrafshani et al. (2002), em um estudo com 95 pacientes portadores de EAR, concluíram que linfócitos e macrófagos são células que aparecem ativadas no processo da EAR, porém seus papéis ainda não são completamente conhecidos nesta doença.

### **3.4 - ETIOLOGIA DA EAR**

Existem na literatura vários fatores descritos como desencadeantes de surtos de EAR; dentre eles podemos citar:

#### **3.4.1 – FATORES LOCAIS**

Segundo Wray et al. (1981) o trauma na mucosa oral, muitas vezes originado pela escovação ou mastigação de alimentos duros, pode iniciar um processo de ulceração em pessoas susceptíveis, uma vez que o trauma promoverá uma migração linfocitária no local, proporcionando um desequilíbrio na proporção CD4+/CD8+.

### **3.4.2 – FATORES SISTÊMICOS**

#### **3.4.2.1 - DESORDEM NUTRICIONAL**

Wray et al. (1975) foram os pioneiros na associação da EAR e deficiência vitamínica. Neste estudo com 130 pacientes portadores de EAR, após coleta de sangue, 23 apresentavam deficiência de vitamina B12 e/ou deficiência de ácido fólico e/ou deficiência de ferro. Após introduzir terapia para reposição e realizar acompanhamento por um ano, observou-se que, dos 23 pacientes, quinze apresentaram completa remissão do quadro de EAR. Aqueles que apresentavam deficiência de vitamina B12 e/ou deficiência de ácido fólico foram os que tiveram uma melhora mais rápida quando introduzida a terapia.

Em contra partida, em um estudo semelhante, Olson et al. (1982), ao analisar sorologicamente 90 pacientes com EAR, observaram que apenas três apresentavam baixos níveis séricos de ferro. Nenhum apresentava deficiência de vitamina B12 e/ou ácido fólico. Os autores concluíram que não seria necessário solicitar exames de sangue de rotina para pacientes com EAR.

Challacombe et al. (1983) observaram em um estudo com 105 pacientes com EAR a presença de 8% com baixos níveis de ferro no sangue. Destes a maioria eram mulheres. Quando realizada uma terapia para reposição de ferro, as lesões aftóides cessaram.

Field et al. (1987) realizaram análise sangüínea de 100 crianças portadoras de EAR, com idade entre sete e 16 anos. Foi observado que 21% delas estavam com

deficiência de ferro e/ou ácido fólico e/ou vitamina B12, e quando introduzido terapia vitamínica e acompanhamento por seis meses foi observado uma melhora do quadro de EAR.

Em um estudo realizado por Porter et al. (1988) em uma porcentagem pequena de pacientes portadores de EAR, apenas 3,2%, apresentaram alguma alteração sangüínea nos valores para ferro, ácido fólico e vitamina B12. Entretanto os autores concordaram com a necessidade de solicitar exame sorológico para pacientes com EAR, uma vez que a possibilidade de deficiência de ferro e/ou ácido fólico e/ou vitamina B12 existe e pode ser um fator causal de EAR.

Endre (1991) relata o caso clínico de uma criança com 15 anos de idade que apresentava EAR por seis anos e não respondia a terapia convencional. Foi constatada deficiência de zinco e iniciada terapia de reposição com 50mg de sulfato de zinco, três vezes ao dia por três meses. Após os três meses de terapia, e acompanhamento de um ano, o paciente não apresentou mais o quadro de EAR.

Nolan et al. (1991) observaram 60 pacientes portadores de EAR. Destes, 16 (28,2%) apresentavam deficiência de vitamina B1 e/ou B2 e/ou B6. Após terapia de reposição vitamínica e acompanhamento por um período de três meses os pacientes não apresentaram mais as lesões aftóides.

Em outro estudo realizado por Porter et al. (1992b) 34 pacientes portadores de EAR apresentavam deficiência vitamínica (ferro e/ou vitamina B12 e/ou ácido fólico). Após terapia com reposição vitamínica 24 pacientes (70%) obtiveram melhora nos quadros de EAR.

Haisraeli-Shalish et al. (1996) observaram os níveis de vitamina B1 em um grupo de 70 pacientes com EAR, e compararam com o grupo controle composto de

50 pacientes saudáveis. Dos pacientes com EAR, 49 apresentaram deficiência de vitamina B1, enquanto, apenas dois do grupo controle, possuíam esta deficiência, mostrando uma provável associação entre deficiência de vitamina B1 e EAR.

Piskin et al. (2002) compararam os níveis sorológicos de ferro, ácido fólico e vitamina B12 em 35 pacientes portadores de EAR e com grupo controle composto por 26 pacientes saudáveis. Foi constatado que oito pacientes portadores de EAR apresentavam níveis baixos de vitamina B12, enquanto no grupo controle nenhum apresentou deficiência de vitamina B12. Perante esta constatação os autores concluíram que a deficiência de vitamina B12 pode ser um fator de risco para EAR.

Koybasi et al. (2006), após estudarem 34 pacientes portadores de EAR, e compararem com grupo controle composto por 32 pacientes saudáveis, concluíram que os fatores predisponentes para EAR devem estar associados e ser a somatória de: história familiar, deficiência de vitamina B12 e não fumante.

#### **3.4.2.2 – HIPERSENSIBILIDADE A ALIMENTOS**

Eversole et al. (1982) tentaram correlacionar a presença de aftas à ingestão de alguns alimentos (tomate, amêndoa e morango) que poderiam causar aftas em pessoas susceptíveis. Com base neste estudo foi possível concluir que estes alimentos podem causar episódios de aftas em alguns pacientes, atribuindo um possível fator adstringente e ácido a estes alimentos.

Wray et al. (1982), na tentativa de associar episódios de aftas à alergia a alimentos, e conseqüente liberação de histamina e migração leucocitária, promovendo assim quadros de EAR, expuseram 60 pacientes portadores de EAR a



alérgenos ambientais e aos seguintes alérgenos alimentares: chocolate, café, milho, ovo, mistura de diferentes peixes (atum, salmão, truta, cavala, bacalhau), mistura de carnes (porco, boi, ave), mistura de noz (amendoim, amêndoa, castanha, castanha do Pará), leite, arroz, mistura de frutos do mar (lagosta, camarão, caranguejo, ostra), soja, morango e tomate. Dos 60 pacientes, quatro apresentaram significativa liberação de histamina a alérgenos ambientais, nove a alérgenos alimentares e 14 a ambos. Apesar de não possuírem um resultado significativo, os autores concluíram que a sensibilidade a alguns alimentos pode gerar episódios de EAR em pessoas alérgicas.

Em um estudo elaborado por Hay et al. (1984), 17 pacientes portadores de EAR foram submetidos a uma dieta que consistia na eliminação da ingestão de cereal e frutas. Os pacientes poderiam apenas ingerir uma dieta composta por vitaminas, ácido ascórbico e carbonato de cálcio. Apenas 12 pacientes conseguiram chegar ao final do estudo. Destes, quatro tiveram remissão total das lesões aftóides. Apesar de não apresentar um resultado significativo, os autores concluíram que a dieta pode estar associada a quadros de EAR.

Hunter et al. (1993) em um estudo duplo cego, observaram a eliminação de glúten da dieta de pacientes portadores de EAR. Ao final do período estudado, apesar de não haver diferenças estatísticas, notou-se uma menor incidência de EAR em quatro dos 11 pacientes que receberam dieta livre de glúten.

### **3.4.2.3 – FATORES HEREDITÁRIOS**

Sircus, 1957, relatou que 55 pacientes de um total de 120 estudados apresentaram história familiar de EAR. Em 22 destes 55 casos, pai ou mãe, ou ambos

apresentavam a doença, em apenas sete casos mais de três membros da família eram afetados pela EAR.

Em 1965, Ship estudou uma provável hipótese da EAR estar associada à herança genética, através de genes recessivos ou dominantes. Este estudo foi realizado com 815 famílias, totalizando 1974 descendentes. Com base nos dados obtidos não foi possível confirmar a hipótese de uma provável hereditariedade dominante ou recessiva da EAR.

Miller et al. (1977) descreveram a possibilidade da EAR estar ligada à herança hereditária, por encontrar clinicamente uma frequência bastante elevada de irmãos gêmeos homozigotos (90,0%), e gêmeos heterozigotos (57,0%) que apresentavam episódios de EAR, podendo fatores epigenéticos estarem envolvidos também com o surgimento das aftas. Em um trabalho realizado em 1980, estes autores afirmaram que quando pai e mãe sofrem de EAR, a possibilidade da criança também sofrer da mesma doença é de 67,3%, e quando apenas a mãe sofre de EAR a chance diminui para 58,6%.

### **3.5 – DIAGNÓSTICO**

O diagnóstico da EAR é estritamente clínico, porém há necessidade da realização de exames sorológicos e de biópsia para diagnóstico diferencial com outras doenças, que possuem manifestações clínicas semelhantes a EAR, ou naqueles casos em que a EAR se apresenta com lesões atípicas.

### **3.5.1 – EXAMES SOROLÓGICOS**

MacPhail et al. (1991) observaram que 66% dos pacientes HIV positivo apresentavam aftas, principalmente tipo major. Segundo os autores, alguns destes pacientes relataram desconhecer serem portadores do vírus HIV, achando que as aftas que manifestavam eram de origem inespecífica.

Livneh et al. (1996) relataram manifestações articulares em pacientes com EAR. Neste estudo, 24 de um total de 64 pacientes portadores de lesões aftóides, apresentaram artrite reumatóide.

Natah et al. (2004) esclareceram que devido à semelhança clínica da lesão de sífilis com a da EAR tipo major, seria interessante solicitar sorologia para sífilis, previamente à biópsia.

### **3.5.2 – EXAME HISTOPATOLÓGICO**

Mills et al. (1980), após analisarem biópsias de oito pacientes com EAR, observaram que o exame histopatológico da lesão aftóide revela dois tipos de células inflamatórias morfológicamente distintas, dependendo do estágio da lesão. No estágio pré-ulcerativo linfócitos estarão presentes na margem da lesão, enquanto no estágio ulcerativo leucócitos polimorfonucleares predominam na área ulcerada.

Em um estudo realizado em 1991, Häyrinen-Immonen et al. compararam histologicamente biópsias de lesões aftóides de oito pacientes portadores de EAR, com biópsias de mucosa sã de cinco pacientes saudáveis do grupo controle. As lâminas provenientes dos pacientes com EAR revelaram a presença de necrose

superficial, intensa presença de infiltrado inflamatório na zona de membrana basal lateralmente à úlcera, com predomínio de linfócitos T CD4+, na proporção de 2:1, em relação a Linfócitos T CD8+.

### **3.5.3 – EXAME DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA**

Donatsky e Dabelsteen (1977) ao analisarem com imunofluorescência direta biópsia de 16 pacientes portadores de EAR, encontraram na zona de membrana basal a presença de IgG em 14 pacientes, todos apresentaram depósitos de C<sub>3</sub>, e ausência de fluorescência específica de IgM e IgA. Nas paredes dos vasos não houve presença de marcadores para IgG, IgM e IgA.

Presença significativa de C<sub>3</sub> na zona de membrana basal também foi achada por Ullman e Gorlin (1978), em seu estudo cinco de 10 pacientes apresentaram este resultado, porém não foi encontrada fluorescência nesta região para IgG, IgM e IgA. Já nas paredes dos vasos eles obtiveram resultado negativo para IgG, positivo em 6 pacientes para IgM, 2 pacientes para IgA e todos os 10 pacientes foram positivos para C<sub>3</sub>.

VanHale et al. (1981) estudando 22 pacientes, portadores de EAR, encontraram ausência de IgA, tanto nas paredes dos vasos quanto na zona de membrana basal. A presença de IgG nas paredes dos vasos também foi negativa. Houve a ocorrência positiva para IgM em apenas um caso, tanto na zona de membrana basal quanto nas paredes dos vasos. Com relação à presença de C<sub>3</sub>, ela foi positiva em seis casos nas paredes dos vasos, e sete na zona de membrana basal.

Malmström et al. (1983) encontraram ausência de fluorescência para IgM,

IgG e IgA em todos os 16 casos avaliados, entretanto em 15 houve presença de fluorescência para C<sub>3</sub> ao longo das paredes dos vasos.

Reimer et al. (1983) em 17 casos obtiveram ausência de fluorescência na zona de membrana basal para IgG, IgA e IgM, porém em seis casos obteve fluorescência para C<sub>3</sub>. Nas paredes dos vasos não apresentaram fluorescência IgG e IgA, a fluorescência esteve presente em 4 casos para IgM e 13 casos para C<sub>3</sub>.

De acordo com Jordan e al. (2002) o papel principal da utilização da imunofluorescência direta (IFD) é identificar anticorpos e outras proteínas inflamatórias na região lesada por alguma patologia, e assim confirmar ou excluir a suspeita clínica diagnóstica.

### **3.6 - ASSOCIAÇÃO DA EAR COM OUTRAS DOENÇAS**

A Neutropenia Cíclica é a redução cíclica do número neutrófilos circulantes que ocorre após 21 dias. Além de EAR, os pacientes que possuem esta doença vão manifestar também uma gengivite severa e agressiva, infecção no trato respiratório, febre e abscessos cutâneos (Porter e Scully, 1991).

De acordo com MacPhail et al. (1991), Miziara (1995) e MacPhail e Greenspan (1997) a AIDS apresenta com primeira manifestação, em pacientes HIV positivos, quadros de EAR.

Scully et al. (2003) chamavam a atenção para a Síndrome PFAPA, caracterizada pela presença simultânea e periódica de aftas orais, febre, faringite e adenite cervical, é uma manifestação rara, autolimitante e que normalmente acomete crianças.

Scully et al. (2003) afirmaram que algumas doenças gastrointestinais como Doença de Crohn, Desordem Celíaca, Colite Ulcerativa e Sensibilidade ao Glúten são as que possuem manifestações orais tipo EAR. Em alguns casos, como na sensibilidade ao glúten, os episódios de EAR cessam totalmente com uma dieta com ausência do mesmo.

Miziara et al. (2005) relataram que pacientes com AIDS podem manifestar lesões aftóides provavelmente por uma mudança no sistema imune, caracterizada pela inversão da proporção CD4+:CD8+.

De acordo com Jurge et al. (2006) surtos de aftas podem, muitas vezes, serem manifestações prodrômicas de outras doenças sistêmicas que passam despercebidas, e que não tratadas podem levar a óbito.

A Doença de Behçet é caracterizada principalmente por úlceras orais somadas com úlceras genitais. Jurge et al. (2006) afirmaram que suas úlceras orais se assemelham com as da EAR major ou herpetiforme e as manifestações oculares (uveítes), articulares, gastrointestinais, renais, hematológicas e neurológicas que podem também estar presentes.

### **3.7 – FREQUÊNCIA HLA NA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Braun-Prado et al. (2000) realizaram um estudo populacional do polimorfismo HLA na população da região metropolitana de Curitiba, estado do Paraná. Fizeram parte deste estudo 363 indivíduos, sendo eles 150 brancos, 158 mulatos, 40 negros e 15 de origem asiática. Foi possível, então, traçar um mapa das frequências HLA que predominam naquela região, entre elas HLA A3, HLA A9,

HLA B5, HLA B15, HLA 35, HLA Cw3 e HLA Cw7.

Um trabalho semelhante na população da região de Teresina, estado do Piauí foi realizado por Monte et al. (2004). Neste estudo foi obtida a tipificação HLA classe I e classe II de 97 indivíduos caracterizados como mestiços. As frequências HLA A2, HLA A3, HLA B7, HLA A35, HLA DR4, HLA DR11, HLA DQ6 e HLA DQ0301 foram predominantes naquele centro urbano.

### **3.8 – ASSOCIAÇÃO DO SISTEMA HLA E EAR**

#### **3.8.1 – MOLÉCULAS HLA CLASSE I E EAR**

Com o avanço da imunogenética, em especial os estudos feitos com biologia molecular em torno do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), que nos humanos apresenta o nome *Human Leukocyte Antigen* (HLA), foi possível tentar estabelecer associação entre a suscetibilidade em face de certas doenças e variantes alélicas participantes de genes no CPH.

Platz et al. (1976) foram os primeiros na tentativa de associar Antígenos de Histocompatibilidade (HLA) e a doença EAR. Fizeram parte deste estudo, 38 pacientes da *Royal Dental College*, de Copenhague – Dinamarca, portadores de EAR, comparados com um grupo controle composto por 1967 dinamarqueses saudáveis. Foi realizada tipagem sorológica para 23 antígenos HLA, não havendo diferença significativa entre as frequências do grupo com EAR e o grupo controle.

Dolby et al. (1977) realizaram tipagem HLA de 64 pacientes ingleses portadores de EAR minor, comparando com 100 indivíduos do grupo controle. Neste

trabalho não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as frequências HLA dos dois grupos estudados.

Também com um grupo de pacientes ingleses, Challacombe et al. (1977a) efetuaram tipagem HLA de 100 portadores de EAR (65 EARi, 19 EARj e 16 EARh), comparando com grupo controle de mesmo número. A frequência HLA-B12 foi a que apresentou valor significativo para os pacientes com EAR. Quando observada separadamente, a frequência HLA e a forma de manifestação da EAR, a frequência HLA-B12 obteve valor significativo apenas para a forma herpetiforme. Foi notado também neste estudo que a combinação da frequência HLA-A2 e HLA-B12 obteve um valor significativo para a doença EAR, sugerindo uma susceptibilidade ligada a haplótipos.

A mesma frequência HLA-B12 foi encontrada em outro estudo por Lehner et al. (1982) com 17 pacientes ingleses portadores de EAR.

Malmström et al. (1983) ao estudarem a tipagem HLA em 14 pacientes finlandeses portadores de EAR, comparando com 15 pacientes saudáveis do grupo controle, não se depararam com nenhuma frequência HLA com valor significativo.

Um estudo na Itália por Gallina et al. (1985), com 26 pacientes portadores de EAR, sendo 19 EARi, sete EARj e um EARh, comparando com 84 pacientes do grupo controle, encontraram a frequência HLA-B5 com valor significativamente diminuído, podendo haver neste caso um fator protetor.

Em um trabalho com 106 pacientes gregos portadores de EAR (79 EARi, 10 EARj e 17 EARh) comparados com 120 pacientes saudáveis, Albanidou-Farmaki et al. (1988) não encontraram valores significativos para antígenos HLA classe I.

Já em um grupo de estudo composto por 26 pacientes israelenses portadores



de EAR, comparados com 100 pacientes do grupo controle, Shohat-Zabarski et al. (1992) encontraram as frequências HLA-B51 e HLACw7 com valores estatisticamente significantes.

Outro estudo com pacientes israelenses, Jaber et al. (2001) observaram um aumento estatisticamente significativo das moléculas HLA-B52 e B44 em 22 pacientes portadores de EAR quando comparados com 117 pacientes do grupo controle.

Chang et al. (2001) realizaram tipagem HLA em 56 pacientes coreanos portadores de EAR comparando com 70 pacientes do grupo controle. Nenhuma frequência HLA apresentou valores estatisticamente significantes quando confrontados os dois grupos.

### **3.8.2 – MOLÉCULAS HLA CLASSE II E EAR**

Gallina et al. (1985) em um estudo com 26 pacientes italianos portadores de EAR, sendo 19 EARi, sete EARj e um EARh, comparados com 84 pacientes do grupo controle, depararam-se com a frequência HLA-DR7 elevada, com valor estatisticamente significativo.

Em um trabalho com 106 pacientes gregos portadores de EAR (79 EARi, 10 EARj e 17 EARh) comparados com 120 pacientes saudáveis, Albanidou-Farmaki et al. (1988) encontraram a frequência HLA-DR5 com valor estatisticamente significativo para EARi e EARj. Com relação à frequência de haplótipos, a frequência A1DR5 obteve um valor estatisticamente significativo.

Sun et al. (1991) realizaram tipagem HLA classe II em 80 pacientes

chineses com EAR (45 EARi, 27 EARj e 8 EARh), confrontados com 107 pacientes do grupo controle. A frequência HLA-DRw9 apresentou valores estatisticamente significante para os três tipos de manifestação da doença. Perante este achado afirmaram que a frequência HLA-DRw9 pode ser considerada como um marcador genético para a EAR na população chinesa.

Bazrafshani et al. (2002) salientaram que o polimorfismo gênico, que significa a variação em um único locus genético, pode ocorrer com a substituição de um nucleotídeo por outro, possibilitando alterar a produção ou a função biológica de uma proteína. A hereditariedade de tal polimorfismo ou uma combinação deles pode levar a predisposição ou proteção de doenças específicas, entre elas a EAR.

A literatura mostra dados controversos ao associar moléculas HLA classe I e de classe II com EAR. Isto se deve, entre outras causas as diferenças de grupos étnicos estudados. É digno de nota que na população brasileira, que é extremamente miscigenada, não foi realizado ainda nenhum trabalho associando moléculas HLA e EAR.

#### **4 - CASUÍSTICA E MÉTODOS**

## **4.1- CASUÍSTICA**

### **4.1.1 - PACIENTES**

Este trabalho possui um desenho prospectivo, transversal e investigativo desenvolvido no período de fevereiro de 2004 a maio de 2006. Foi aprovado no comitê de ética e pesquisa da Faculdade de Medicina da USP sob o nº 876/04.

O grupo de estudo foi composto inicialmente por 58 pacientes com hipótese diagnóstica de EAR, admitidos no Ambulatório de Estomatologia da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

#### **4.1.1.1 – CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Foram incluídos no estudo apenas pacientes que relataram ter pelo menos um episódio de afta(s) por mês, por um período mínimo de um ano, com ou sem terapêutica prévia; pacientes com resultados negativos nos exames de protocolo (anexo I), resultados negativos na biópsia e na imunofluorescência direta, e ausência de doenças sistêmicas associadas.

Os pacientes participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, concordando com os procedimentos a serem adotados (anexo II).

#### **4.1.1.2 – CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Não foram aceitos neste estudo aqueles pacientes que apresentaram alterações nos exames de protocolo (anexo I), ou que nos exames histopatológico e de imunofluorescência direta apresentaram alterações características de outras doenças. Estes pacientes foram encaminhados para tratamento específico das alterações apresentadas.

#### **4.1.2 – GRUPO CONTROLE**

O grupo controle foi composto por uma seleção de voluntários saudáveis, membros do banco de dados de doadores de medula da Central de Transplante do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Esta seleção foi realizada inicialmente por 4172 brasileiros. Destes foi selecionado apenas um membro de cada família, para evitar a presença de haplótipos, totalizando no final 962 paulistanos, de ambos os sexos, com idade entre 20 e 64 anos.

### **4.3 - MÉTODO**

Os pacientes selecionados foram submetidos a anamnese, exame físico geral, otorrinolaringológico completo, laboratoriais e biópsia da lesão e da área

adjacente.

#### **4.3.1 – COLHEITA DE EXAMES**

Para a triagem laboratorial foi coletado sangue venoso, no mesmo dia da primeira consulta em nosso ambulatório e com presença de lesões ativas, para os exames de rotina nos quadros clínicos de EAR: glicemia, eletroforese de proteínas, hemograma completo, coagulograma (TP + TT + TTPA), anti-HIV 1 e 2, complemento total e frações, fator reumatóide, fatores anti-núcleo, dosagem sérica de IgA, IgG e IgM, proteína C reativa e sorologia para sífilis.

#### **4.3.2 – BIÓPSIA**

Para afastar a etiologia das úlceras relacionadas a outras doenças, tais como lesões penfigóides, Doença de Behçet, Crohn ou vasculites de outra natureza, foi realizada biópsia da(s) lesão(s) para posterior exame histopatológico e de imunofluorescência direta.

A biópsia foi efetuada sob anestesia infiltrativa com xilocaína 2% sem vasoconstritor, com a utilização de um Punch de tamanho compatível com a lesão. Foram retiradas amostras da área lesionada e da sã, sendo a primeira acondicionada num frasco contendo solução de formol a 10% e encaminhada a exame histopatológico, que foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica da Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, utilizando-se a coloração de Hematoxilina e Eosina. A segunda peça foi retirada da área adjacente à lesão,

colocada sobre uma gaze embebida em soro fisiológico a 0,9% e encaminhada imediatamente ao Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para realização da imunofluorescência direta.

#### **4.4 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)**

Os fragmentos enviados ao Laboratório de Imunopatologia Cutânea foram congelados através de meios de inclusão (Tissue Tek, Leica, Alemanha), armazenados em papel de alumínio, e mantidos em freezer a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da criomicrotomia.

Foi realizada a criosecção em criostato a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  e foram depositados três cortes de 4 micras de espessura, sobre as lâminas albuminizadas.

As lâminas foram colocadas em câmara úmida à temperatura ambiente, e sobre os cortes, foram adicionados os conjugados (anti-imunoglobulinas humanas produzidas em animais imunizados e marcados com isotiocianato de fluorescência). Os conjugados foram diluídos em TBS pH 7,5 (TBS- $\text{Ca}^{++}$ ) (“*trizma buffer* saline – tampão acetato de cálcio”), contendo 3 mg% de corante Azul de Evans (marca Interlab). Foram utilizadas anti-IgA humana, marca SIGMA (diluição de 1:20); anti-IgM humana, SIGMA (diluição 1:20); anti-IgG humana, SIGMA (diluição 1:130); e anti-C3c humana, DAKO (diluição 1:40). Para cada lâmina, utilizou-se um conjugado.

Após um período de 30 minutos de incubação, as lâminas foram lavadas em TBS pH 7,5, por duas vezes durante 10 minutos cada uma. Para cada montagem das

lâminas, utilizou-se glicerina tamponada (pH 9 / 0,5M) e lamínula de vidro.

A leitura foi realizada através de um microscópio de epiluminescência HBO 50w (filtro CB12) marca Zeiss, com ocular de 10x e lentes de 16x e 40x.

## **4.5 – EXTRAÇÃO DO DNA E TIPAGEM HLA**

### **4.5.1 – MÉTODO DE EXTRAÇÃO**

Para obtenção de DNA, foi coletado de ambos os grupos 10 ml de sangue total periférico com EDTA 25 mM.

A extração de DNA e a tipificação HLA de classe I e de classe II foram realizadas no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração - Incor.

### **4.5.2 - EXTRAÇÃO DE DNA DE SANGUE TOTAL PELO MÉTODO DTAB/CTAB**

#### **4.5.2.1 – PRINCÍPIO**

O detergente catiônico DTAB lisa as membranas celular e nuclear. O clorofórmio faz coeficiente de partição e desproteíntização, permitindo que o DNA fique na fase aquosa. A recuperação do DNA é feita pela precipitação seletiva com o detergente catiônico CTAB, seguida de lavagens para purificação do DNA (retirada dos sais).



#### 4.5.2.1.1 - PROCEDIMENTO

Inicialmente, cinco mililitros de sangue total foram centrifugados por 10 min a 1500 rpm. Em seguida, toda a camada de leucócitos (buffy-coat) entre o plasma e a fase com hemácias foi recolhida com uma pipeta Pasteur, e dividida em dois eppendorfs de dois mililitros (cerca de 500  $\mu$ l em cada um). Após, foi adicionado 500  $\mu$ l de DTAB 12% (Brometo de dodeciltrimetilamônio), homogeneizado por inversão por 30 segundos (ou até que todo o sangue entre em contato com a solução para lise completa), e colocado para incubar por cinco a dez minutos a 65-72°C.

Sem deixar esfriar, foi adicionado 1000  $\mu$ l de clorofórmio e homogeneizado imediatamente, por inversão vigorosa por 30 segundos até completa floculação. Em seguida, centrifugou-se por dois minutos a 10000 rpm; é necessária a formação de três camadas, para então o sobrenadante (onde está o DNA) ser transferido para dois novos tubos Eppendorfs, contendo um mililitro de CTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamônio ou Cetramida), então, foi feita homogeneização por inversão até formação do precipitado DNA-CTAB.

Após a formação do precipitado, foi centrifugado por dois minutos a 10000 rpm, e em seguida, acrescentado ao pellet 300  $\mu$ l de NaCl 1,2M (juntando os dois pellets em um único tubo). Um mililitro de etanol 70% foi adicionado e juntado os pellets em um único tubo eppendorf de 1,5 ml, e após, centrifugado novamente por dois minutos a 13000 rpm.

Um mililitro de etanol 100% foi adicionado e centrifugado por dois

minutos a 13000 rpm, sendo após descartado o sobrenadante, com ponteira ou por inversão, tomando cuidado para não perder o pellet de DNA. Em seguida as paredes do tubo foram secas com auxílio de cotonete, tomando cuidado para não tocar no DNA. Com o tubo invertido e aberto aguardou-se a evaporação do etanol, em torno de 5-10 min em estufa a 35°C. Por último o DNA foi dissolvido em 150-200 µl H<sub>2</sub>O, de acordo com o tamanho do pellet, sendo homogeneizado com uma pipeta.

Em seguida a concentração foi medida no espectrofotômetro (260/280 nm).

#### **4.5.2.1.2 - MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO DE DNA**

Foi feita uma diluição de 1:50 ou 1:100 num volume final 500ul do DNA com água Milli-q autoclavada. Esta diluição dependeu do tamanho do pellet formado ao final da extração. Em seguida, após calibrar o espectrofotômetro com a mesma água usada na diluição das amostras, foi lida a absorbância a 260 nm e 280 nm, e calculada a concentração seguindo a fórmula:

$$C (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 (\text{fator de diluição}) \times 50 (1\text{DO}=50\mu\text{g/ml DNA}),$$

onde:

$A_{260}$  - valor da absorbância da amostra a 260nm.

É importante lembrar que foi utilizada a relação das absorbâncias  $A_{260}/A_{280}$  para avaliar a qualidade do DNA extraído, porque as proteínas absorvem luz a 280 nm, e portanto neste comprimento de onda pode-se analisar a contaminação do DNA extraído com proteínas. Valores menores de 1,8 revelam contaminação com proteínas e acima de 2,0 contaminação com RNA.

#### **4.5.2.1.3 - ARMAZENAMENTO DO DNA**

Após a medida da concentração do DNA, as amostras foram armazenadas em geladeira a uma temperatura de 4 °C.

#### **4.5.2.2 - TIPIFICAÇÃO HLA POR PCR-SSO UTILIZANDO KITS PARA TESTES DE TIPAGEM HLA-CLASSE I, LOCOS A, B e C, E HLA-CLASSE II LOCOS DR e DQ - LABTYPE™**

##### **4.5.2.2.1- PRINCÍPIO**

Labtype Luminex é uma tecnologia de amplificação de PCR-SSO reversa. Primeiro o DNA é amplificado usando um grupo de primers específico. O produto da PCR é marcado com biotina, o qual permite ser detectado usando Estreptoavidina conjugada com Streptavidina (SAPE).

O produto de PCR é desnaturado e reibridizado com probes complementares ao DNA conjugado com microesferas fluorescentes. A análise é feita pela metodologia de Citometria de Fluxo usando o LABScan100, identificando a intensidade de fluorescência da Phicoeritrina que estão nas microesferas.

##### **4.5.2.2.2 – PROCEDIMENTO**

O frasco com as pérolas foi bem agitado no vórtex na posição

horizontal por 10 a 30 segundos, para obter uma mistura totalmente homogênea. Para evitar foto-descoloramento das pérolas, o frasco ficou envolto em papel alumínio durante o ensaio.

A máquina de PCR já estava pré-programada com a programação específica para procedimentos com Kit LabType<sup>TM</sup>, conforme mostrado na Tabela 1, e em seguida o termociclador foi ligado para dar início ao aquecimento da tampa.

Após utilizar uma placa nova de PCR de 96 poços, e acondicioná-la em banho de gelo, juntamente com o DNA, os primers de amplificação e as D-mix foram mantidas em gelo até o momento do uso, o DNA genômico teve sua concentração ajustada para 20ng/ul usando água estéril.

Antes de sua utilização a D-Mix foi agitada em vórtex por 15 segundos para que descesse ao fundo do frasco o que estivesse preso na tampa. Usando a Tabela 2 as quantidades de D-mix e Primers foram misturadas, e em seguida agitadas em vórtex por 15 segundos e colocadas no banho de gelo. A Taq polimerase foi adicionada imediatamente antes do uso.

Foram dispensados 8,49 ul do mix (Dmix + Primer + Taq) colocando, por último, 2 µl de DNA a 20 ng/µl na borda do tubo. Após ter dispensado todas as amostras a placa foi fechada com o selo e levada para a centrífuga, onde um pulso a 2000 RPMs foi dado para o DNA descer até o fundo do poço. Em seguida foi homogeneizada por 10 segundos no vórtex e levada ao termociclador, colocando a borracha sobre a placa para fazer a amplificação.

Após a amplificação, este material foi colocado para correr em gel de agarose a 2,5% por 10 minutos a 150V para confirmar o sucesso do procedimento; sendo em seguida armazenado o produto a -20<sup>0</sup>C.

Tabela 1 – Programa PCR para LabType™ SSO

Step	Temperatura e Tempo	Número de ciclos
Step 1	96 <sup>0</sup> C 03:00	1
Step 2	96 <sup>0</sup> C 00:20 60 <sup>0</sup> C 00:20 72 <sup>0</sup> C 00:20	5
Step 3	96 <sup>0</sup> C 00:10 60 <sup>0</sup> C 00:15 72 <sup>0</sup> C 00:20	30
Step 4	72 <sup>0</sup> C 10:00	1
Step 5	4 <sup>0</sup> C infinito	1

Tabela 2 – Mistura de amplificação

Número de amostras	Primer (específico) (µl)	Dmix (µl)	Taq (µl)
1	2	6.9	0.1
8	16	55.2	0.8
16	32	110.4	1.6
24	48	165.6	2.4
32	64	220.8	3.2
96	192	662.4	9.6

#### 4.5.2.2.3 – DESNATURAÇÃO / NEUTRALIZAÇÃO

Anteriormente ao processo foi preparado um banho de gelo picado, onde foi colocado a placa de 96 poços de PCR, para transferência de 2,5 µl de cada

amostra de DNA amplificado. Em seguida foi adicionado 1,3 µl de tampão de desnaturação (TD), a placa foi então centrifugada a 2000 rpm (um pulso rápido), agitada no vórtex e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Após a incubação foi adicionado 2,5 µl de tampão de neutralização (TN) e agitado até ficar amarelo claro (se não ficasse amarelo deveria ser adicionado 0,5 µl de TN até atingir a cor desejada). Ao final deste processo a placa de PCR ficou no banho de gelo aguardando a próxima etapa.

#### **4.5.2.2.4 – HIBRIDIZAÇÃO**

Antes de iniciar esta etapa o termociclador foi ligado para que atingisse a temperatura de 60<sup>0</sup>C.

Para preparar a Mistura de Hibridização foram combinados volumes apropriados de Mistura de Pérolas e Tampão de Hibridização, sendo posteriormente adicionado 3,8 µl desta mistura a cada poço, selada a placa, agitada no vórtex e colocada no termociclador pré-aquecido a 60<sup>0</sup>C por 15 minutos.

Após este período, foi removido o selador da placa e rapidamente (para não esfriar) adicionado 100 µl de Tampão de Lavagem em cada poço, selada a placa e centrifugada por cinco minutos a 2600 rpm e flincada. Este processo foi repetido por duas vezes, fazendo um total de três etapas de lavagem.

#### **4.5.2.2.5 – MARCAÇÃO**

A solução SAPE 1X é bastante sensível à luz, portanto durante seu

preparo ela foi protegida da luminosidade. A quantidade a ser preparada obedeceu à Tabela 3, sendo homogeneizada por um minuto por imersão em recipiente protegido da luz.

Foram adicionados 23,7  $\mu\text{l}$  de solução SAPE 1X em cada poço da placa de PCR, agitado por 20 segundos e incubado por cinco minutos a 60<sup>0</sup>C no termociclador. Após a incubação foi acrescentado rapidamente 40  $\mu\text{l}$  de Tampão de Lavagem, centrifugado por cinco minutos a 2600 rpm e flincado.

Em seguida, foi adicionado 70  $\mu\text{l}$  de Tampão de Lavagem, em cada poço, agitando delicadamente por pipetagem, para posterior transferência para a placa de leitura (ELISA), usando uma pipeta multicanal de oito poços. A placa foi selada com papel alumínio, mantida no escuro e a 4<sup>0</sup>C até que fosse colocada no LabScan<sup>TM</sup>100 para leitura.

Tabela 3 – Quantidade de solução SAPE estoque ( $\mu\text{l}$ ) X Tampão SAPE ( $\mu\text{l}$ ) em relação ao número de testes

Número de testes	Solução SAPE estoque ( $\mu\text{l}$ )	Tampão SAPE ( $\mu\text{l}$ )
1	0,25	24,75
8	2	198
12	3	297
16	4	396
24	6	594
32	8	792
96	24	2376

#### **4.5.2.2.6 – LEITURA DA AMOSTRA**

O LabScan<sup>TM</sup>100 foi ligado 30 minutos antes para aquecer o laser.

Depois de aquecido (warmup) foi lavado duas vezes com o fluido de circulação (sheath fluid) para retirada de bolhas maiores, em seguida colocado álcool 70% no reservatório, este fluxo removeu qualquer pequena bolha de ar que estava presente no interior do sistema. O reservatório externo, onde entraram as amostras, foi lavado em seguida utilizando-se o sheath-fluid colocado ao lado da placa.

Após apertar o eject, abriu-se o local onde foi colocada a placa de ELISA e em seguida fechada a plataforma, ocorrendo o início do processo de leitura das amostras.

Ao término da leitura e análise, havendo amostras que apresentavam tipificação dúbia ou errônea, foi utilizada a tipificação por SSP com kits comerciais hla classe I e hla classe II.

#### **4.5.2.3- TIPIFICAÇÃO HLA POR PCR SSP UTILIZANDO KITS COMERCIAIS HLA-CLASSE I E HLA-CLASSE II**

##### **4.5.2.3.1- PRINCÍPIO**

O método SSP baseia-se em amplificação com iniciadores (*primers*) específicos para seqüências (SSP) já publicados. Os conjuntos de iniciadores (*primers*) amplificam os alelos descritos pelo comitê internacional de nomenclatura



em Novembro de 1996. A maioria das combinações heterozigotas podem ser determinadas empregando-se este método, entretanto, algumas não podem ser distinguidas.

#### **4.5.2.3.2- PROCEDIMENTO**

É importante lembrar a necessidade da execução da reação de controle de contaminação (Tubo de Controle de Água) em cada tipagem. Adicionou-se 50  $\mu$ l de água deionizada autoclavada em um tubo limpo de polipropileno de 0.5 mL (ou maior), e em seguida, colocou-se o tubo aberto contendo os 50  $\mu$ L de água em um lado da área de execução do teste e, então, prosseguiu-se com a execução do teste.

Para descongelar o tampão para PCR utilizaram-se tubos de polipropileno de 0.5 mL (ou maiores), agitando em vórtex e aliquotando o tampão para PCR em volumes adequados para o uso com o kit específico, observando a Tabela 4 para os volumes necessários.

Uma placa do freezer foi retirada, removendo cuidadosamente o adesivo da SSP. A Taq DNA Polimerase também foi retirada do freezer, porém mantida em banho de gelo durante a execução do teste. Água e Taq DNA Polimerase foram adicionadas ao tampão para PCR aliquotado e agitadas brevemente, não esquecendo de observar a Tabela 4 para volumes específicos de água e Taq para cada kit.

Em seguida, foi retirado 8  $\mu$ L desta mistura e adicionado ao poço controle de contaminação, somando a isto 1  $\mu$ L de água do tubo e adicionado o volume da amostra de DNA, completamente homogeneizada (75-125 ng/ $\mu$ L) à

mistura de tampão restante, como indicado na Tabela 4, agitando no vórtex posteriormente.

Usando um pipetador eletrônico de descarte, 8  $\mu$ L foram dispensados em cada um dos poços restantes; tendo o cuidado de dispensar as gotas nas paredes laterais, próximo à parte de cima de cada poço, permitindo que a gota escorresse para baixo; não deixando que a ponteira da pipeta tocasse no fundo do poço.

Foi colocado o lacre plástico adesivo sobre a placa, pressionando-o suavemente, assegurando que a mesma estivesse completamente lacrada.

A placa lacrada foi posta no termociclador e sobre ela o “Bloco de Equalização de Calor”, começando, em seguida, a seqüência de ciclos térmicos.

Após a seqüência destes ciclos, a placa foi removida e realizada a eletroforese em gel.

Tabela 4 - Volumes específicos de água e Taq para cada kit

Nome do produto	ABC,ABDR ABDRDQ	Locus B	Locus C, DR-4 Teste	DRDQ	Locus A	DR-3 Teste
Nº de testes por placa	1	2	4	2	4	3
Nº de misturas de iniciadores ( <i>Primers</i> ) por teste	96	48	24	40	24	32
Nº de localização dos poços de cada teste	Poços 1 - 96	Teste 1: Poços 1 -48 Teste 2: Poços 49-96	Teste 1: Poços 1-24 Teste 2: Poços 25-48 Teste 3: Poços 49-72 Teste 4: Poços 73-96	Teste 1: Poços 1-40 Teste 2: Poços 57-96	Teste 1: Poços 1-24 Teste 2: Poços 25-48 Teste 3: Poços 49-72 Teste 4: Poços 73-96	Teste 1: Poços 1-32 Teste 2: Poços 33-64 Teste 3: Poços 65-96

continua

Tabela 4 - Volumes específicos de água e Taq para cada kit (conclusão)

Passo 1: Descongelar e aliquotar tampão	Descongelar tampão, agitar em Vortex	Descongelar tampão, agitar em Vortex, aliquotar 270 $\mu\text{L}$ em tubo separado	Descongelar tampão, agitar em Vortex, aliquotar 135 $\mu\text{L}$ em tubo separado	Descongelar tampão, agitar em Vortex, aliquotar 235 $\mu\text{L}$ em tubo separado	Descongelar tampão, agitar em Vortex, aliquotar 135 $\mu\text{L}$ em tubo separado	Descongelar tampão, agitar em Vortex, aliquotar 180 $\mu\text{L}$ em tubo separado
Passo 2: Preparar UniTray™	Colocar a placa no suporte e remover o lacre.	Cortar a parte que contém 1 teste (metade da placa) quando executar uma única tipagem. Colocar a placa no suporte e remover o lacre.	Cortar a parte que contém 1 teste (a cada 3ª fileira) quando executar uma única tipagem. Colocar a placa no suporte e remover o lacre.	Cortar a parte que contém 1 teste (fileira 1- 5 ou 8-12) quando executar uma única tipagem. Colocar a placa no suporte e remover o lacre.	Cortar a parte que contém 1 teste (a cada 3ª fileira) quando executar uma única tipagem. Colocar a placa no suporte e remover o lacre.	Cortar a parte que contém 1 teste (a cada 4ª fileira) quando executar uma única tipagem. Colocar a placa no suporte e remover o lacre.
Passo 3: Adicionar água ao tampão de PCR	268 $\mu\text{L}$	125 $\mu\text{L}$	62 $\mu\text{L}$	94 $\mu\text{L}$	62 $\mu\text{L}$	84 $\mu\text{L}$
Passo 4 : Adicionar Taq polimerase e agitar no vórtex	9.3 $\mu\text{L}$	4.3 $\mu\text{L}$	2.2 $\mu\text{L}$	3.8 $\mu\text{L}$	2.2 $\mu\text{L}$	2.9 $\mu\text{L}$
Passo5: Preparar controle negativo (último poço de cada teste)	Pipetar 8 $\mu\text{L}$ no poço de controle de contaminação	Pipetar 8 $\mu\text{L}$ no poço de controle de contaminação	Pipetar 8 $\mu\text{L}$ no poço de controle de contaminação	Pipetar 8 $\mu\text{L}$ no poço de controle de contaminação	Pipetar 8 $\mu\text{L}$ no poço de controle de contaminação	Pipetar 8 $\mu\text{L}$ no poço de controle de contaminação
Passo 6: Adicionar DNA (75- 100ng/ $\mu\text{L}$ ) e agitar no vórtex	80 $\mu\text{L}$	37 $\mu\text{L}$	19 $\mu\text{L}$	31 $\mu\text{L}$	19 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
Passo 7** Dispensar nos poços restantes	8 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{L}$

#### 4.5.2.4. ELETROFORESE EM GEL

Foi utilizada uma agarose com capacidade de resolução de fragmentos de DNA de 50 a 2000 pares de base, de gradiente DNA a 2%. Inicialmente foi

preparado o gel com o tampão TBE 0.5X, após aquecimento a 60° C, 2 µL de brometo de etídio 10 mg/m, foi adicionado para cada 100 mL de solução de agarose e misturado. Em seguida, o gel foi despejado na placa de moldagem e deixado esfriar à temperatura ambiente por pelo menos 30 minutos.

Após o preparo da agarose a 2%, 160 mL foram despejados usando quatro pentes de microtitulação para 25 poços, colocando um na parte superior e os outros na inferior, à mesma distância. Foi deixada esfriar por 30 minutos, removidos os pentes do gel e transferido o gel para a câmara de eletroforese.

A câmara de eletroforese foi preenchida com o tampão TBE 0.5X. Usando um pipetador de 8 canais, foram adicionados 8 µL de tampão para aplicação de amostras no gel em todos os poços da placa, em seguida, 5 µL de marcador para PCR foram colocados em cada um dos 4 poços da 9ª fileira, enumeradas a partir da esquerda do gel. Utilizando um pipetador de 8 canais, misturou-se o produto da PCR duas vezes.

Cuidadosamente, foi transferido 14 µl de produtos da PCR/tampão para os poços do gel de agarose a 2 %, aspirando de início os poços A-1 até H-1, e transferindo-os para as primeiras 9 fileiras do gel – poços 1 a 8 do primeiro pente (Quadro 1).

Através da eletroforese o DNA foi separado a 150 volts por 22 minutos usando a unidade de eletroforese. Por último, foi desligada a eletricidade, desconectados os eletrodos, removido o gel e fotografado sobre o transiluminador UV.

Quadro 1 - Planilha de aplicação de amostras no gel

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Fileira 1											
B	Fileira 2											
C												
D												
E												
F												
G												
H												

#### 4.5.2.5. INTERPRETAÇÃO

Fixada a foto do gel ao formulário de documentação, ela foi examinada cuidadosamente e as fileiras positivas determinadas.

Cada fileira do gel, onde foi dispensada uma amostra de PCR, deveria apresentar uma banda controle, exceto na fileira que continha o poço controle de contaminação.

A banda controle podia ou não ser amplificada eficientemente, quando houvesse produto específico presente devido à competição por substrato. Os primers controle estavam presentes em concentrações mais baixas, a fim de favorecer a reação alelo-específica.

Uma banda dupla de fraca intensidade de aproximadamente 1600 pares de base podia aparecer em todas as fileiras, isso era uma indicação de amplificação intensa. A ausência de bandas controle sem amplificação específica eram indicativas de reações falhas. Uma reação de PCR falha não muda a designação do alelo, não havendo a necessidade de repetição do teste. Se, entretanto, houvesse um resultado aparentemente homocigoto ou se a reação falha alterasse a designação

dos alelos, a tipificação seria repetida.

Os primers não utilizados formaram uma banda difusa que co-migrava com a mancha laranja da frente do gel. O dímero do iniciador (*primer dimer*) normalmente aparecia como uma banda difusa de até 80 pares de base, acima da banda do primer não utilizado, mas abaixo da área onde o produto específico se localizava.

As reações falso-negativas poderiam ser causadas por amplificação ineficiente, DNA de baixa qualidade, colocação desigual da placa no bloco, variações de temperatura entre os poços do termociclador em si ou calibração inadequada do termociclador.

Uma reação falso-negativa poderia ser detectada, encontrando-se ausência de reações dentro de um padrão de reatividade específica para um alelo em particular. É possível que em raras reações falso-negativas ocorressem devido a um alelo novo ou ainda não caracterizado.

O poço controle de contaminação contém pares de primers que amplificam o DNA produzido por ampliações de PCR específicas ou DNA genômico. Se a mistura tampão/Taq negativa fosse adicionada conforme as instruções, qualquer banda neste poço evidenciaria uma contaminação do teste, e os resultados obtidos seriam invalidados.

O teste não poderia ser invalidado se uma banda de até 80 pares de base estivesse presente, pois sabe-se que primer dimers ocorrem ocasionalmente.

Em seguida, o par de bases aproximado foi checado na tabela de especificidade para confirmar o tamanho correto do produto. As fileiras positivas foram marcadas na planilha de leitura. Usando uma caneta marca-texto, cada fileira

positiva foi destacada (coluna) com uma linha vertical percorrendo as colunas da planilha de cima para baixo.

Para cada alelo ou grupo de alelos indicados nas duas primeiras colunas da tabela de análise, uma régua foi alinhada de um lado a outro da folha e iniciada a procura dos alelos da esquerda para a direita da planilha. A primeira determinação de alelo foi feita destacando a linha, com uma caneta marca-texto, apenas onde todos os retângulos pretos para a escolha daquele alelo caíssem dentro das fileiras destacadas.

A segunda escolha de alelos foi apontada, continuando a procurar os alelos como anteriormente, fazendo uma revisão completa da planilha para determinar todas as possíveis designações de alelos, e considerando todas as fileiras positivas pelo menos uma vez, não se pode esquecer que as fileiras podiam ser usadas para designar mais de um alelo.

É importante certificar de que todas as fileiras necessárias para um alelo em particular são positivas, antes de assinalá-lo como um alelo específico encontrado. Bandas extras de tamanho correto, mas que não se encaixavam no padrão de interpretação, foram consideradas falso-positivos.

#### **4.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Foi utilizada uma amostra de conveniência consecutiva de 30 pacientes. A partir das prevalências dos diferentes antígenos HLA no grupo controle (com dados referentes a 961 indivíduos saudáveis), determinando-se a possibilidade de erro tipo I em 0,05 (5 %) bidirecional e a possibilidade de erro tipo II em 0,2

(20%) (poder do estudo 80%;  $1 - \beta$ ), a utilização de uma amostra de 30 indivíduos com EAR será capaz de detectar diferenças estatisticamente significantes para cada alelo, na ordem dos percentuais mínimos apresentados na tabela 1.

Tabela 5: Diferenças mínimas detectáveis para cada gene, utilizando-se uma amostra de 30 pacientes e estabelecendo-se a possibilidade de erro tipo I em 5% bidirecional e tipo II em 80%

Alelo	Prevalência (%) no Grupo Controle (n = 961)	Diferença mínima para associação estatisticamente significativa	
A1	15,9	+ 13,1 %	- 15,9 %
A2	46,1	+ 18,4 %	- 17,1 %
A3	18,1	+ 14,2 %	- 14,9 %
A10	0,1	+ 6,4 %	-
A11	8,8	+ 13,8 %	-
A23	11,8	+ 10,3 %	- 11,8 %
A24	17,8	+ 14,5 %	- 14,6 %
A25	2,2	+ 7,5 %	-
A26	5,8	+ 10,3 %	-
A28	0,8	+ 5,7 %	-
A29	8,4	+ 11,0 %	-
A30	12,0	+ 13,8 %	- 12,0 %
A31	8,2	+ 11,2 %	-
A32	5,3	+ 10,8 %	-
A33	6,5	+ 9,6 %	-
A34	2,1	+ 7,6%	-
A36	0,8	+ 5,7 %	-
A66	1,9	+ 7,8 %	-
A68	10,7	+ 15,1 %	-
A69	0,2	+ 6,3 %	-
A74	3,4	+ 9,5 %	-
A80	0,4	+ 6,1%	-
B7	13,9	+ 15,1 %	- 13,9 %
B8	7,6	+ 11,8 %	-
B13	4,2	+ 8,7 %	-
B14	1,1	+ 8,6 %	-
B15	0,9	+ 5,6 %	-
B17	0,1	+ 6,4 %	-

continua



Tabela 5: Diferenças mínimas detectáveis para cada gene, utilizando-se uma amostra de 30 pacientes e estabelecendo-se a possibilidade de erro tipo I em 5% bidirecional e tipo II em 80% (continuação)

B18	9,3	+ 13,3 %	-
B27	3,4	+ 9,5 %	-
B35	21,2	+ 17,5 %	- 14,7 %
B37	2,0	+ 7,7 %	-
B38	3,7	+ 9,2 %	-
B39	5,7	+ 10,4 %	-
B40	0,1	+ 6,4 %	-
B41	2,8	+ 10,1 %	-
B42	3,0	+ 9,9 %	-
B44	18,3	+ 14,0 %	- 15,1 %
B45	6,1	+ 10,0 %	-
B46	0,2	+ 6,2 %	-
B47	0,3	+ 6,1 %	-
B48	0,7	+ 5,8 %	-
B49	5,4	+ 10,7 %	-
B50	5,1	+ 11,0 %	-
B51	14,7	+ 14,3 %	- 14,7 %
B52	3,6	+ 9,3 %	-
B53	4,6	+ 11,5 %	-
B55	1,9	+ 7,8 %	-
B56	0,3	+ 6,1 %	-
B57	4,6	+ 11,5 %	-
B58	5,8	+ 10,3 %	-
B60	5,7	+ 10,4 %	-
B61	4,0	+ 8,9 %	-
B62	6,8	+ 12,6 %	-
B63	2,1	+ 7,6 %	-
B64	2,5	+ 7,2 %	-
B65	8,8	+ 13,8 %	-
B67	0,1	+ 6,4 %	-
B71	4,1	+ 8,8 %	-
B72	4,3	+ 8,6 %	-
B73	0,3	+ 6,2 %	-
B75	0,4	+ 6,1 %	-
B78	0,1	+ 6,4 %	-
B81	0,8	+ 5,7 %	-
DR1	19,5	+ 16,0 %	- 16,3 %
DR3	0,3	+ 6,2 %	-
DR4	23,8	+ 18,1 %	- 17,3 %
DR7	24,9	+ 17,0 %	- 17,2 %
DR8	9,9	+ 12,7 %	-
DR9	3,6	+ 9,3 %	-
DR10	3,9	+ 9,0 %	-
DR11	23,7	+ 18,2 %	- 15,2 %

continua

Tabela 5: Diferenças mínimas detectáveis para cada gene, utilizando-se uma amostra de 30 pacientes e estabelecendo-se a possibilidade de erro tipo I em 5% bidirecional e tipo II em 80% (conclusão)

DR12	4,3	+ 8,6 %	-
DR13	22,1	+ 16,6 %	- 15,6 %
DR14	8,4	+ 11,0 %	-
DR15	20,6	+ 14,9 %	- 14,1 %
DR16	7,8	+ 11,6 %	-
DR17	14,9	+ 14,1 %	- 14,9 %
DR18	2,4	+ 7,3 %	-

Para avaliar se houve associação entre antígenos HLA e seus subgrupos com a EAR, foram comparadas as prevalências de cada antígeno entre os grupos com EAR e controle, aplicando-se o teste do Qui-quadrado e o teste exato de Fisher. Uma determinada associação foi considerada estatisticamente significativa quando o nível descritivo do teste (p) fosse menor do que 0,05 (ou 5%).

Para estimar a força das associações encontradas, foram calculados os riscos relativos (RR) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%).

Para o cálculo dos valores foi utilizado o programa SPSS, versão 12, um software de análises estatísticas desenvolvido pela SPSS Inc..

**5- RESULTADOS**

Dos 58 pacientes iniciais, três foram encaminhados para tratamento com diagnóstico de sífilis, cinco apresentaram sorologia positiva para HIV, dois estavam com glicemia elevada, sendo então encaminhados para tratamento endocrinológico, quatro apresentaram anemia, e após terapia para reposição de ferro cessaram as aftas, e 13 pacientes desistiram do estudo por motivos diversos. Sendo assim, ao final do estudo obteve-se 31 participantes do grupo de estudo (Tabela 6).

O resultado dos exames Histopatológico revelaram processo inflamatório crônico inespecífico ulcerado em 87,18% dos casos, processo inflamatório crônico inespecífico erosivo em 5,13%, sialodente crônica em 5,13%, e mucosa malpighiana ulcerada com formação de tecido de granulação em 2,56% (Tabela 6).

Nos exames de Imunofluorescência Direta, 91,67% dos casos apresentaram resultado negativo para fluorescência tanto para IgA, IgG, IgM e C3, já 8,33% dos casos mostraram fluorescência para C3 na zona de membrana basal (Tabela 6).

Dos 31 pacientes do grupo de estudo 17 (54,84%) eram do sexo feminino, enquanto 14 (45,16%) do sexo masculino, as idades variaram de 7 a 70 anos, obtendo-se uma média aritmética de 36,14 anos e desvio padrão de 15,33.

Obteve-se uma maior incidência de EAR nos pacientes com idade entre 20-30 anos (oito pacientes), enquanto sete pacientes com faixa etária entre 30-40 anos e 40-50 anos apresentaram a doença. As menores incidências foram observadas entre 0-10 anos e acima de 70 anos, apenas um paciente em cada faixa etária (Figura 03).

Tabela 6 - Dados demográficos dos pacientes estudados

Paciente	Idade	Sexo	Tipo	Exame Histológico	IFD	Observação
1	15	M	Major	PICIU <sup>2</sup>	Negativa	
2	32	F	Minor	PICIU	Negativa	
3	21	M	Major			HIV+
4	25	M	Minor	PICIU	C3/1 + ZMB <sup>3</sup>	
5	26	M	Minor	PICIU	Negativa	
6	62	M	Minor	PICIU	Negativa	
7	17	F	Minor	PICIU	Negativa	
8	13	F	Major			Desistiu
9	72	M	Minor			Glicemia Elevada
10	25	F	Minor	PICIU	Negativa	
11	48	M	Major	PICIU	Negativa	
12	17	F	Minor	PICIU		Desistiu
13	35	M	Minor			Sífilis
14	46	F	Minor			Desistiu
15	9	F	Minor			Anemia
16	31	F	Minor	PICIU	Negativa	
17	29	M	Major			HIV +
18	27	M	Major			HIV+
19	22	F	Minor	PICIU	C3/1 + ZMB	Desistiu
20	11	M	Major			Desistiu
21	29	M	minor			Desistiu
22	47	F	Minor	PICIU	Negativa	
23	34	F	Major	PICIE <sup>4</sup>	Negativa	
24	38	F	Minor	PICIU	Negativa	

continua

<sup>2</sup> PICIU - Processo inflamatório crônico inespecífico ulcerado<sup>3</sup> C3/1 + ZMB - C3/1 presença positiva na zona de membrana basal<sup>4</sup> Processo inflamatório crônico inespecífico erosivo

Tabela 6 - Dados demográficos dos pacientes estudados (continuação)

25	68	F	Minor	MMUFTG <sup>5</sup>	Negativa	
26	46	M	Minor	PICIU	Negativa	
27	52	M	Minor	PICIU	Negativa	
28	70	M	Major	PICIU	Negativa	
29	24	M	Major			HIV +
30	46	M	Minor	SC <sup>6</sup>	Negativa	Desistiu
31	29	F	Minor			Desistiu
32	7	F	Major	PICIU	Negativa	
33	25	M	Minor	PICIU	Negativa	
34	28	F	Minor	PICIU	Negativa	
35	53	M	Minor	PICIU	Negativa	
36	23	M	Minor	PICIU	Negativa	
37	22	M	Minor			HIV +
38	42	F	Minor			Sífilis
39	41	F	Major	PICIU	Negativa	
40	52	F	Major			Anemia
41	59	F	Minor	PICIU	Negativa	Desistiu
42	37	F	Minor	PICIU	Negativa	
43	27	F	Minor			Anemia
44	41	F	Minor	PICIU		Desistiu
45	54	F	Major			Glicemia Elevada
46	33	F	Major	PICIU	Negativa	
47	28	M	Minor	PICIE	C3/1 + ZMB	
48	18	F	Minor	PICIU	Negativa	
49	45	M	Major	PICIU	Negativa	
50	22	M	Minor	PICIU	Negativa	Desistiu
51	32	M	Minor	SC	Negativa	

continua

<sup>5</sup> Mucosa malpighiana ulcerada com formação de tecido de granulação<sup>6</sup> Sialodente crônica

Tabela 6 - Dados demográficos dos pacientes estudados (conclusão)

52	25	F	major			Sífilis
53	28	F	Major	PICIU	Negativa	
54	40	F	Minor	PICIU		Desistiu
55	9	F	Minor			Anemia
56	24	F	Major	PICIU	Negativa	Desistiu
57	44	F	Major	PICIU	Negativa	
58	44	F	Minor	PICIU	Negativa	

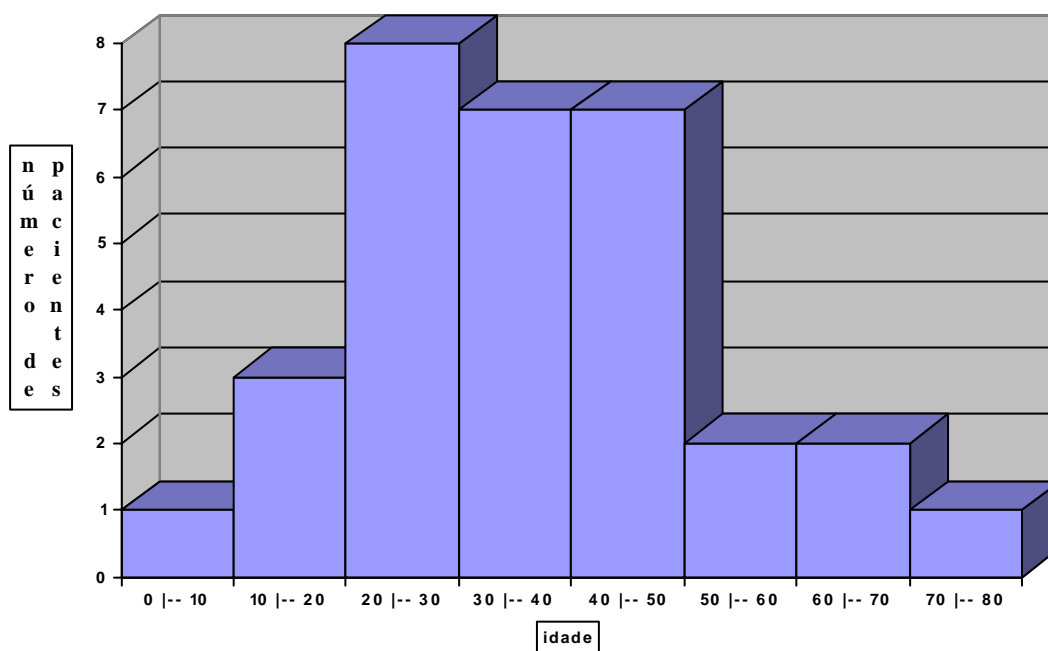


Figura 3 - Distribuição do número de pacientes com EAR segundo a idade

Com relação ao tipo de aftas que os participantes do grupo de estudo possuíam, 21 (67,74%) apresentavam aftas tipo minor, 10 (32,26%) aftas tipo major e nenhum (0,00%) apresentou aftas tipo herpetiforme (Tabela 7).

Dos 21 pacientes (67,74%) que apresentavam aftas tipo minor, 11 (52,38%)

eram do sexo feminino e 10 (47,62%) do sexo masculino. Em relação aos pacientes portadores de aftas tipo major, seis (60,00%) eram do sexo feminino e quatro (40,00%) do sexo masculino, totalizando 10 pacientes (32,26% da amostra) (Tabela 7).

As frequências de antígenos HLA classes I e II, em número e porcentagem, dos pacientes do grupo controle encontram-se na Tabela 8.

Tabela 7 - Distribuição do número e porcentagem dos pacientes portadores de EAR

Tipo	Sexo	Total
Minor	11 F (52,38%) / 10 M (47,62%)	21 (67,74 %)
Major	6 F (60,00%) / 4 M (40,00%)	10 (32,26 %)
Herpetiforme	0 F (0,00%) / 0 M (0,00%)	0 (0,00 %)
Total	17 F (54,84) / 14 M (45,16%)	31 (100,00 %)

Com relação à tipagem da frequência de antígenos HLA classe I e II a Tabela 9 mostra a frequência de cada paciente.

Tabela 8 - Frequência e porcentagem dos antígenos HLA classe I e Classe II dos pacientes do grupo controle

HLA	N	%	HLA	n	%	HLA	n	%	HLA	n	%
A1	153	15,9	B1	3	0,3	B47	3	0,3	DR1	187	19,5
A2	443	46,1	B4	40	4,2	B48	5	0,5	DR3	3	0,3

Continua



Tabela 8 - Frequência e porcentagem dos antígenos HLA classe I e Classe II dos pacientes do grupo controle continuação (conclusão).

A3	174	18,1	B7	93	9,7	B49	23	2,4	DR4	229	23,8
A10	1	0,1	B8	67	7,0	B50	31	3,2	DR7	239	24,9
A11	85	8,8	B9	14	1,5	B51	52	5,4	DR8	95	9,9
A23	113	11,8	B10	24	2,5	B52	20	2,1	DR9	35	3,6
A24	171	17,8	B11	122	12,7	B53	30	3,1	DR10	37	3,9
A25	21	2,2	B13	155	16,1	B55	13	1,4	DR11	228	23,7
A26	56	5,8	B14	64	6,7	B56	3	0,3	DR12	41	4,3
A28	8	0,8	B15	111	11,6	B57	23	2,4	DR13	212	22,1
A29	81	8,4	B16	53	5,5	B58	41	4,3	DR14	81	8,4
A30	115	12,0	B17	116	12,1	B60	43	4,5	DR15	198	20,6
A31	79	8,2	B18	44	4,6	B61	33	3,4	DR16	75	7,8
A32	51	5,3	B27	9	0,9	B62	46	4,8	DR17	143	14,9
A33	62	6,5	B35	98	10,2	B63	16	1,7	DR18	23	2,4
A34	20	2,1	B37	10	1,0	B64	19	2,0			
A36	8	0,8	B38	14	1,5	B65	57	5,9			
A66	18	1,9	B39	27	2,8	B67	1	0,1			
A68	103	10,7	B40	1	0,1	B71	35	3,6			
A69	2	0,2	B41	13	1,4	B72	37	3,9			
A74	33	3,4	B42	17	1,8	B73	3	0,3			
A80	4	0,4	B44	46	4,8	B75	4	0,4			
			B45	24	2,5	B78	1	0,1			
			B46	2	0,2	B81	8	0,8			
						B1508	6	0,6			

Tabela 9 - Distribuição quanto à frequência HLA classe I e classe II de 31 pacientes com EAR

Paciente	HLA-A	HLA-B	HLA-Dr	Paciente	HLA-A	HLA-B	HLA-Dr
<b>1</b>	A1 A11	B35 B63	DR13 DR16	<b>17</b>	A32 A66	B35 B58	DR4 DR11
<b>2</b>	A23 A26	B50 B51	DR4 DR13	<b>18</b>	A11 A11	B7 B35	DR15 DR103
<b>3</b>	A24 A24	B35 B65	DR1 DR16	<b>19</b>	A2 A24	B18 B35	DR8 DR17
<b>4</b>	A25 A34	B7 B42	DR7 DR10	<b>20</b>	A1 A2	B37 B50	DR7 DR103
<b>5</b>	A33 A68	B65 B71	DR1 DR 17	<b>21</b>	A1 A3	B35 B57	DR11 DR17
<b>6</b>	A2 A2	B7 B61	DR10 DR11	<b>22</b>	A1 A23	B18 B81	DR7 DR11
<b>7</b>	A2 A32	B18 B35	DR4 DR16	<b>23</b>	A24 A31	B35 B51	DR11 DR13
<b>8</b>	A2 A66	B35 B58	DR13 DR17	<b>24</b>	A2 A29	B44 B64	DR7 DR17
<b>9</b>	A74 A74	B35 B81	DR9 DR14	<b>25</b>	A2 A3	B51 B62	DR13 DR16
<b>10</b>	A3 A29	B35 B44	DR8 DR7	<b>26</b>	A31 A33	B39 B65	DR1 DR8
<b>11</b>	A1 A24	B13 B56	DR1 DR15	<b>27</b>	A24 A30	B8 B35	DR11 DR17
<b>12</b>	A23 A80	B44 B72	DR4 DR7	<b>28</b>	A3 A33	B35 B49	DR7 DR7
<b>13</b>	A24 A33	B35 B49	DR7 DR15	<b>29</b>	A11 A33	B13 B35	DR15 DR15
<b>14</b>	A24 A29	B51 B64	DR7 DR11	<b>30</b>	A2 A33	B41 B65	DR1 DR17
<b>15</b>	A2 A23	B50 B51	DR7 DR11	<b>31</b>	A2 A24	B18 B62	DR8 DR15
<b>16</b>	A2 A30	B18 B39	DR14 DR17				

As frequências HLA classe I que apareceram com valor estatisticamente significativo no grupo de estudo, quando comparado no grupo controle, foram A33 19,4% (seis pacientes) no grupo de estudo, e 6,5% (62 pacientes) no grupo controle

( $p=0,016$ ); B81 6,5% (dois pacientes) no grupo de estudo, e 0,8% (oito pacientes) no grupo controle ( $p=0,036$ ); e B35 48,4% (15 pacientes) no grupo de estudo, e 21,2% (204 pacientes) no grupo controle ( $p<0,001$ ) (Tabela 10).

As freqüências HLA classe II do grupo de estudo que apresentaram maior índice foram Dr7 presente em 10 pacientes (16,13%), Dr11 e Dr 17, ambos presentes em oito pacientes (12,90%); quando comparados com o grupo controle não houve diferença estatisticamente significativa.

Tabela 10 - Freqüência de Antígenos HLA classes I em pacientes com Estomatite Aftóide Recorrente (EAR)

	Grupo		p	RR (IC 95%)
	EAR (n = 31)	Controles (n = 961)		
A33	6 (19,4 %)	62 (6,5 %)	0,016	3,48 (1,38 – 8,80)
B35	15 (48,4 %)	204 (21,2 %)	< 0,001	3,48 (1,69 – 7,16)
B81	2 (6,5 %)	8 (0,8 %)	0,036	8,22 (1,67 – 40,41)

RR = Risco Relativo; IC = Intervalo de Confiança

Ao avaliar-se individualmente as freqüências HLA que apresentaram maior índice e o tipo de afta, observou-se que para os pacientes com aftas tipo minor (21 pacientes) a freqüência HLA A33 esteve presente em quatro pacientes (19,0%), quando comparado com o grupo controle obteve-se um  $p=0,047$ , risco relativo / intervalo de confiança de 3,27 / (1,1 – 9,4). Para B35, presente em 12 pacientes (57,1%) obteve-se um valor para  $p < 0,001$ , com risco relativo / intervalo de

confiança de 4,73 / (2,0 – 11,1). Para a frequência HLA B81, presente em um paciente (4,8%) com afta tipo minor, quando comparada com a mesma frequência do grupo controle obteve-se um valor para  $p=0,177$ , não significativo (Tabela 11).

Tabela 11 - Frequência de Antígenos HLA classes I em pacientes com Estomatite Aftóide Recorrente Minor comparados com Grupo Controle

	Grupo		p	RR (IC 95%)
	Afta Minor (n = 21)	Controles (n = 961)		
A33	4 (19,0 %)	62 (6,5 %)	0,047	3,27 (1,1 – 9,4)
B35	12 (57,1 %)	204 (21,2 %)	<0,001	4,73 (2,0 – 11,1)
B81	1 (4,8 %)	8 (0,8 %)	0,177	5,41 (0,8 – 36,1)

RR = Risco Relativo; IC = Intervalo de Confiança

Com relação às frequências HLA dos pacientes com aftas tipo major (10 pacientes), a frequência A33, presente em dois pacientes (20,0%), não foi estatisticamente significativa, quando comparado com grupo controle ( $p=0,137$ ). B35 presente em três pacientes (30,0%) e quando comparado ao grupo controle não foi estatisticamente significativa ( $p=0,452$ ). B81 apresentou-se em um paciente (10,0%) quando confrontado ao grupo controle obteve-se  $p=0,089$ , estatisticamente não significativa (Tabela 12).

Tabela 12 - Frequência de Antígenos HLA classes I em pacientes com Estomatite Aftóide Recorrente Major comparados com Grupo Controle

	Grupo		p	RR (IC 95%)
	Afta Major (n = 10)	Controles (n = 961)		
A33	2 (20,0 %)	62 (6,5 %)	0,137	3,54 (0,8 – 16,3)
B35	3 (30,0 %)	204 (21,2 %)	0,452	1,58 (0,4 – 6,1)
B81	1 (10,0 %)	8 (0,8 %)	0,089	11,88 (1,7 – 84,2)

RR = Risco Relativo; IC = Intervalo de Confiança

Em relação à frequência de haplótipos houve valores estatisticamente significantes para: A24B35 presente em cinco (16,1%) pacientes portadores de EAR, e 49 (5,1%) do grupo controle ( $p=0,023$ ); A33B35 presente em três (9,7%) pacientes portadores de EAR e 16 (1,7%) do grupo controle ( $p=0,019$ ); A2DR17 presente em cinco (16,1%) pacientes portadores de EAR e 48 (5,0%) do grupo controle ( $p=0,021$ ); A33DR1 presente em três (9,7%) pacientes portadores de EAR e 22 (2,3%) do grupo controle ( $p=0,04$ ); B35DR16 presente em três (9,7%) pacientes portadores de EAR e 17 (1,8%) do grupo controle ( $p=0,022$ ); B35DR17 presente em quatro (12,9%) pacientes portadores de EAR e 29 (3,0%) do grupo controle ( $p=0,017$ ) (Tabela 13).

Tabela 13 - Frequência de haplótipos em pacientes com Estomatite Aftóide Recorrente (EAR)

	Grupo		p	RR (IC 95%)
	EAR (n = 31)	Controles (n = 961)		
A24B35	5 (16,1 %)	49 (5,1 %)	0,023	3,34 (1,3 – 8,4)
A33B35	3 (9,7 %)	16 (1,7 %)	0,019	11,33 (3,5 – 37,1)
A2DR17	5 (16,1 %)	48 (5,0 %)	0,021	3,40 (1,4 – 8,5)
A33DR1	3 (9,7 %)	22 (2,3 %)	0,04	4,14 (1,3 – 12,7)
B35DR16	3 (9,7 %)	17 (1,8 %)	0,022	5,20 (1,7 – 15,7)
B35DR17	4 (12,9 %)	29 (3,0 %)	0,017	4,30 (1,6 – 11,6)

RR = Risco Relativo; IC = Intervalo de Confiança

6 - DISCUSSÃO

## 6.1 – DEFINIÇÃO

A Estomatite Aftóide Recorrente é definida como uma doença da mucosa oral, caracterizada pelo surgimento de aftas recorrentes, de forma quinzenal ou mensal, por um período mínimo de um ano, sem a presença concomitante de outra doença sistêmica (Scully, 2006).

Suas manifestações podem ocorrer de três formas: minor, major e herpetiforme (Truelove & Morris-Owen, 1958; Lehner, 1968). Em nosso trabalho observou-se as formas minor e major da EAR, não sendo notada a forma herpetiforme, provavelmente por sua manifestação raramente acontecer na população em geral.

## 6.2 – INCIDÊNCIA E FAIXA ETÁRIA

A Estomatite Aftóide Recorrente é uma doença comum da cavidade oral e possui sua etiologia ainda indefinida (Porter, 2000). Pode estar associada a fatores locais e sistêmicos, tendo sua origem com base imunológica, microbiológica ou genética (Miziara, 1995).

Ao contrário do que estabelece Scully (2006), em que a incidência de EAR é maior na infância e adolescência, nosso trabalho encontrou resultado diferente. Maior incidência de EAR em pacientes na terceira década de vida, entre 20 e 30 anos, corroborando com os achados de Sircus et al. (1957), Axéll e Fenricsson (1985), Porter et al. (2000) e Jurge et al. (2006).

O sexo feminino foi o que teve maior prevalência de EAR, (54,84%), em



nosso estudo. Estes dados estão de acordo com os achados por Sircus et al. (1957), Graykowski et al. (1966), Challacombe et al., (1977a) Axéll e Fenricsson (1985), Porter et al. (2000) e Jurge et al. (2006).

Ship (1965), através de observações clínicas insinuou que as pessoas que possuíssem EAR de origem genética desenvolveriam os quadros de estomatites aftóides em uma menor faixa etária, e seriam caracterizados pela sua severidade. Esta hipótese não foi observada por nós. Em nosso estudo houve poucos pacientes com menor idade, apenas um na faixa etária abaixo de dez anos e três entre 10 e 20 anos, e mesmo assim seus quadros clínicos de EAR não se destacavam sobre os outros.

### 6.3 – EXAMES LABORATORIAIS E EAR

Dos 58 pacientes que obtivemos do início do trabalho é relevante citar que três possuíam sífilis, cinco eram soropositivos para HIV, dois apresentaram glicemia elevada e quatro estavam com anemia. Isto evidencia a importância de um correto diagnóstico diferencial, pois, como já descrito, estas alterações muitas vezes apresentam inicialmente episódios de aftas como sinal prodrômico da doença (Wray et al., 1975; Olson et al., 1982; Challacombe et al., 1983; Field et al., 1987; Porter et al., 1988, 1992b; Porter e Scully, 1991; MacPhail et al., 1991; Livneh et al., 1996; MacPhail e Greenspan, 1997; Scully et al., 2003; Natah et al., 2004; Miziara et al., 2005; Jurge et al., 2006).

Em nosso estudo não encontramos nenhum paciente com deficiência vitamínica ou de zinco, ou sensibilidade a alimentos, casos estes que contradizem os achados de Eversole et al. (1982); Wray et al. (1982); Hay et al. (1984); Endre

(1991), Nolan et al. (1991), Hunter et al. (1993); Haisraeli-Shalish et al., (1996), Piskin et al. (2002) e Koybasi et al. (2006).

Convém lembrar que o trauma em mucosa bucal muitas vezes pode ser um fator desencadeante de EAR nos pacientes susceptíveis (Wray et al., 1981).

A dosagem sérica de IgA, IgG e IgM realizada na triagem laboratorial, quando os pacientes apresentavam-se na fase ativa da doença, não se mostraram alteradas, concordando com os estudos de Lehner, 1972; Ben-Aryeh et al., 1976; Lindemann et al., 1985a; Bagg et al., 1987; Porter et al., 1992<sup>a</sup>; porém, contrariando os achados mostrados por Lehner, 1972; Lindemann et al., 1985b; Vicente et al., 1996; Sistig et al., 2002.

Estas diferenças podem ser explicadas pela possibilidade dos autores não deixarem claro na metodologia empregada, se durante a coleta de sangue os pacientes apresentavam ou não lesões ativas de EAR. Em nosso estudo todos os pacientes apresentavam lesões aftóides ativas, durante a extração do sangue utilizado para dosagem sérica de IgA, IgG e IgM.

Não foi objetivo de nosso estudo a dosagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ou a tipagem linfocitária, conforme os trabalhos realizados por Pedersen et al. (1991), Pedersen et al. (1992), Sun et al. (2000), Sistig et al. (2001) e Bazrafshani et al. (2002).

#### 6.4 – HISTOPATOLOGIA E EAR

Os resultados obtidos das amostras enviadas para análise histopatológica, realizada durante os exames de triagem dos pacientes participantes do estudo,

revelaram a presença de um infiltrado linfocitário, plasmocitário e ausência de agentes infecciosos, entrando em concordância aos achados por Mills et al. (1980), Savage et al. (1985), All et al. (1990), Landersberg et al. (1990), Häyrinen-Immonen et al. (1991), que assim caracterizavam sob o ponto de vista histopatológico a lesão ulcerada da EAR.

#### 6.5 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA E EAR

Em nosso estudo realizamos a IFD a fim de excluir outras doenças ulcerativas da cavidade bucal, conforme preconizado por Jordan et al. (2002).

Embora autores tenham encontrado depósitos de C<sub>3</sub>, IgM e IgA em pacientes com EAR (Donatsky e Dabelsteen, 1977; Ullman e Gorlin, 1978; VanHale et al., 1981; Malmström et al., 1983; Reimer et al., 1983), nosso estudo não evidenciou o mesmo resultado.

Resultados falso-negativos na IFD podem ser encontrados, caso a lesão oral tenha sido tratada com esteróide tópico anterior à biópsia (Jordan et al., 2002). Como alguns de nossos pacientes fizeram uso deste tipo de droga, esta pode ser a cauda de alguns deles apresentarem IFD negativa.

O achado de IFD negativa em nossos pacientes sugere também concordância com aqueles descritos por Lehner (1968), Sistig et al. (2001) e Scully et al. (2003), de que a fisiopatologia da EAR possa estar relacionada à imunidade celular e não humoral.

## 6.6 - HEREDITARIEDADE E EAR

Apesar de Sircus (1957) e Casiglia (2002) relatarem a presença familiar de EAR, Ship (1965) afirmar em seu estudo a existência de uma hereditariedade dominante ou recessiva na EAR, e Miller et al. (1977) descreverem a presença de EAR em alta frequência em gêmeos homozigotos, não nos foi possível confirmar estas hipóteses em nosso estudo, uma vez que não tivemos presença de representantes de uma mesma família em nosso grupo de estudo.

Importante salientar que para a seleção do grupo controle foi retirado apenas um indivíduo de cada grupo familiar presente no banco de dados, evitando, assim, qualquer influência que pudesse ocorrer devido à consangüinidade.

## 6.7 – HLA E EAR

Em nosso estudo as frequências HLA que apresentaram maior índice nos pacientes portadores de EAR foram: HLA-A33, HLA-B35 e HLA-B81. Quando visto, de acordo com o subtipo da doença, obtivemos valores estatisticamente significantes para afta tipo minor, nas frequências HLA-A33 e HLA-B35. Para EAR Major nenhuma frequência apresentou valor estatisticamente significante. Estas frequências divergem daquelas descritas na literatura, obtidas por Platz et al. (1976), Dolby et al. (1977), Challacombe et al. (1977a), Lehner et al. (1982), Malmström et al. (1983), Gallina et al. (1985), Albanidou-Farmaki et al. (1988), Sun et al. (1991), Shohat-Zabarski et al. (1992), Chang et al. (2001) e Jaber et al. (2001).

Em estudos na população inglesa, Challacombe et al. (1977a) e Lehner et al. (1982) encontraram a frequência HLA-B12 associada a pacientes com EAR.

No estudo de Challacombe et al. (1977a), quando analisada a frequência HLA-B12 em relação aos subtipos de EAR, foi significativa estatisticamente apenas para o tipo Herpetiforme. Para o tipo Minor e Major nenhuma frequência foi encontrada. Em nosso estudo, devido a sua raridade e baixa frequência, não foi possível obter pacientes com o tipo Herpetiforme.

A frequência HLA-B12 também foi encontrada por Malmström et al. (1983). Neste seu trabalho, diferentemente de nosso estudo, os autores não usaram grupo controle e a sua amostra de pacientes portadores de EAR era pequena (14 pacientes).

Gallina et al. (1985) com uma amostra de 26 pacientes sicilianos, portadores de EAR, encontraram valor aumentado significativo para frequência HLA-DR7. Ao fazer uma análise crítica do grupo experimental selecionado, notou-se que foram diagnosticados como portadores de EAR pacientes que tiveram apenas dois episódios de aftas ao ano, característica esta não condizente com o quadro clínico de EAR preconizado por Stanley (1972) e Scully (2006), que descreveram como EAR episódios de aftas mensais por pelo menos um ano, o mesmo estabelecido em nosso estudo.

Albanidou-Farmaki et al. (1988) realizaram um estudo com 106 pacientes gregos portadores de EAR, diferentemente de nossos achados, a frequência HLA-DR5 mostrou-se predominante.

Sabe-se hoje que tão importante quanto observar a frequência HLA individualmente, é fazer uma análise dos haplótipos, pois estes também podem reger

a suscetibilidade ou não da doença.

Em relação aos haplótipos, neste mesmo estudo, Albanidou-Farmaki et al. (1988) verificaram a frequência A1DR5 com valor estatisticamente significante. Diferente daqueles encontrados por nós, muito provavelmente pelo número amostral utilizado ser menor em nosso trabalho.

Sun et al. (1991) afirmaram que a frequência HLA-DRw9 pode ser considerada como um marcador genético para a EAR na população chinesa. Acreditamos haver certo exagero nesta afirmação; estes autores realizaram apenas a tipagem HLA-DR, e sabe-se que a susceptibilidade pode estar relacionada também às frequências HLA-A e HLA-B. Em nosso estudo, por outro lado, realizamos uma tipagem mais completa, ainda assim não nos atrevemos a fazer a mesma afirmação em relação aos nossos resultados e à população brasileira.

Já, em população árabe, Jaber et al. (2001) em um estudo com 22 pacientes portadores de EAR, observaram um aumento estatisticamente significante das moléculas HLA-B52 e B44 nos pacientes portadores desta enfermidade, quando comparado ao grupo controle.

A frequência HLA-B51 foi relacionada a EAR em diferentes estudos populacionais (israelenses e coreanos), Shohat-Zabarski et al. (1992) e Chang et al. (2001) respectivamente.

É importante ressaltar que, com o avanço da metodologia de tipificação HLA, não é mais utilizado o método sorológico, quando era necessária a presença de ligantes específicos (anticorpos) para evidenciar a presença da frequência HLA correspondente, conforme utilizado por alguns autores (Platz et al., 1976; Dolby et al., 1977; Challacombe et al., 1977a; Malmström et al., 1983; Gallina et al., 1985;

Albanidou-Farmaki et al., 1988).

Com o aprimoramento das técnicas de tipificações HLA novos alelos foram descobertos, e velhos alelos primeiramente definidos por sorologia agora foram melhores definidos. Em nosso estudo, utilizamos técnica de biologia molecular que utiliza o DNA como ponto de partida e utilizamos kits HLA por SSO para classe I – locos A, para classe I - locos B, e para classe II - locos DR, que têm resolução média/alta, isto é, identifica o alelo em alguns casos ou, na maioria deles, definem um grupo de alelos, tornando a tipificação HLA mais fidedigna, e possibilitando a descoberta de novas frequências.

Para exemplificar podemos utilizar a frequência HLA-B12 e seus splits, HLA-B44 e HLA-B45. No passado, e definido através de método sorológico, Challacombe et al. (1977a), Lehner et al. (1982) e Malmström et al. (1983), observaram maior incidência da frequência HLA-B12 em suas casuísticas. Com a utilização do método molecular (mais aprimorado), trabalhos mais recentes não mais relatam a frequência do HLA-B12 e sim de seus splits HLA-B44 (Jaber et al, 2001) e HLA-B45. Em nosso grupo controle a frequência HLA-B44 esteve presente em 4,8% dos casos, enquanto HLA-B45 esteve presente em 2,5%.

Segundo Braun Prado et al. (2000) e Monte et al. (2004) a frequência HLA-B35 é extremamente prevalente na população brasileira em geral, fato que também ocorreu em nosso grupo controle. No entanto, é importante ressaltar que apesar da frequência HLA-B35 também ser encontrada elevada em nosso grupo experimental, este fato não ocorreu ao acaso, pois houve diferença estatisticamente significativa na incidência deste gene entre os dois grupos comparados.

## 6.8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fato dos diversos trabalhos encontrarem freqüências HLA para EAR diferentes daquelas evidenciadas em nosso estudo, provavelmente ocorreu devido às populações estudadas serem de diferentes nacionalidades (dinamarqueses, escoceses, israelenses, chineses, coreanos e brasileiros) e origens étnicas distintas das nossas, um país extremamente miscigenado (Louzada-Junior et al., 2001).

Nossos achados mostram que as freqüências HLA devem ser realizadas especificamente para cada população, a fim de que possamos mapear os possíveis fatores genéticos envolvidos com a gênese da doença.

Há que se ressaltar em nosso estudo que a ausência de pacientes portadores de estomatite aftóide recorrente do tipo herpetiforme, bem como o baixo número de pacientes portadores de estomatite do tipo major, impediu uma avaliação mais precisa das freqüências HLA associadas a estas formas da doença.

É importante fazer nota que o número amostral do grupo de estudo foi aquele possível de se obter no período estudado. Entre as razões para isso, identificamos as seguintes:

- a- Não é fácil obter pacientes que obedeçam rigorosamente aos critérios de inclusão;
- b- Entre os pacientes inicialmente estudados, 27 deles apresentavam alterações sistêmicas que inviabilizavam sua inclusão no estudo.

De todo modo, a casuística relativamente reduzida não invalida nossos resultados, tendo em vista que as freqüências HLA encontradas em nossos pacientes foram muito discrepantes daquelas obtidas no grupo-controle com pacientes não portadores de EAR.



Sendo assim, estudos adicionais na população brasileira se fazem necessários com o intuito identificar a existência ou não de frequências HLA nos subtipos de EAR major e herpetiforme.

**7- CONCLUSÃO**

Os resultados deste trabalho leva-nos a concluir que:

- As frequências HLA-A33, HLA-B35 e HLA-B81 estão associadas à Estomatite Aftóide Recorrente, na população estudada, quando comparadas com grupo controle;

- As frequências HLA-A33 e HLA-B35 estão associadas à Estomatite Aftóide Recorrente Menor, na população estudada, quando comparadas com grupo controle;

- Os haplótipos HLA-A24B35, HLA-A33B35, HLA-A2DR17, HLA-A33DR1, HLA-A35DR16 e HLA-B35DR17 estão associados à Estomatite Aftóide Recorrente, na população estudada, quando comparadas com grupo controle.

- Não houve associação entre frequências HLA classe I e classe II e EAR major não população estudada, quando comparadas com grupo controle.



**ANEXO I**

Exames laboratoriais de protocolo para pacientes com EAR:

- Glicemia de jejum;
- Eletroforese de proteínas;
- Hemograma completo;
- Coagulograma (TP + TT + TTPA);
- Anti-HIV 1 e 2;
- Complemento total e frações;
- Fator reumatóide;
- Fatores antinúcleo;
- Dosagem sérica de IgA, IgG e IgM, proteína C reativa;
- Sorologia para sífilis.

**ANEXO II**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS**  
DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Instruções para preenchimento no verso)

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE .....

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 (.....).....

**II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA**

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA . Estudo da correlação entre antígenos de histocompatibilidade (hla) e estomatite aftóide recorrente

PESQUISADOR: Ivan Dieb Miziara

CARGO/FUNÇÃO: Médico Chefe Ambulatório de Otorrinolaringologia

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 45484

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica de Otorrinolaringologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	<b>X</b>	RISCO MÍNIMO	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO		RISCO MAIOR	

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 18 meses

### **III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:**

#### **1. Justificativa e os objetivos da pesquisa.**

Para ter certeza que você não tem outras doenças terá que realizar exame de sangue, para isso haverá a necessidade de tirar um pouco do seu sangue.

#### **2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais.**

Será feito a retirada de uma pequena quantidade de sangue. Com este sangue serão feitas análises para saber o que causou as feridas.

#### **3. Desconfortos e riscos esperados.**

Haverá o pequeno desconforto da picada da agulha necessária para retirada do sangue, sem que haja risco algum.

#### **4. Benefícios que poderão ser obtidos.**

Como benefício você irá ajudar a identificar a possível causa das feridas.

#### **5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.**

Nenhum.

---

### **IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:**

#### **1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.**

Durante todo tratamento você terá acesso, a qualquer tempo, para observar a ficha onde ficarão armazenadas todas as suas informações, e terá liberdade para fazer perguntas para esclarecer qualquer dúvida.

#### **2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.**

O tratamento independe da sua participação neste estudo, você tem a liberdade de deixar de participar do estudo a qualquer momento e retirar o seu consentimento.

#### **3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.**

Em nenhum momento durante o tratamento e na publicação dos resultados deste estudo você terá seu nome exposto, estando assim sua participação neste estudo em segredo.

#### **4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.**

Você terá assistência no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP por qualquer dano que por acaso venha ocorrer à sua saúde decorrente deste estudo.

5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Nenhum

---

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

Niels Salles Willo Wilhelmsen – av. Protugal 397 cj 1503 – tel 4990 0285

---

**VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:**

---

**VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo,                      de                      de 19                      .

---

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

---

assinatura do pesquisador  
(carimbo ou nome Legível)



### ANEXO III

#### MATERIAL UTILIZADO PARA PREPARO PARA IMUNOFLOURESCÊNCIA DIRETA

- Meios de inclusão (Tissue Tek, Leica, Alemanha)
- TBS pH 7,5 (Sigma Chemical Company, St. Louis, IL, EUA)
- Corante Azul de Evans (Interlab, Brasil)
- Anti-IgA humana diluição 1:20 (Sigma Chemical Company, St. Louis, IL, EUA)
- Anti-IgM humana diluição 1:20 (Sigma Chemical Company, St. Louis, IL, EUA)
- Anti-IgG humana diluição 1:130 (Sigma Chemical Company, St. Louis, IL, EUA)
- Anti-C3c humana diluição 1:40 (DAKO, Dinamarca)
- Glicerina tamponada pH 9 / 0,5M (Interlab, Brasil)
- Microscópio de epiluminescência HBO 50w (filtro CB12), com ocular de 10x e lentes de 16x e 40x (Zeiss, Alemanha)

## ANEXO IV

### MATERIAL UTILIZADO PARA EXTRAÇÃO DO DNA E TIPIFICAÇÃO HLA

- Agarose de gradiente DNA (Invitrogen Brasil Ltda)
- Agitador Vórtex (Fanem – Brasil)
- Água Milli Q autoclavada
- Banho úmido, 65-72°C (Splabor – Brasil)
- Bloco de Equalização de Calor
- Borracha para amplificação
- Brometo de etídio - 10mg/ml (Sigma Chemical Company, St. Louis, IL, EUA)
- Câmera Polaróide com capa e filtro para documentação do gel (Kodak – USA)
- Centrífuga tipo Sorvall (comum) (Fanem – Brasil)
- Citômetro de fluxo LabScan™ 100 (LabScan – USA)
- Clorofórmio (Merk, Alemanha)
- Conjunto de Primers loco-específicos (Merk, Alemanha)
- CTAB 0,5% - Brometo de hexadeciltrimetilamônio ou Cetramida (Merk, Alemanha)
- Cubetas de 500µl (Labopette - Brasil)
- D-Mix, solução para amplificação especialmente formulada, constituída de DNTP's, cloreto de potássio (1%) e Tris (hidroximetil) aminometano (1%) (One Lambda – USA)
- DTAB 12% - Brometo de dodeciltrimetilamônio (Merk, Alemanha)
- EDTA 0,4M pH 8,0 (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil)
- Espectrofotômetro (Femto – USA)
- Etanol 70% em água Milli Q autoclavada

- Etanol absoluto (Merk, Alemanha)
- Filme Polaróide tipo 667 (Kodak – São José dos Campos – SP)
- Kit tipagem HLA por SSO para classe I – locos A – RSSO1A (One Lambda – USA)
- Kit tipagem HLA por SSO para classe I – locos B – RSSO1B (One Lambda – USA)
- Kit tipagem HLA por SSO para classe II – locos DR – RSSO2B1 (One Lambda – USA)
- Marcadores de Peso Molecular de DNA para cobrir a faixa de 50-2000 bp (Invitrogen – USA)
- Microcentrífuga (Labopette - Brasil)
- Micropipetas (Labopette - Brasil)
- Microplaca 250µl, com 96 poços, sem superfície tratada (Labopette - Brasil)
- Mistura de pérolas LabType™SSO (One Lambda – USA)
- NaCl 3M (Sigma Chemical Company, St. Louis, IL, USA)
- Owl Centipede™ Extra Wide Minigel System, modelo D3-14 com 4 pentes de microtitulação, de 25 dentes, espessura de 1.5 mm. Modelo D3 MTD (Invitrogen – USA)
- Papel alumínio (Rolominio 30cm X 7,5m)
- Pipetadores de 8 canais de 525 µL de volume ajustável (Labopette - Brasil)
- Pipetadores de 1-10 µL, 100-200 µL e 100-1000 µL (Labopette - Brasil)
- Pipetas pasteur novas autoclavadas (Labopette - Brasil)
- Placa PCR de 96 poços (Labopette - Brasil)
- Placa PCR de paredes finas com 96 poços (Labopette - Brasil)

- Plataforma Luminex™ XY (Luminex – USA)
- Ponteiras (novas e autoclavadas) de 1-10 µL, 100-200 µL e 100-1000 µL (Labopette - Brasil)
- Pressure Pad para PCR (OLI # SSPPAD – Invitrogen Brasil Ltda)
- Rotor horizontal para microplaca de 96 poços (900 a 1000g)/tubos em tiras (Ciencor Scientific –USA)
- Rotor para tubo de microcentrifugação de 1,5ml (14.000 a 18.000g) (Ciencor Scientific –USA)
- SAPE (Estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina) preparado para reconstituição com água para 1 ml (Timerosal – Acido etilmercuritiosaliciliato de sódio – 0,01% e Azida sódica 0,05%) (Invitrogen Brasil Ltda)
- Selador de placas (OLI # SSPSEA300 – Invitrogen Brasil Ltda)
- Sheath Fluid (solução circulante para citômetro de fluxo) (Invitrogen Brasil Ltda)
- Sistema de Eletroforese – 150 V de capacidade mínima
- Solução de hipoclorito a 0,5% (Merk - Brasil)
- Suporte para placa PCR para uso em centrífuga para 1000g (Ciencor Scientific – USA)
- Tampão de desnaturação – Hidróxido de sódio 10% (Merk - Brasil)
- Tampão para eletroforese TBE (em concentração 0.5X) (Invitrogen Brasil Ltda)
- Tampão de hibridização (Invitrogen Brasil Ltda)
- Tampão de lavagem (Invitrogen Brasil Ltda)
- Tampão de neutralização – Ácido accético 70% (Merk – Brasil)

- Tampão TBE 1X (Tris-borato 89mM; EDTA di-sódico 2mM, pH 8.0) com 0,5ug/ml de brometo de etídio ou tampão TBE 5X com brometo de etídio (OLI # %XTBE100 – Invitrogen Brasil ltda)
- Tampão Tris-HCl 2M pH 8 (Merk – Alemanha)
- Taq polimerase recombinante (Invitrogen Brasil ltda)
- Termociclador de 96 poços com tampa aquecida (PTC-100 MJ Research, INC - Waterton, MA-USA)
- Transiluminador UV (320nm – Hybaid – USA)
- Tubos de polipropileno de 1.5 mL (para placas com testes múltiplos) (Labopette - Brasil)
- Tubos eppendorf de 1,5 e 2,0ml (novos e autoclavados) (Labopette - Brasil)
- Tubos Vacultainer com EDTA 25 mM tubos (Beckton & Dickinson, USA)
- UniGel™ Casting Tray: 2 placas que se encaixam no modelo D3-14 com 12 pentes de microtitulação e 9 dentes (Invitrogen Brasil ltda)

## **9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Albanidou-Farmaki A, Kayavis IG, Polymenidis Z, Papanayotou P. HLA-A, B, C na DR Antigens in Recurrent Oral Ulcers. *Ann Dent*. 1988;47(1):5-8.
- All MA, Ayoub A, Refai ME. Phenotypic identification of lymphocytes in recurrent aphthous stomatitis. *Egyptian Dental Journal*. 1990;36(1):33-46.
- Axéll T, Henricsson V. The occurrence of recurrent aphthous ulcers in an adult Swedish population. *Acta Odontol Scand*. 1985;43:121-5.
- Bagg J, Williams BD, Amos N, Dagalis P, Walker DM. Absence of circulating IgG immune complexes in minor recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol*. 1987;16:53-6.
- Bazrafshani MR, Hajeer AH, Olliver WER, Thornhill MH. Recurrent aphthous stomatitis and gene polymorphisms for the inflammatory markers TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  and the vitamin D receptor: no association detected. *Oral diseases*. 2002;8:303-7.
- Ben-Aryeb H, Malberger E, Gutman D, Szargel R, Anavi Y. Salivary IgA and serum IgG and IgA in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1976;42(6):746-52.
- Bodmer, WF. HLA: what's in a name? A commentary on HLA nomenclature development over the years. *Tissue Antigens*. 1997;46:293-96.
- Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B et al.. Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. *Tissue Antigens*. 1999;53:407-468
- Braun-Prado K, Mion ALV, Farah NP, Culp L, Petzl-Erler ML. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. *Tissue Antigens*. 2000;56(5):417-27.
- Casiglia JM. Recurrent aphthous stomatitis: Etiology, diagnosis, and treatment.

- General Dentistry*. 2002;50(2):157-166.
- Challacombe SJ, Batchelor JR, Kennedy LA, Lehner T. HLA Antigens in Recurrent Oral Ulceration. *Arch Dermatol*. 1977;113:1717-19.
- Challacombe SJ Scully C, Keevil B, Lehner T. Serum ferritin in recurrent oral ulceration. *J Oral Pathol*. 1983;12:290-9.
- Chang HK, Kim JU, Cheon KS, Chung HR, Lee KW, Lee IH. HLA-B51 and its allelic types in association with Behçet's disease and recurrent stomatitis in Korea. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2001;19 (24): S31-S35.
- Ddolby AE, Walker DM, Slade M, Allan C. HL-A histocompatibility antigens in recurrent aphthous ulceration. *J Dent Res*. 1977;56(2):105-7.
- Donatsky O, Dabelsteen E. Deposits of immunoglobulin C and complement C3 in recurrent aphthous ulceration. *Scand J Dent Res*. 1977;85:419-25.
- Endre L. Recurrent aphthous ulceration with zinc deficiency and cellular immune deficiency. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991;72:559-61.
- Eversole LR, Shopper TP, Chambers DW. Effects of suspected foodstuff challenging agents in the aetiology of recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1982;56:33-8.
- Femiano P, Gombos F, Nunziata M, Espósito V, Scully C. Pemphigus mimicking aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 2005;34(8):508-10.
- Fernandes APM, Maciel LMZ, Foss CM, Donadi EA. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003;47(5):601-11.
- Field EA Rotter E, Speechley JA, Tyldesley WR. Clinical and haematological assessment of children with recurrent aphthous stomatitis. *Br Dent J*.



1987;163:19–22.

Gallina G, Cumbo V, Messina P, Caruso C. HLA-A, B, C, DR, MT, and MB antigens in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985;59(4):364-70.

Graykowski EA, Barile MF, Lee WB, Stanley HR. Recurrent Aphthous Stomatitis: clinical, therapeutic, histopathologic, and hypersensitivity aspects. *JAMA,* 1966;196(7):637-44.

Greenspan JS, Gadol N, Olson JA, Hoover CI, Jacobsen PL, Shillitoe EJ, Armitage GC. Lymphocyte function in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol.* 1985;14:592–6.

Haisraeli-Shalish M, Livneh A, Katz J, Doolman R, Sela BA. Recurrent aphthous stomatitis and thiamine deficiency. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;82:634-6.

Hay D, Reade PC. The use of an elimination diet in the treatment of recurrent aphthous ulceration of the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984;57:504–7.

Häyrinen-Immonen R, Nordström D, Malmström M, Hietanen J, Konttinen YT. Immune-inflammatory cells in recurrent oral ulcers (ROU). *Scand J Dent Res,* 1991;99(6):510-18.

Hunter IP, Ferguson MM, Scully C, Galoway AR, Main ANH, Russell RI. Effects of dietary elimination in patients with recurrent minor aphthous stomatitis and no detectable gluten enteropathy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993;75(5):595-8.

Jaber L, Weinberger A, Klein T, Yaniv I, Mukamel M. Close association of HLA-

- B52 and HLA-B44 antigens in Israeli arab adolescents with recurrent aphthous stomatitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001;127:184-7.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Imunologia: o sistema imune na saúde e na doença.* 5<sup>a</sup> ed. – Porto Alegre: Artmed; 2002.
- Jordan RCK, Daniels TE, Greenspan JS, Regezi JA. Advanced diagnostic methods in oral and maxillofacial pathology. Part II: Immunohistochemical and immunoflorescent methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93:53-74.
- Jurge S, Kuffer R, Scully C, Porter SR. Recurrent aphthous stomatitis. *Oral Diseases.* 2006;12:1-21.
- Koybasi S, Parlak AH, Serin E, Yilmaz F, Serin D. Recurrent aphthous stomatitis: investigation of possible etiologic factors. *American Journal of Otolaryngology Head and Neck Medicine and Surgery.* 2006;27:229-32.
- Landesberg R, Fallon M, Insel R. Alterations of T helper/inducer and T suppressor/inducer cells in patients with recurrent aphthous ulcers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990;69(2):205-8.
- Lehner T. Autoimmunity in oral diseases, with special reference to recurrent oral ulceration. *Proc Royal Soc Med.* 1968;61(5):515-24.
- Lehner T. Immunologic aspects of recurrent oral ulcers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972;33(1):80-5.
- Lehner T, Welsh KL, Batchelor JR. The relationship of HLA-B and DR phenotypes to Behçet's syndrome, recurrent oral ulceration and the class of immune complexes. *Immunology.* 1982;47:581-7.
- Leimola-Virtanen R, Happonen RP, Syrjanen S. Cytomegalovirus (CMV) and

- Helicobacter pylori* (HP) found in oral mucosal ulcers. *J Oral Pathol Med.* 1995;24:14-7.
- Lindemann RA, Riviere GR, Sapp JP. Serum antibody responses to indigenous oral mucosal antigens and selected laboratory-maintained bacteria in recurrent aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985;59:585-9.
- Lindemann RA, Riviere GR, Sapp JP. Oral mucosal antigen reactivity during exacerbation and remission phases of recurrent aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985;60:281-284.
- Livneh A, Zaks N, Katz J, Langevitz P, Shemer J, Pras M. Increased prevalence of joint manifestations in patients with recurrent aphthous stomatitis (RAS). *Clinical and Experimental Rheumatology.* 1996;14:407-412.
- Louzada-Junior P, Smith AG, Hansen JA, Donadi EA. HLA-DRB1 and -DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of Sao Paulo. *Tissue Antigens.* 2001;57(2):158-62.
- MacPhail LA, Greenspan D, Feigal DW, Lennette ET, Greenspan JS. Recurrent aphthous ulcers in association with HIV infection: description of ulcers types and analysis of T-lymphocyte subsets. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;71:678-83.
- MacPhail LA, Greenspan JS. Oral ulceration in HIV infection: investigation and pathogenesis. *Oral Diseases.* 1997;3(suppl 1):190-3.
- Malmström M, Salo OP, Fyhrquist F. Immunogenetic markers and immune response in patients with recurrent oral ulceration. *Int J Oral Surg.* 1983;12:23-30.
- Miller MF, Garfunkel AA, Ram C, Ship II. Inheritance patterns on recurrent aphthous ulcers: Twin and pedigree data. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*

1977;43:886–91.

Mills MP, Mackler BF, Nelms DC, Peavy DL. Quantitative distribution of inflammatory cells in recurrent aphthous stomatitis. *J Dent Res*. 1980; 59(3):562-66.

Miziara, ID. Estomatite Aftóide Recidivante. *Rev Bras de ORL*. 1995; 61(5): 418.

Miziara ID, Araujo Filho BC, Weber R. AIDS and Recurrent Aphthous Stomatitis. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)*. 2005 Jul-Aug;71(4):517-20.

Monte SJ, Moita Neto JM, Rampim GF, Shulzhenko N, Morgun A, Gerbase-DeLima M. HLA polymorphism in a racially admixed sample of the population of Teresina, Piauí. *Rev Assoc Med Bras*. 2004;50(4):422-6.

Monteiro F, Panajotopoulos N, Kalil J. Novas técnicas de provas cruzadas utilizadas no transplante renal. In: da Cruz J, editor. *Atualidades em Nefrologia*. Editora Sarvier. 1996; cap. 40: 301-311.

Monteiro F, Kalil J. Imunologia do Transplante. In: Younes RN e Birolini D, editores. *Bases Fisiopatológicas da Cirurgia Moderna*. Ed. Lemar, São Paulo, 1998, p. 321-334.

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

Nolan A, McIntosh WB, Allam BF, Lamey PJ.. Recurrent aphthous ulceration: Vitamin B1, B2 and B6 status and response to replacement therapy. *J Oral Path Med*. 1991;20:389–91.

Olson JA, Feinberg I, Silverman S Jr, Abrams D, Greenspan JS. Serum vitamin B12 , folate, and iron levels in recurrent oral ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral*

- Pathol.* 1982;54:517–20.
- Pedersen A. Psychologic stress and recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med.* 1989;18:119–22.
- Pedersen A, Klausen B, Hougen HP, Ryder LP. Peripheral lymphocyte subpopulations in recurrent aphthous ulceration. *Acta Odontol Scand.* 1991;49:203–6.
- Pedersen A, Hougen HP, Kenrad B. T-lymphocyte subsets in oral mucosa of patients with recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med.* 1992;21:176-80.
- Pedersen A, Hornsleth A. Recurrent aphthous ulceration: A possible clinical manifestation of reactivation of varicella zoster or cytomegalovirus infection. *Oral Pathol Med.* 1993;22:64–8.
- Piskin S, Sayan C, Durukan N, Senol M. Serum iron, ferritin, folic acid, and vitamin B12 levels in recurrent aphthous stomatitis. *JEADV.* 2002;16:66-7.
- Platz P, Ryder LP, Donatsky O. No deviations of HLA-A and –B Antigens in patients with Recurrent Aphthous Stomatitis. *Tissue Antigens.* 1976;8:279-280.
- Porter SR, Scully C, Flint SR. Hematological status in recurrent aphthous stomatitis compared with other oral disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988;66:41–4.
- Porter SR, Scully C. Aphthous Stomatitis – an overview of aetiopathogenesis and management. *Clin Exp Dermatol.* 1991;16:235-43.
- Porter SR, Scully C, Bowden J. Immunoglobulin G subclasses in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 1992;21(1),26-7.
- Porter SR, Flint S, Scully C, Path MRC, Keith O. Recurrent aphthous stomatitis: the efficacy of replacement therapy in patients with underlying hematinic

- deficiencies. *Ann Dent*. 1992; 51(2), 14-6.
- Porter SR, Scully C, Pedersen A. Recurrent aphthous stomatitis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(3),306-21.
- Porter SR, Hegarty A, Kaliakatsou F, Hodgson T, Scully C. Recurrent aphthous stomatitis. *Clinics in Dermatol*. 2000;18:569-78.
- Porter SR, Leao JC. Review article: oral ulcers and its relevance to systemic disorders. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;21(4):295-306.
- Reimer R, Luckner L, Hornstein OP. Direct immunofluorescence in Recurrent Aphthous Ulcers and Behçet's Disease. *Dermatologica*. 1983;167:293-8.
- Savage NW, Seymour GJ, Kruger BJ. T-lymphocyte subset changes in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1985;60(2):175-81.
- Scully C, Gorsky M, Lozada-Nur F. The diagnosis and management of recurrent aphthous stomatitis. *JADA*. 2003; 134:200-7.
- Scully C. Aphthous Ulceration. *N Eng J Med*. 2006; 355(2):165-172.
- Singh N, Sundar S, Willians F, Curran MD, Rastogi A, Agrawal S, Middleton D. Molecular typing of HLA class I and class II antigens in Indian Kala-azar patients. *Trop Med Int Health*. 1997;2(5):468-71.
- Sircus W, Church R, Kelleher J. Recurrent aphthous ulceration of the mouth; a study of the natural history, aetiology and treatment. *Q J Med*. 1957; 26(102):235-49.
- Sistig S, Cekic-Arambasin A, Rabatic S, Vucicevic-Boras V, Kleinheinz J, Piffko J. Natural immunity in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med*. 2001;30:275-80.
- Sistig S, Vucicevic-Boras V, Lukac J, Kusic Z. Salivary IgA and IgG subclasses in oral mucosal diseases. *Oral Diseases*. 2002;8:282-6.

- Ship II. Inheritance of Aphthous ulcers of the mouth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;44(5):837-44.
- Ship JA, Arbor AM. Recurrent aphthous stomatitis: an update. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;81: 141-7.
- Shohat-Zabarski R, Kalderon S, Klein T, Weinberger A. Close association of HLA-B51 in persons with recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992;74(4):455-8.
- Stanley HR. Aphthous lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972;33(3):407-16.
- Sun A, Hsieh RO, Chu CT, Wu YC. Strong association of HLA-DRw9 in Chinese patients with recurrent oral ulcers. *J Am Acad Dermatol.* 1991;24(2 Pt 1):195-8.
- Sun A, Chu CT, Liu BY, Wang JT, Leu JS, Chiang CP. Expression of interleukin-2 receptor by activated peripheral blood lymphocytes upregulated by the plasma level of interleukin-2 in patients with recurrent aphthous ulcers. *Pract Natl Sci Counc.* 2000;24(3):116-22.
- Truelove SC & Morris-Owen RM. Treatment of Aphthous Ulceration of the Mouth. *Br Med J.* 1958;15:603-7.
- Tyldesley WR. Stomatitis and recurrent oral ulceration: Is a full blood screen necessary?. *Br J Oral Surg.* 1983;21:27-30.
- Ullman S, Gorlin RJ. Recurrent aphthous stomatitis: An immunofluorescence study. *Arch Dermatol.* 1978;114:955-56.
- VanHale HM, Rogers III RS, Doyle JA, Schroeter AL. Immunofluorescence Microscopic Studies of recurrent aphthous stomatitis. *Arch Dermatol.* 1981;117:779-81.
- Van Rood JJ. HLA and I. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:1-28.

- Vicente M, Soria A, Mosquera A, Pérez J, Lamas A, Castellano T, Ramos A. Immunoglobulin G subclass measurements in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 1996;25(10):538-40.
- Wray D, Ferguson MM, Mason DK, Hutcheon AW, Dagg JH. Recurrent aphthae: Treatment with vitamin B12 , folic acid and iron. *Br Med J.* 1975;2:490-3.
- Wray D, Graykowski EA, Notkins AL. Role of mucosal injury in initiating recurrent aphthous stomatitis. *Br Med J.* 1981;283:1569-70.
- Wray D, Vlagopoulos TP, Siraganian RP. Food allergens and basophil histamine release in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982;54:388-95.



**APÊNDICE**

## APÊNDICE I



A/C  
DR. IVAN

**APROVAÇÃO**

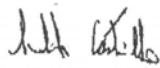
A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10.11.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 876/04, intitulado: "Estudo da correlação entre antígenos de histocompatibilidade (HLA) e estomatite aftóide recorrente" apresentado pelo Departamento de OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Dr. Ivan Dieb Miziara**

Pesquisador(a) Executante: **Dr. Niels Salles Willo Wihelmsen**

CAPPesq, 10 de Novembro de 2004.

  
**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
Presidente da Comissão de Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa

## APÊNDICE II



**INSTITUTO DO CORAÇÃO**  
(Fundação E. J. Zerbiní)  
Hospital das Clínicas  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o projeto **“Estudo da correlação entre antígenos de histocompatibilidade (HLA) e Estomatite Aftóide Recorrente”** do aluno de Doutorado **Niels Salles Willo Wilhelmsen** orientado pelo **Dr Ivan Dieb Miziara** será desenvolvido em colaboração com o Laboratório de Imunologia do InCor, sob minha direção e com a participação direta do Dr Francisco de Assis Salomão Monteiro.

São Paulo, 06 de dezembro de 2004

Prof. Dr. Jorge Kalil  
Diretor  
Laboratório de Imunologia