Charles Antônio Pires de Godoy

**Estudo da expressão do colágeno tipo V e sua relação com a
proteína 1 da matriz extracelular no remodelamento
da pele de pacientes com líquen escleroso**

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

Programa de: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Luiza
Capelozzi

SÃO PAULO

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Godoy, Charles Antônio Pires de

Estudo da expressão do colágeno tipo V e sua relação com a proteína 1 da matriz extracelular no remodelamento da pele de pacientes com líquen escleroso / Charles Antônio Pires de Godoy. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Patologia.

Orientadora: Vera Luiza Capelozzi.

Descritores: 1.Líquen escleroso 2.Hialina 3.Colágeno 4.Proteínas da matriz extracelular 5.Microscopia confocal 6.Imunofluorescência

USP/FM/DBD-100/13

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, pelas oportunidades e pelas pessoas que colocou no meu caminho.

Agradeço aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado incondicionalmente.

Agradeço a minha esposa, Magna, pela paciência, compreensão e carinho.

As minhas amadas irmãs, Viviane e Tatiane.

Agradeço de todo o coração a Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi, por ter aceitado o desafio de me orientar, por tudo que me ensinou, por sua sinceridade e honestidade.

Um agradecimento especial a Dra. Walcy Rosolia Teodoro, professora responsável pelo Laboratório de Matriz Extracelular da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da USP, pelo companheirismo e imenso auxílio científico e pessoal.

À Dra. Ana Paula Veloso, pesquisadora do Laboratório de Matriz Extracelular da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da USP, pelo apoio na elaboração dos marcadores de imunofluorescência.

Agradeço ao amigo Dr. Edwin Roger Parra, grande pesquisador, que me ajudou em todos os momentos da pós-graduação, sempre contribuindo de maneira positiva com sugestões e críticas.

À Vanessa Martins e Maristela, alunas da pós-graduação da Patologia da Faculdade de Medicina da USP, pelas inúmeras contribuições e pelo companheirismo.

Ao colega patologista, Dr. Alexandre Ab'Saber, e a bióloga, Dra. Ana Lúcia Garippo, pelo auxílio na realização da microscopia confocal.

À Welluma e Thiago da secretaria do Programa de Pós-Graduação da Patologia da Faculdade de Medicina da USP, pelo apoio, paciência, amizade e dedicação durante todo este período.

Ao Prof. Dr. Raymundo Soares de Azevedo Neto, Coordenador do Programa de Pós Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da USP, pelos ensinamentos e constante apoio.

À Dra. Mirian Nakagami Sotto, que muito contribuiu para realização deste trabalho fornecendo os casos e abrindo as portas da dermatopatologia da Faculdade de Medicina da USP.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci por permitir a coleta dos controles nas dependências do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da USP.

Às colegas Esmeralda Miristene Eher, Angela Batista dos Santos e Maria Cristina Rodrigues Medeiros, pela confecção das lâminas de imunoistoquímica, mas principalmente pela amizade e pelo carinho.

A Hermogênio Rafael de Oliveira e Douglas Moreira, responsáveis pelo bloário de Divisão de Anatomia Patológica do nosso Hospital, sempre dispostos a orientar com profissionalismo e paciência todos aqueles que necessitam das lâminas e dos blocos de parafina da Divisão.

Às colegas Isabelle e Adriana, aprimorandas do laboratório de Matriz Extracelular do Serviço de Reumatologia da Faculdade de Medicina da USP por me ajudarem na confecção das lâminas de imunofluorescência.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Almeida Santos pela ajuda na análise estatística deste trabalho.

À Profa. Dra. Sônia Lima, ao Prof. Dr. Saulo Maia D'Ávila Melo, Prof. Dr. Jeová e Prof. Dr. Valdinaldo, por me substituírem inúmeras vezes no trabalho para que eu pudesse viajar e trabalhar na tese.

Agradecimento especial ao Prof. Dr. José Arnaldo Vasconcelos Palmeira pela ajuda na revisão final do texto desta tese.

*“A menos que modifiquemos a
nossa maneira de pensar, não
seremos capazes de resolver os
problemas causados pela forma
como nos acostumamos a ver o
mundo.”*

Albert Einstein

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO 1

2 REVISÃO DA LITERATURA 7

2.1 Líquen Escleroso..... 9

2.1.1 Histórico 9

2.1.2 Conceito 13

2.1.3 Epidemiologia..... 14

2.1.4 Patogênese 15

2.1.4.1 Infecção..... 16

2.1.4.2 Genética 16

2.1.4.3 Hormonal..... 17

2.1.4.4 Trauma 19

2.1.4.5 Estresse Oxidativo..... 19

2.1.4.6 Auto-imunidade 21

2.1.4.7 Citocinas..... 23

2.1.5 Clínica 24

2.1.5.1 Local.....	24
2.1.5.2 Sinais.....	24
2.1.5.3 Sintomas	26
2.1.5.4 Diagnóstico.....	26
2.1.6 Evolução.....	27
2.1.7 Risco de desenvolver câncer	27
2.1.8 Histopatologia.....	28
2.1.8.1 Hematoxilina e Eosina.....	28
2.1.8.2 Fibras Elásticas	30
2.1.8.3 Microscopia Eletrônica	30
2.1.9 Tratamento	31
2.1.9.1 Corticóide tópico.....	31
2.1.9.2 Testosterona e outros tratamentos hormonais	32
2.1.9.3 Crioterapia.....	32
2.1.9.4 Fototerapia	32
2.1.9.5 Terapia Fotodinâmica.....	32
2.1.9.6 Laser	33
2.1.9.7 Inibidores da Calcineurina Tópicos.....	33
2.1.9.8 Ciclosporina.....	33
2.1.9.9 Metotrexato	34
2.1.9.10 Outras medicações.....	34
2.2 Matriz Extracelular.....	34
2.2.1 Colágeno	35
2.2.1.1 Colágeno V.....	40
2.2.2 ECM-1	44

3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivos	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 Biópsias	53
4.2 Imunofluorescência – Colágenos I, III e V	54
4.3 Reconstrução tridimensional das fibras de COL V e ECM-1	55
4.4 Imunoistoquímica - ECM-1	55
4.5 Histomorfometria	56
4.6 Análise Estatística	57
5 RESULTADOS	59
5.1 Descrição da Casuística	61
5.2 Hematoxilina e Eosina	64
5.3 Verhoeff	65
5.4 Imunofluorescência - Colágenos I e III	67
5.5 Imunofluorescência - Colágeno V	71
5.6 Microscopia Confocal	73
5.7 Imunoistoquímica - ECM-1	75
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÕES	85
8 ANEXOS	89
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
10 APÊNDICES	

Lista de Abreviaturas e Siglas

%	Porcentagem
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
ALA	Ácido aminolevulínico
AVCI	Acidente vascular cerebral isquêmico
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
CD4	Linfócitos T auxiliares
CD8	Linfócitos T citotóxicos
CEC	Carcinoma de células escamosas
cm	centímetro
COL I	Colágeno I
COL III	Colágeno III
COL IV	Colágeno IV
COL V	Colágeno V
DAB	Diaminobenzidina
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
Dr	Doutor
Dra	Doutora
ECM-1	Proteína 1 da matriz extracelular
Ed .	Edição
Et al.	e outros (colaboradores)
g	grama
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HE	Hematoxilina e Eosina
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPV	Papiloma vírus humano
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
Ki-67	Índice de proliferação celular
LPE	Lipoidoproteinose
LS	Líquen Escleroso
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
min	Minuto
ml	Mililitro
MMP	Metaloprotease
N	Normalidade

NIV	Neoplasia intraepitelial vulvar
nm	Nanômetro
p	Representa a probabilidade do efeito observado ser devido ao acaso
P53	Proteína supressora p53
PAS	Coloração ácido periódico-Schiff
PBS	Tampão fosfato de sódio
PDT	Terapia Fotodinâmica
pH	O logaritmo negativo, para base 10, da concentração de íons livres de hidrogênio em uma solução
Prof	Professor
Profa	Professora
RER	Retículo endoplasmático Rugoso
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SPSS	Statistical package for social science
SSc	Esclerodermia sistêmica
TGF	Fator de transformação do crescimento
Th1	Resposta T helper 1
Th2	Resposta T helper 2
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRIS-HCL	Tris Hidrocloreto
USP	Universidade de São Paulo
UVA	Raios ultravioleta A
vs	Versus

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sinônimos de LS.....	13
Tabela 2 - Distribuição das Idades das pacientes de acordo com os grupos. .	61
Tabela 3 - Características clínicas das pacientes com LS	62
Tabela 4 - Características clínicas dos casos controle	63

Lista de Figuras

Figura 1 - Resumo da produção de colágeno. 1: Síntese das cadeias alfas. 2: Formação da tripla hélice pelas cadeias alfas para formar o procolágeno. 3: Eliminação dos telopeptídeos para formar a molécula de colágeno ou tropocolágeno. 4: Agregação das fibrilas formando as fibras de colágeno. *Fonte: adaptado de (Bruce et al., 1994).* 39

Figura 2 - Secção transversal (esquema inferior) de uma fibrila heterotípica de colágeno. Composição: colágeno tipo I (branco), III (preto) e V (azul). O domínio amino-terminal da molécula de COL V é importante na regulação do diâmetro da fibrila de colágeno. Ao se projetar na superfície externa da fibrila, presumivelmente bloqueia a agregação de mais moléculas de colágeno através de mudanças na configuração espacial e / ou elétrica da fibrila. As moléculas de colágeno na vista longitudinal (esquema do meio) estão alinhadas em paralelo, em um arranjo escalonado (68 nm), com 40 nm de lacuna entre as moléculas. Além disso, na visão longitudinal (superior), as extremidades das cadeias alfas das moléculas de colágeno mostram ligações cruzadas intermoleculares com as moléculas de colágeno adjacentes. *Fonte: (Tasman et al., 2006).* 42

Figura 3 - Resumo dos tipos de isoformas de COL V. 43

Figura 4 - As possíveis funções da ECM-1 na pele humana. *Fonte: adaptado de (Chan, 2004).* 45

Figura 5 – A) Pele normal do controle. HE 200x. B) Pele com LS: em que pode ser observado área hialina na região subepidérmica (setas pretas), a escassez

de vasos sanguíneos, infiltrado inflamatório linfocítico (seta branca), atrofia epidérmica e hiperqueratose (setas amarelas). HE 200x..... 64

Figura 6 – A) Distribuição normal das fibras elásticas, marcadas em preto pela coloração de Verhoeff (seta branca) (400x). B) Diminuição de fibras elásticas na área hialina (seta verde) no LS pela coloração de Verhoeff (400x). C) Gráfico “Box Plot” mostra a mediana e os intervalos interquartis da quantidade de fibras elásticas no controle e LS. * Controle vs LS ($p<0,001$)..... 66

Figura 7 - Biópsia de pele obtida de pacientes com LS e controle imunocoradas para COL I e visualizadas ao microscópio de fluorescência (A,B). No grupo controle (A) a pele mostra fraca e homogênea imunofluorescência verde do COL I (seta branca), coincidente com a manutenção da arquitetura cutânea demonstrada na coloração de HE. Em contraste, pele dos portadores de LS (B), evidenciou desarranjo da arquitetura dérmica por difuso espessamento da derme superficial e média com evidente aumento de fibras do COL I em verde claro (seta branca). Nota-se ainda clivagem entre a epiderme e derme (seta amarela). O gráfico “Box Plot” (C) mostra a mediana e os intervalos interquartis da quantidade de fibras do COL I no controle e LS. * Controle vs LS ($p=0,030$). 68

Figura 8 - Biópsia de tegumento cutâneo obtida de pacientes com LS e controle imunocoradas para COL III e visualizadas ao microscópio de fluorescência (A,B). Pele do grupo controle (A) mostra moderada e homogênea imunofluorescência verde fluorescente do COL III (seta branca), coincidente com a manutenção da arquitetura cutânea na HE. Em contraste, espécime cutâneo de pacientes com LS (B) mostra fibras do COL III (seta branca) verde

claras fluorescente em meio a um fundo verde mais escuro. Nota-se ainda desarranjo da arquitetura dérmica em disposição difusa e homogênea. Em C, o gráfico “Box Plot” mostra a mediana e os intervalos interquartis da quantidade de fibras do COL III no controle e LS. *Controle vs LS ($p<0,001$). 70

Figura 9 - Biópsia de pele obtida de pacientes com LS e controle imunocoradas para COL V e visualizadas ao microscópio de fluorescência (A,B). Pele do grupo controle (A) mostra de fraca a moderada homogeneidade da imunofluorescência verde do COL V (seta branca), coincidente com a manutenção da arquitetura cutânea na HE. Em contraste, espécime cutâneo de pacientes com LS (B) mostra proeminente desarranjo da arquitetura da derme superficial e média. Com fibras do COL V (seta branca) dispostas de forma difusa e não homogênea. Em C, o gráfico “Box Plot” mostra a mediana e os intervalos interquartis da quantidade de fibras do COL V no controle e LS. * Controle vs LS ($p<0,001$). 72

Figura 10 - A) Co-localização da ECM-1 e do COL V na parede de pequenos vasos (seta) e ao longo da membrana basal de forma intermitente (cabeça da seta) em peles controles. B) Em contraste, no LS houve perda de expressão da ECM-1 nos vasos sanguíneos e difuso aumento da fluorescência verde do COL V (B). 74

Figura 11 - Biópsia de pele obtida de pacientes com LS e controle imunocoradas para ECM-1 (A,B). Em A, pele do grupo controle mostra expressão proeminente e homogênea da proteína ECM-1 na parede dos pequenos vasos dérmicos (seta amarela). Em contraste, peles de pacientes com LS mostram atenuação da expressão de ECM-1 pelos pequenos vasos

dérmicos (seta amarela) enquanto ainda permanece quantitativamente em níveis normais ao longo da epiderme (B). Em C, o gráfico “Box Plot” mostra a mediana e os intervalos interquartis da quantidade ECM-1 no controle e LS.

*Controle vs LS ($p < 0,001$). 76

Resumo

Godoy, CAP. Estudo da expressão do colágeno tipo V e sua relação com a proteína 1 da matriz extracelular no remodelamento da pele de pacientes com líquen escleroso. [Tese]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2013. 117p.

RESUMO

Introdução: O remodelamento da matriz extracelular no líquen escleroso (LS) caracteriza-se histologicamente por uma faixa hialinizada situada predominantemente na derme superficial, semelhante ao que ocorre na lipoidoproteínose (LPE), uma genodermatose rara, na qual ocorre deficiência na produção da proteína 1 da matriz extracelular (ECM-1). Recentemente, em casos de LS foram descobertos auto-anticorpos contra a ECM-1 e um novo caminho foi proposto para desvendar a sua etiopatologia. O LS também é freqüentemente comparado com a Esclerodermia, visto que alguns autores consideram que são espectros de uma mesma doença. Na Esclerodermia e na LPE há aumento do colágeno tipo V (COL V), mas pouco se sabe sobre este tipo de colágeno no LS. Assim, o objetivo do presente trabalho foi demonstrar a localização e a quantidade de COL V e ECM-1 nas vulvas de pacientes com LS.

Materiais e métodos: foram estudadas 21 biópsias de pacientes com LS vulvar e 21 biópsias de vulvas normais. A morfometria foi realizada nas imagens geradas através da imunofluorescência marcada com anticorpos contra os colágenos I (COL I), III (COL III) e V, e também nas de imunoistoquímica para ECM-1. Ademais, utilizou-se microscopia confocal a laser para visualizar o COL V e a ECM-1 na mesma lâmina.

Resultados: Peles do grupo controle mostraram fraca e homogênea distribuição das fibras de COL I, III e V na imunofluorescência. Em contraste, peles com LS exibiram desarranjo da arquitetura da derme superficial e difuso aumento da fluorescência das fibras de COL I, III e V na faixa hialina. A fração de área das fibras de COL I, III, e V foram significativamente maiores nas peles de pacientes com LS em relação ao controle ($p < 0,05$). Peles controles mostraram co-localização da ECM-1 e do COL V na parede de pequenos vasos e ao longo da membrana basal. Entretanto, no LS houve perda de expressão da ECM-1 na parede dos vasos sanguíneos ($p < 0,001$) e difuso aumento da fluorescência verde do COL V ($p < 0,001$).

Conclusão: Houve inversa relação entre o COL V e a proteína ECM-1 no LS conforme constatado pela histomorfometria, imunofluorescência, imunoistoquímica e reconstrução tridimensional, sugerindo que estratégias terapêuticas para prevenir o aumento da síntese de COL V e a diminuição da ECM-1 poderão ser promissoras no prognóstico e tratamento do LS.

Descritores: líquen escleroso, hialina, colágeno, proteínas da matriz extracelular, microscopia confocal, imunofluorescência.

Summary

Godoy, CAP. Study the expression of type V collagen and its relation to extracellular matrix protein 1 remodeling the skin of patients with lichen sclerosus. [Thesis]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2012. 117p.

SUMMARY

Background: The extracellular matrix remodeling in lichen sclerosus (LS) is characterized in routine light microscopy by a hyalinized band predominantly located in the superficial dermis. The same pattern occurs in the lipoid proteinosis (LPE), a rare genodermatosis, in which the production deficiency of extracellular matrix protein 1 (ECM-1) is responsible for triggering the disease. Recently, in cases of LS, autoantibodies were discovered against ECM-1 and a new way to unravel their aetiopathology was proposed. LS is also frequently compared with Scleroderma, since some authors consider that they are spectra of a similar disease. In Scleroderma and LPE there is an increase of type V collagen (COL V), but little is known about this type of collagen in LS. Thus, the objective of the current study was to demonstrate the location and quantity of COL V and ECM-1 on the vulvas of patients with LS.

Materials and methods: Twenty one biopsies from patients with vulvar LS matched with 21 biopsies from normal vulvas were included in this study. Immunofluorescence against type I (COL I), (COL III) and V collagen and immunohistochemistry for ECM-1 was performed and the slides were analysed by morphometry. Furthermore, laser confocal microscopy was used to visualize the COL V fibers and the ECM-1 protein on the same slide.

Results: Skins of the control group showed low and homogeneous distribution of fibers COL I, III and V in immunofluorescence. In contrast, skins with LS exhibited disruption of the architecture of the superficial dermis and diffuse increase in fluorescence fibers COL I, III and V in the range hyaline. The area fraction of fibers COL I, III, and V were significantly higher in the skin of patients with LS compared to control ($p < 0.05$). Skins controls showed colocalization of ECM-1 and COL V the wall of small vessels and along the basement membrane. However, the LS had loss of expression of ECM-1 the wall of blood vessels ($p < 0.001$) increase the fluorescence and diffuse green COL V ($p < 0.001$).

Conclusion: There was an inverse relationship between COL V and ECM-1 protein in LS as demonstrated by histomorphometry, immunofluorescence, immunohistochemistry and three-dimensional reconstruction, suggesting that therapeutic strategies to prevent the increased synthesis COL V and decreased ECM-1 may be promising in the prognosis and treatment of the LS.

Descriptors: lichen sclerosus, hyalin, collagen, extracellular matrix proteins, confocal microscopy, immunofluorescence.

1 INTRODUÇÃO

Líquen escleroso (LS) é uma dermatose mucocutânea crônica e incomum (Suurmond, 1964; Wallace et al., 1948). Afeta comumente meninas em fase pré-puberal e mulheres na menopausa (Kelly et al., 2006). A área mais comprometida é a anogenital, no entanto, pode afetar qualquer local da pele (Wakelin et al., 1997). As lesões caracterizam-se macroscopicamente por pápulas, geralmente agrupadas em placas esbranquiçadas ou levemente rosadas com prurido variável (Azevedo et al., 1989; Farrell et al., 2006).

O diagnóstico clínico de LS vulvar nas formas bem estabelecidas raramente é difícil, porém formas iniciais ou apresentações inusitadas requerem diferenciação de outras doenças, incluindo líquen plano, morféia, doença de Paget extramamária e outras. Nestes casos, a histopatologia contribui para a conclusão do diagnóstico (Larre Borges et al., 2012).

Os achados histopatológicos podem variar, mas com frequência demonstram: hiperqueratose com tamponamento folicular, um grau variável de atrofia epidérmica, retificação das papilas dérmicas, degeneração dos queratinócitos da camada basal, dilatação dos capilares linfáticos, edema, escassez de fibras elásticas e o aspecto mais característico que é a hialinização do colágeno da derme superior. Nota-se ainda infiltrado inflamatório predominantemente linfocítico de intensidade variável na derme papilar (Lever, 1967; Uitto et al., 1980; Wakelin et al., 1997).

O LS é uma doença inflamatória crônica complexa, com fatores genéticos, fisiológicos e ambientais que influenciam o fenótipo clínico e o prognóstico da doença. É geralmente aceito como uma doença auto-imune com predileção para a região genital, mas o antígeno alvo exato e a

patogênese da doença permanecem controversos (Murphy, 2010). Estudo realizado por Oyama et al. (2003) reportaram a presença de anticorpos circulantes IgG contra a proteína 1 da matriz extracelular (ECM-1) em 64 pacientes de 86 com LS. O grupo controle teve uma positividade muito baixa, apenas 6 dos 85 casos. Estes auto-anticorpos foram associados à patogenia do LS, embora novos estudos sejam necessários para a comprovação desta relação.

A ECM-1 foi identificada em 1994 como uma glicoproteína de 85 kDa secretada por uma linhagem específica de células estromais osteogênicas de rato (Smits et al., 1997). Subseqüentemente, um homólogo humano foi encontrado relacionado à regulação da formação do osso endocondral e à proliferação de células endoteliais induzindo a angiogênese (Mongiat et al., 2003). Para Chan (2004), além destas funções a ECM-1 atuaria ainda como uma “cola biológica” ajudando a regular a membrana basal e a organizar as fibrilas de colágeno. A deficiência genética na produção da ECM-1 causa uma doença conhecida por Lipoidoproteinose (LPE) que histologicamente é semelhante ao LS (Hamada, 2002).

As características estruturais e funcionais dos colágenos fibrilares I (COL I) e III (COL III) na pele e seu acúmulo inapropriado nas fibroses cutâneas têm sido estudados e descritos por vários autores previamente (Correa, 2000; Fleischmajer et al., 1980; Meigel et al., 1977; Smith et al., 1986; Weber et al., 1978). Em contraste, as características morfológicas estruturais e funcionais de outros colágenos, tal como o colágeno V (COL V), e suas anormalidades nos processos fibróticos ainda são pouco compreendidas.

Em geral, o processo de fibrogênese secundário à lesão da pele é caracterizado por deposição de uma grande quantidade de fibras de colágeno com tamanho e espessura diferentes na matriz extracelular (Correa, 2000). O mecanismo patogênético para essa morfologia anormal ainda não está bem definido e pode ser a chave para o melhor entendimento das doenças esclerosas da pele. Recentemente, o COL V tem sido implicado em vários processos de remodelamento (Bezerra et al., 2006; Birk, 2001; Teodoro et al., 2004).

O COL V foi descrito pela primeira vez por Burgeson e colaboradores em 1976 após sua extração do tecido placentário humano (Burgeson et al., 1976). Este colágeno é encontrado em proporções menores que os outros colágenos na derme e na membrana basal. É uma proteína da matriz extracelular com propriedades estruturais e biossintéticas impressionantes com funções diferentes daquelas dos COL I e COL III (Mayne et al., 1993). O COL V tem função importante na formação de fibras heterotípicas, no controle da fibrogênese e na regulação do tamanho das fibras de colágeno (Mayne et al., 1993; Sakkas et al., 2004; Teodoro et al., 2004). É essencial para manter a integridade do tecido conectivo, exibindo funções diferentes, dependendo de sua distribuição e das isoformas moleculares (Mayne et al., 1993). As moléculas deste colágeno contribuem para ligar os colágenos à membrana basal, sendo importantes para a adesão celular e para processos de reparo da matriz extracelular (Adachi et al., 1997).

A associação entre COL I, COL III E COL V é importante para a preservação e a integridade do tecido conectivo dos vasos intersticiais (Mayne

et al., 1993). Esta interação entre os diferentes tipos de colágeno e a formação consequente de fibras heterotípicas tridimensionalmente entrelaçadas pode influenciar fortemente a arquitetura e a função dos tecidos (Mayne et al., 1993). Segundo Bezerra et al. (2006), o processo de fibrose poderia acontecer exatamente por este desequilíbrio da interação entre os colágenos I, III e V, gerando desestruturação de sua formação espacial normal. Isto acarretaria em perda da capacidade de modular as propriedades biomecânicas.

No LS há acúmulo de proteínas colagênicas dos tipos I e III na região subepitelial da junção dermo-epidérmica (Correa, 2000). Nos casos iniciais, parece haver um acúmulo perivascular, que aumenta progressivamente através da derme papilar. A zona de hialinização do LS é caracterizada por fibras curtas e finas de colágeno, dispersas em direções variadas, sem fibras elásticas de permeio, com grande quantidade de proteoglicanos e glicosaminoglicanos sulfatados, bem como, glicoproteínas PAS positivas (Correa, 2000). Pouco se sabe sobre o COL V no LS.

É controversa a discussão entre clínicos e dermatopatologistas quanto à associação entre LS e esclerodermia e a possível evolução da primeira para a segunda doença (Rahbari, 1989). Uitto et al. (1980) encontraram em 10 pacientes com LS forte ligação com a morféia, sendo difícil o diagnóstico diferencial histológico das duas entidades.

Em nosso laboratório foi descoberto um novo modelo de Esclerodermia Sistêmica (SSc) induzido em coelhos normais, após imunização com COL V. Foi observado que os animais imunizados desenvolvem quadro de fibrose

progressiva e vasculopatia em todos os órgãos afetados pela SSc como pele, esôfago, coração, sinóvia, rins e pulmão.

Os coelhos apresentaram aumento na síntese de COL I e COL III e surpreendentemente, deposição excessiva e anômala de COL V nestes órgãos (Bezerra et al., 2006; Teodoro et al., 2004). Em estudos preliminares, este achado inusitado foi igualmente verificado em pacientes com Esclerodermia, em biópsias pulmonares de 8 casos (Souza et al., 2005) e na pele de 3 pacientes, sendo 2 com a forma localizada e um com a forma limitada (Bezerra et al., 2006).

Juntamente com a expressão aumentada de COL V, verificou-se a histoarquitetura anormal das fibras do colágeno, com síntese de fibras espessas e distorcidas, diferente do padrão comumente expresso desta proteína na matriz extracelular (finas e alongadas). Apesar da pequena casuística, esta morfologia anômala na expressão do COL V, evidenciada tanto em pacientes como em animais de experimentação, fortaleceu a idéia de que os mecanismos fisiopatológicos da fibrose sejam semelhantes em ambas as situações (Bezerra et al., 2006).

A demonstração da deposição bizarra de COL V tanto no modelo animal como nos pacientes é de grande relevância, pois este colágeno desempenha papel fundamental na fibrillogênese das fibras do colágeno e manutenção da histoarquitetura tecidual. O COL V é responsável pela interação com outros colágenos fibrilares, por exemplo, no processo de ancoragem na região de membrana basal, através do colágeno tipo IV (COL IV), e na regulação do diâmetro das fibras heterotípicas, atuando nos COL I e COL III (Birk, 2001).

Características moleculares particulares do COL V conferem propriedades imunogênicas a esta molécula, uma vez que conserva seus domínios globulares (NH₂ e COOH) durante a sua síntese, diferente de todos os outros tipos de colágeno (Teodoro, 2001).

Demonstrou-se, que no modelo animal de SSc induzida por COL V, a exposição destes epítomos do COL V poderiam funcionar como um neo-antígeno, capaz de perpetuar a inflamação local, originando uma enfermidade auto-imune. Uma vez ativados, os linfócitos T produzem citocinas pró-fibróticas como interleucina 4 (IL-4) que induzem a fibrose e produção de autoanticorpos (Sakkas et al., 2004). Esta hipótese é reforçada pelo fato da tolerância nasal com COL V neste modelo animal, promover importante regressão da fibrose cutânea (Gorczyca et al., 1993).

Considerando que Esclerodermia Localizada e o LS são espectros de uma mesma doença (Farrell et al., 2001; Tremaine et al., 1990; Uitto et al., 1980), que na SSc ocorre aumento de COL V (Bezerra et al., 2006; Teodoro et al., 2004), que há semelhança histológica entre LS e LPE (Hamada, 2002) e portanto produção de auto-anticorpos contra a ECM-1 na fisiopatologia do LS (Oyama et al., 2003), no presente trabalho levantamos a hipótese que COL V e ECM-1 participam do remodelamento cutâneo no LS e podem ser promissores como novos alvos de tratamento da doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Líquen Escleroso

2.1.1 Histórico

Breisky (1885) em Praga descreve a Craurose vulvar, só anos depois seria reconhecida como LS, em uma série de 12 casos que apresentavam atrofia cutânea da genitália e contração da vulva ocasionando transtornos na vida sexual e no trabalho de parto das suas pacientes. Entretanto, classicamente a descrição do primeiro caso de LS é atribuída Hallopeau (1887). Ele descreve uma paciente com pápulas coalescentes no tronco e antebraços, que apresentava prurido e liquenificação na vulva. Para ele o LS era um tipo de Liquen plano atrófico..

Darier (1887) estudou o processo patológico do primeiro caso de Hallopeau e comparou os achados histológicos com os do Líquen Plano. Segundo Darier o infiltrado inflamatório em faixa tão característico do Líquen Plano havia desaparecido e deixado apenas esclerose e atrofia. Darier sugeriu que o termo escleroso deveria ser usado, pois era a base da patogênese e o termo atrófico devido a aparência clínica.

As características típicas histológicas de LS foram descritas pelo próprio Darier (1892) cinco anos mais tarde. Ele notou um aumento no estrato córneo e na camada granulosa, hiperqueratose marcante nos orifícios dos ductos das glândulas sudoríparas e folículos pilosos. A epiderme estava marcadamente atrofiada com retificação das papilas dérmicas. O tecido conjuntivo da derme superior apresentava-se homogeneizado. As fibras elásticas tinham desaparecido, exceto por uns poucos remanescentes nas papilas. Houve

também esclerose do tecido conjuntivo da cútis mais profunda, onde ocorreu uma reação inflamatória leve, evidenciada por um infiltrado perivascular constituído principalmente por células redondas envolvendo alguns dos vasos sanguíneos mais profundos. Não houve nenhum efeito sobre as paredes dos vasos.

Na Alemanha Unna (1894) faz uma descrição típica de LS, mas acha que a lesão seria mais parecida com a morféia ou outras formas localizadas de esclerodermia e a denomina de “Kartenblattförmige Sklerodermie” conhecida como "cardboard-like" scleroderma.

Westberg (1901) foi o primeiro a utilizar o termo “White spot” para achados clínicos de LS. Outros autores utilizaram este termo para nomear o LS (Hazen, 1913; Johnston et al., 1903).

Von Zumbusch (1906) em Berlim apresenta uma doença clinicamente semelhante ao Líquen plano, mas com achados histopatológicos totalmente distintos. Para ele se tratava de uma doença totalmente nova e ele lhe dá o nome de “lichen albus”.

Csillag (1909) descreve um caso em que seu paciente apresentava pápulas violeta-vermelhas ou brancas lembrando giz. Elas eram redondas, por vezes, poligonais ou deprimidas e formavam placas com um aro avermelhado e centro deprimido. Havia plugs córneos dispersos e densamente aderidos. Segundo Csillag estas lesões evoluíam de 2 modos: involuíam e deixavam uma mancha pigmentada ou evoluíam formando placas brancas. Ele denominou os seus achados de dermatite liquenoide crônica atrófica.

Ormsby (1910) relata uma série de seis casos. Em todos, ele notou que as pápulas eram planas, brancas com plugs córneos, algumas destas eram rodeadas por um halo rosado, e ocasionalmente apresentavam atrofia e depressão central. Na histologia os seus achados foram semelhantes aos de Darier. Ormsby conclui que esta doença não era uma modificação de líquen plano, mas uma condição completamente diferente.

Berkeley et al. (1909) definiram “Leucoplakic vulvite” como uma doença inflamatória crônica de origem desconhecida, caracterizada nos seus estágios iniciais por hiperemia acentuada e em suas fases posteriores por espessamento com esclerose e retração do tecido subepitelial. Segundo estes autores a distribuição da doença varia de acordo com a sua gravidade e com o tempo. Em casos típicos, várias áreas da vulva podem estar acometidas: os grandes lábios, pequenos lábios, comissuras anterior e posterior, além do clitóris. A doença pode ainda se espalhar lateralmente para as dobras das coxas e posteriormente sobre o períneo e a pele ao redor do ânus.

Foi com Kogoj (1934) e Montgomery et al. (1940) que características específicas clínicas e histológicas foram estabelecidas, bem como, critérios para a classificação do LS. Porém estas características gerais, ainda não respondiam muitas dúvidas sobre o comportamento da doença na genitália feminina (Kogoj, 1936). E muitos casos erroneamente diagnosticados como pré-cancerosos foram submetidos a vulvectomias prematuras (Barker et al., 1962).

A cor branca das lesões de LS levou à utilização do termo "leucoplasia" (Janovski et al., 1963; Oberfield, 1961). A Leucoplasia na boca é considerada

uma condição pré-cancerosa e por extensão, esta desordem foi considerada pré-cancerosa na vulva. Isto levou à utilização generalizada da vulvectomy como o tratamento de escolha para o LS (Lynch et al., 2005). Taussig descreve uma série de artigos entre 1920 e 1940, em que, vulvas removidas por neoplasias malignas foram examinadas, sendo encontradas áreas de "leucoplasia" em 73% dos espécimes (Taussig, 1920, 1929, 1940). Bibby (1957) associa a leucoplasia como precursora em 60% dos seus 71 casos de câncer vulvar. Mc Adams et al. (1958) sugeriram que 10% das mulheres com leucoplasia (distrofia hiperplásica com atipia) progrediriam para câncer de vulva. Além destes, todos os 12 casos de câncer vulvar de Wallace (1971) surgiram em uma área de leucoplasia segundo o autor.

Jeffcoat (1966) parece ser o primeiro a reconhecer, com base em um grande estudo prospectivo, o prognóstico geralmente benigno da doença. Ele argumentou contra o uso da vulvectomy e recomendou a utilização do termo neutro "distrofia" para nomear a doença.

A Tabela 1 é um resumo dos inúmeros termos historicamente utilizados pela literatura como sinônimos de LS. A falta de uma terminologia padrão fazia com que dados disponíveis na literatura gerassem confusão e dificuldade para estabelecer a história natural do LS.

Tabela 1 - Sinônimos de LS

Sinônimos de LS	Estudo
Kraurosis vulvae	(Breisky, 1885)
Lichen plan atrophique	(Hallopeau, 1887)
Lichen plan scléreux	(Darier, 1887)
Kartenblattförmige sklerodermie	(Unna, 1894)
Leukoplasia	(Pichevin et al., 1897)
Weissflecken dermatose – White spot disease	(Westberg, 1901)
Lichen albus	(Von Zumbusch, 1906)
Lichen planus sclerosus et atrophicus	(Montgomery et al., 1907)
Dermatitis lichenoides chronic atrophicans	(Csillag, 1909)
Leukoplakic vulvitis	(Berkeley et al., 1909)
White vulvitis	(Graves et al., 1929)
Lichen sclerosus	(Kaufman et al., 1976)

A atual nomenclatura do LS foi proposta e adotada pela Sociedade Internacional de Estudo da Doença Vulvar no 2º Congresso Internacional em 10 de janeiro de 1975, Key Biscayne, Florida. Ficou definido que o LS era uma doença que apresentava graus variáveis de espessura do epitélio escamoso com perda progressiva das dobras epiteliais (cristas epiteliais). Vacúolos poderiam ser vistos nos queratinócitos da camada basal. A derme bem abaixo do epitélio escamoso é acelular, homogênea e pode apresentar edema. Abaixo desta área homogênea nota-se infiltrado inflamatório leve ou intenso composto por linfócitos e plasmócitos. É possível ainda notar em alguns casos hiperqueratose (Kaufman et al., 1976).

2.1.2 Conceito

LS é uma dermatose inflamatória crônica que de um modo geral se caracteriza por pápulas ou placas brancas que apresentam na histologia derme superficial hialinizada (Bornstein et al., 2012).

2.1.3 Epidemiologia

O LS ocorre em todas as idades, mas parece haver uma distribuição bimodal. (Aaronson et al., 1962; Wallace, 1971). O primeiro pico ocorre por volta dos quatro ou cinco anos de idade (Clark et al., 1967). E o segundo pico mais tarde, na menopausa (Garcia-Bravo et al., 1988; Meffert et al., 1995; Montgomery et al., 1940; Ridley, 1987). O LS afeta as mulheres quando a produção de estrogênio endógeno é baixa, o que levou a tentativas de confirmar seu efeito protetor. Nenhuma associação com a idade da menarca, gravidez, histerectomia, ou uso de contraceptivos orais ou terapia de reposição hormonal foram encontradas (Friedrich et al., 1984).

Sideri et al. (1989) não perceberam diferenças nos hábitos sexuais, história de tabagismo, educação ou hábitos alimentares em mulheres com LS, quando comparadas com as do grupo controle que não tinham doença.

A maioria dos estudos sobre LS se desenvolveram em pessoas brancas, mas há relatos em asiáticos (Datta et al., 1993), negros (Dogliotti et al., 1974; Irgang, 1944; Jacyk et al., 1979) e em orientais (Wang et al., 1991).

O LS parece ser mais comum em mulheres do que em homens, mas há divergências nos estudos. Alguns mostram uma relação entre mulheres e homens de quase 10:1 (Abrahams et al., 1973; Helm et al., 1991), outros de 5:1 (Montgomery et al., 1940; Steigleder et al., 1961; Thomas et al., 1984; Wallace, 1971) e até cerca de 1:1 (Garcia-Bravo et al., 1988).

A prevalência exata do LS é desconhecida. Os pacientes afetados podem não ter sintomas, e as pessoas com os sintomas podem ter medo ou

vergonha de procurar ajuda. Levantamentos epidemiológicos baseados em referências hospitalares são susceptíveis de subestimar a prevalência. Wallace (1971) estimou que de cada 300 a 1000 pacientes que dão entrada em hospitais, um tenha LS.

2.1.4 Patogênese

O LS é uma doença inflamatória crônica complexa, com fatores genéticos, fisiológicos e ambientais que influenciam o fenótipo clínico e o prognóstico da doença. É geralmente aceito que se trata de uma doença auto-imune com predileção para a região genital, mas o antígeno alvo exato e a patogênese da doença permanecem controversos (Murphy, 2010).

O primeiro a tentar associar uma causa ao LS foi Johnston et al. (1903). Segundo ele, a doença poderia ocorrer por déficit da circulação local. Weigand (1993) também sugere que o déficit na circulação local no pênis, secundário a fimose, poderia ser o responsável pelo desenvolvimento do LS em meninos.

Uma outra associação um tanto quanto curiosa foi proposta por Ormsby (1910). Ele propôs que problemas psicológicos fossem a causa do LS, pois as mulheres com LS geralmente eram "histéricas" ou "muito nervosas", achados estes que também foram corroborados por outros autores (Brain, 1950; Hazen, 1913). Esta associação ainda é válida até hoje, mas não como causa e sim como consequência do LS, pois o prurido intenso na vulva é contrangedor para as mulheres, fazendo com que muitas delas procurem o isolamento no interior das suas casas com medo do preconceito.

2.1.4.1 Infecção

Etiologias infecciosas têm sido investigadas no LS. Organismos como BAAR, Papiloma vírus humano (HPV), *Borrelia burgdorferi* e vírus da hepatite C foram analisados (Eisendle et al., 2008; Karram et al., 1988; Leibowitch et al., 1990; Taylor et al., 2008; Van Seters et al., 2007).

Em um estudo realizado por Eisendle et al. (2008), a *Borrelia* foi detectada em 80% dos casos iniciais de LS e em apenas 33% dos casos avançados. Entretanto, outros estudos que realizaram reação polimerase em cadeia para detectar a infecção por *Borrelia* em pacientes com LS apresentaram resultados controversos. Os estudos europeus tiveram resultados positivos, enquanto que os realizados nos Estados Unidos foram negativos (De Vito et al., 1996; Fujiwara et al., 1997).

Karram et al. (1988) pesquisaram a possível relação entre HPV e LS, mas não conseguiram achar indícios da infecção. Em estudo realizado por Leibowitch et al. (1990), o HPV não foi detectado nas suas amostras de carcinoma de célula escamosa (CEC) com LS. Entretanto, um trabalho recente encontrou uma grande porcentagem de pacientes com neoplasia intraepitelial vulvar (NIV) que apresentava LS e positividade para HPV (Van Seters et al., 2007).

2.1.4.2 Genética

Casos familiares foram descritos em gêmeas idênticas e não idênticas, irmãs, mães e avós (Thomas et al., 1986), embora o padrão de herança não esteja claramente estabelecido, estudos focados no papel do antígeno

leucocitário humano (HLA) têm determinado a suscetibilidade genética de pessoas com LS (Marren et al., 1995; Purcell et al., 1990; Sideri et al., 1988).

O sistema HLA é responsável pela síntese de antígenos de histocompatibilidade e é considerado um marcador genético de risco ou de resistência a certas doenças. Recentemente, a associação entre alguns antígenos do sistema HLA e doenças de origem auto-imune tem sido relatados. Os antígenos da classe II estão normalmente expressos na superfície das células T, e a sequência primária de aminoácidos na molécula de classe II é essencial para o reconhecimento de células T e sua ativação (Cairns et al., 1985).

A constatação mais significativa entre o LS e o sistema HLA ocorreu com o HLA-DQ7. O HLA-DQ7 estava presente em 39 dos 78 casos do estudo de Marren et al. (1995).

O estudo de Sideri et al. (1988) mostrou associação do LS com o HLA-B21, dos 68 pacientes afetados por LS, 22,06% tiveram aumento da frequência de HLA-B21, enquanto que o controle foi de apenas 9,56%.

Vários estudos têm demonstrado dados conflitantes sobre a associação entre o LS e tipos de HLA. Em um outro estudo conduzido por Purcell et al. (1990) foi relatado uma associação significativa entre LS e HLA-A29 e HLA-B44.

2.1.4.3 Hormonal

O LS é mais comumente observado em estados de hipoposterogenismo. O aumento da incidência da doença antes da puberdade e na menopausa levou a

suspeita da influência hormonal na etiologia do LS. Clifton et al. (1999) analisaram através da imunoistoquímica a presença de receptores androgênicos em 31 casos de LS. Eles mostraram uma diminuição na densidade de receptores de andrógenos na epiderme em lesões histologicamente maduras de LS quando comparadas com as lesões iniciais. Estes achados apóiam a idéia de que há um declínio gradual nos níveis de andrógenos e posterior lionização e perda do receptor à medida que a doença progride.

Friedrich et al. (1984) encontraram níveis séricos de dihidrotestosterona, testosterona livre e androstenediona significativamente reduzidos em doentes com LS vulvar não tratado. Níveis de diidrotestosterona e testosterona subiram e ultrapassaram os valores normais após o tratamento. Segundo o autor, estes resultados sugerem que a atividade enzimática anormal da 5-alfa-redutase pode ser responsável pela doença.

Segundo Taylor et al. (2008), a expressão baixa dos níveis dos receptores de estrogênio podem estar implicados na etiopatogenia do LS. Kohlberger et al. (1998) realizaram imunoistoquímica em trinta e nove casos de pacientes com LS vulvar para detectar a presença de receptores de estrogênio e progesterona. A expressão do receptor de estrogênio foi positiva em apenas uma paciente e a expressão do receptor de progesterona foi negativa em todos os casos.

Gunthert et al. (2008) sugeriram que o uso de anticoncepcionais orais, especialmente com propriedades antiandrogênicas, poderiam ter

desencadeado o aparecimento precoce de LS em um subgrupo de mulheres jovens.

2.1.4.4 Trauma

Há relatos de desenvolvimento de LS em áreas de trauma ou irradiação. Segundo Milligan et al. (1988) alguns pacientes com queimaduras solares desenvolveram LS nas regiões afetadas.

Yates et al. (1985) observaram em duas pacientes que foram submetidas a radioterapia após mastectomia o aparecimento de LS dentro dos campos de radiação. Segundo eles, o LS pode ter uma resposta isomórfica ao trauma da terapia por radiação.

O desenvolvimento de lesões nos locais de traumas na pele é conhecido como resposta isomórfica ou fenômeno de Köebner. O mecanismo através do qual o trauma induz a doença é desconhecido, mas pode envolver a indução da inflamação, ou, possivelmente, a exposição de antígenos de outro modo invisíveis (Sander et al., 2004).

No caso de LS genital, o trauma associado com a fricção de vestuário, a retenção do suor, urina, smegma, fluidos vaginais e fezes poderiam contribuir para a inflamação local. O estresse oxidativo parece ser o mecanismo pelo qual a inflamação leva ao desenvolvimento do LS (Sander et al., 2004).

2.1.4.5 Estresse Oxidativo

O mecanismo que conduz à síntese dos auto-anticorpos ainda não foi totalmente compreendido no LS. A sua produção pode ser o resultado de danos no DNA induzidos por espécies reativas de oxigênio (ROS), causando

alterações nas estruturas macromoleculares. Adicionalmente, defeitos no controle da apoptose e atraso da depuração de células apoptóticas podem gerar um ciclo retroalimentativo entre ROS e macromoléculas celulares apoptóticas, gerando novos epítomos que possam resultar em auto-anticorpos (Rosen et al., 2001).

Dados recentes têm ampliado o conceito de inflamação, pois é um componente crítico de carcinogênese (Marnett, 2000). Radicais livres e aldeídos produzidos pela inflamação crônica podem induzir um certo número de alterações, incluindo mutações de genes e modificações pós-traducionais das principais proteínas relacionadas com câncer. Essas alterações podem levar à ruptura de processos celulares, tais como a reparação do DNA e apoptose (Coussens et al., 2002; Hussain et al., 2003). Por isso, os processos inflamatórios crônicos observados no LS podem contribuir para o desenvolvimento de neoplasias malignas (Sander et al., 2004).

Sander et al. (2004) avaliaram o estresse oxidativo de 16 casos de LS através da técnica de imunoistoquímica e detectaram produtos de peroxidação lipídica significativamente aumentados, em particular dentro de queratinócitos da camada basal, como também lesões oxidativas do DNA e dano oxidativo nas proteínas das áreas dérmicas hialinas e ao redor do infiltrado inflamatório. Além disso, a defesa antioxidante enzimática estava alterada. Estes resultados indicam um envolvimento do estresse oxidativo na patogênese do LS.

Processos oxidativos podem contribuir para a produção de auto-anticorpos, para o aumento do risco do desenvolvimento de doenças malignas

e ainda interferir com os mecanismos de esclerose e formação de cicatrizes (Sander et al., 2004).

2.1.4.6 Auto-imunidade

Há uma forte associação entre o LS e distúrbios auto-imunes. Wallace (1971) observou que 3.8% das pacientes com LS tinham vitiligo. Em um estudo mais recente de caso controle demonstrou-se associação entre LS e líquen plano erosivo (Cooper et al., 2008). Um outro estudo mostrou que 44% das pacientes com LS tinham anticorpos contra células parietais gástricas e 40% contra células da tireóide (Goolamali et al., 1974).

Harrington et al. (1981) relata que 34% de seus pacientes do sexo feminino com LS tinham uma história pessoal de doenças auto-imunes (12% doença da tireóide, 10% anemia perniciosa, 10% alopecia areata, 6% diabetes e 4% vitiligo).

Estudo com 350 mulheres apresentando LS realizado por Thomas et al. (1996) demonstrou que 21,5% de suas pacientes tinham história pessoal de doença auto-imune. Dessas doenças auto-imunes, 6% das pacientes tinham doença da tireóide, 2% anemia perniciosa e menos de 1% diabetes. Mas, Birenbaum et al. (2007) mostra que a prevalência de doenças da tireóide em pacientes com LS chega a quase 30% (cerca de 5 a 30 vezes maior do que na população em geral). Em um outro estudo realizado por Simpkin et al. (2007) com 202 pacientes com LS foi encontrado um índice alto de doenças da tireóide, cerca de 19% dos casos.

Oyama et al. (2003) demonstraram a presença de auto-anticorpos contra a ECM-1 em pacientes com LS. Deste modo, parte do mecanismo da doença inexplicada, ou seja, o desenvolvimento de auto-anticorpos contra um antígeno não identificado na pele, ganha um candidato: a ECM-1. Esta idéia baseia-se na identificação recente de mutações no gene patogênico da ECM-1 que geraria uma desordem recessiva a LPE (Hamada et al., 2002). Estudos moleculares estabeleceram que a LPE resultaria da perda de função por mutações na ECM-1 (Chan et al., 2007; Hamada et al., 2002; Hamada et al., 2003).

Alguns indivíduos com LPE têm características clínico-patológicas que se sobrepõem às do LS. A mais importante, é a semelhança histológica na região hialina na derme superior. Outros estudos, revelaram o papel da ECM-1 na diferenciação epidérmica e na ligação de proteínas de matriz dérmica, por exemplo, o perlecan, assim como, na estimulação de células endoteliais vasculares no estroma de neoplasias (Han et al., 2001; Mongiat et al., 2003; Smits et al., 2000). Uma vez que as características de LS incluem atrofia epidérmica com hiperqueratose, hialinose dérmica, púrpura, e um risco aumentado de transformação maligna, é possível que auto-anticorpos possam interromper a função da ECM-1 no LS e causar todos estes achados (Oyama et al., 2003).

Chan et al. (2004) identificou vários sítios antigênicos na proteína ECM-1 que poderiam ser alvos dos auto-anticorpos circulantes no LS. Especificamente, duas regiões entre o terminal amino (aminoácidos 33-226) e

o terminal carboxila (aminoácidos 227-499), exibem reatividade heterogênea com o soro de pacientes com LS.

2.1.4.7 Citocinas

A população de células T em ratos foi dividida em duas subclasses, Th1 caracterizada pela produção predominante de IL-2 e IFN- γ , importantes na imunidade mediada por células, e Th2 que produz IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, importantes na imunidade humoral. Há muito interesse em fazer paralelos em seres humanos (Romagnani, 1997).

Farrell et al. (2006) através da imunoistoquímica demonstraram que no LS há aumento de IFN- γ , TNF- α e IL-1.

As fortes imunocolorações de IFN- γ , TNF- α e IL-1 no LS sugerem que a expressão de citocinas no LS se encaixam no padrão tipo Th1, que é semelhante à observada na psoríase e outras doenças auto-imunes, tais como, as doenças da tireóide (Romagnani, 1997). Isto demonstra que o LS é uma doença complexa, expressa em indivíduos que apresentam com frequência doenças auto-imunes (Gunthert et al., 2008).

Além disso há relatos de citocinas pró-fibróticas aumentadas no LS. Segundo Farrell et al. (2001) há aumento de TGF-beta e Serpier et al. (1997) de IL-4.

2.1.5 Clínica

2.1.5.1 Local

Nas mulheres, o LS é mais comum na vulva (83-98% dos casos) e com frequência se estende para o tecido perianal (Meyrick et al., 1988; Tasker et al., 2003). Áreas fora dessas regiões também são afetadas e variam entre 8% a 20% dos casos. Podem atingir qualquer lugar do corpo, entretanto é mais típico acometerem o pescoço, ombro ou tórax (Val et al., 2005). Áreas menos comuns incluem: a infraorbital (Klenk-Pfeifer, 1974), couro cabeludo (Foulds, 1980), palmas e plantas (Petrozzi et al., 1979; Purres et al., 1971; Tudino et al., 1984), e a escrotal (Fabry, 1928).

A maioria dos casos notificados em homens ocorreram no pênis, comprometendo a glândula e/ou o prepúcio (Chalmers et al., 1984).

2.1.5.2 Sinais

O sinal inicial de LS vulvar é uma mancha ou placa branca, geralmente simétrica no exterior do vestíbulo atingindo a porção inicial dos grandes lábios e muitas vezes a região perianal. Comumente é descrita como lesão em forma de ampolheta ou "figura oito". Outros termos muito utilizados são "buraco de fechadura" ou "borboleta" (Powell et al., 1999).

A cor branca ocorre por duas razões: devido a disfunção e perda de melanócitos, e por hiperqueratose. O aumento da camada córnea é notavelmente hidrofílica e quando ocorre excesso de água o clareamento se desenvolve como ocorre nas pontas dos dedos, após um banho prolongado. Estas áreas brancas geralmente demonstram um certo grau de atrofia epidérmica (Val et al., 2005).

A presença de atrofia é reconhecida por depressões e é acompanhada dos chamados enrugamentos tipo "papel de cigarro" (Tasker et al., 2003). Devido à fragilidade do tecido, observamos fissuras lineares, especialmente após a relação sexual. Erosões e bolhas também ocorrem devido ao descolamento do epitélio fracamente aderido após coçadura (Tasker et al., 2003; Val et al., 2005).

Petéquias e equimoses podem se formar após traumas que rompem capilares com fraco suporte mecânico na derme hializada (Val et al., 2005). É comum ainda, manchas de hiperpigmentação ocorrerem devido ao excesso de melanina nos melanóforos dérmicos (Smith et al., 2004).

Outros achados incluem a perda ou fusão dos pequenos lábios, fissuras, estreitamento do intróito vaginal, fimose do capuz do clitóris, edema e telangiectasias (Smith et al., 2004).

Os sinais em pacientes pediátricos são semelhantes aos dos adultos (Loening-Baucke, 1991). Manchas brancas nítidas estendem-se lateralmente a partir do vestíbulo para envolver parte dos grandes lábios. Frequentemente também há extensão para a pele perianal. As lesões brancas, muitas vezes demonstram atrofia com uma superfície ligeiramente enrugada. A atrofia é mínima e não há outros sinais de LS. A distinção com vitiligo pode ser muito difícil (Powell et al., 2001).

Ocasionalmente, há espessamento devido à liquenificação como resultado da fricção crônica. Podem ocorrer ainda, escoriações, bolhas, erosões rasas, púrpura e fissuras lineares. Estes últimos sinais podem sugerir

a possibilidade de abuso sexual, mas na maioria das vezes eles ocorrem como resultado de um trauma induzido pela criança ao coçar (Lynch et al., 2005; Powell et al., 2001).

2.1.5.3 Sintomas

Cerca de 9% das pacientes com LS são assintomáticos (Tasker et al., 2003).

O sintoma mais comum é o prurido, mas há uma gama de outros sintomas que podem estar associados ou isolados, tais como, dor vulvar, dispareunia, disúria, dor ao defecar e constipação. No entanto, estes sintomas podem ser leves o suficiente para as pacientes não buscarem ajuda. Em situações como esta, a doença apenas pode ser reconhecida como um achado incidental no atendimento ginecológico de rotina (Tasker et al., 2003).

As meninas com LS apresentam sintomas anogenitais como constipação, prurido ou disúria (Fischer et al., 2000). No geral, o prurido ocorre em cerca de 80% das doentes pediátricas com LS e constipação ou outras queixas gastrointestinais ocorreram em cerca de 90% (Loening-Baucke, 1991; Maronn et al., 2005).

2.1.5.4 Diagnóstico

Um exame cuidadoso da vulva é essencial para o diagnóstico e geralmente suficiente, exceto quando o LS assemelha-se a outras condições; nestes casos uma biópsia para confirmar o diagnóstico se faz imperativa. As vezes é muito difícil distingui-lo de um vitiligo, líquen simples crônico, líquen

plano, NIV, CEC invasivo e doença de Paget (Heymann, 2007; Murphy, 2010; Tasker et al., 2003).

2.1.6 Evolução

O LS apresenta períodos de remissão e recorrência. Há baixa correlação entre sinais clínicos, duração e gravidade da doença. Um estudo retrospectivo clínico-patológico duplo-cego não demonstrou nenhuma correlação entre critérios histológicos e duração da doença (Marren et al., 1997).

O LS é uma doença crônica com potencial de causar dano tecidual extenso e permanente. Estas alterações incluem perda parcial ou total dos pequenos lábios, espessamento do prepúcio do clitóris e estenose vaginal (Crissey et al., 1955; Oberfield, 1961; Savill, 1942).

As crianças com LS geralmente melhoram na puberdade, mas devem ser acompanhadas da mesma forma que os adultos, pois as informações sobre o potencial para o desenvolvimento do CEC vulvar nesta faixa etária ainda é incerto (Powell et al., 2002).

2.1.7 Risco de desenvolver câncer

O risco de uma mulher com LS na vulva desenvolver CEC invasivo é cerca de 2,4% (Cooper et al., 2004) e segundo Val et al. (2005) é de 4 a 6%. Ademais, Haefner et al. (1995) relataram associação do LS com NIV.

Em espécimes de vulvectomy de pacientes com câncer e LS, notou-se que as neoplasias surgem com mais frequência nas áreas de hiperplasia (Chiesa-Vottero et al., 2006; Hart et al., 1975; Jones et al., 2004; Rodke et al., 1988; Zaki et al., 1996). Um estudo recente sugeriu que o aumento da

expressão do Ki-67 e p53 poderia representar uma via progressiva de malignidade nos pacientes com LS (Raspollini et al., 2007).

Embora, o CEC seja o tumor maligno primário mais associado com LS, outros tumores também foram reportados em raras ocasiões. Estes incluem: carcinoma basocelular (Di Paola et al., 1982; Thomas et al., 1985), leiomiossarcoma (Rawal et al., 2005) e melanoma (Friedman et al., 1984; Rosamilia et al., 2006).

A detecção precoce e a introdução de corticoides tópicos potentes podem reduzir o risco de câncer vulvar invasivo em mulheres com LS (Jones et al., 2008; Neill et al., 2010).

O LS extragenital não está associado com o desenvolvimento de CEC (Val et al., 2005).

2.1.8 Histopatologia

Os achados histopatológicos do LS avançado, geralmente são fáceis de identificar, porém nos estágios iniciais é difícil concluir o diagnóstico (Regauer et al., 2005). Nesses casos é muito importante acompanhar a evolução da doença e repetir a biópsia, quando ocorrerem alterações macroscópicas ou persistir a incerteza diagnóstica. A biópsia inespecífica não exclui LS e não é possível determinar por critérios histológicos o tempo de duração da doença (Marren et al., 1997).

2.1.8.1 Hematoxilina e Eosina

As características histológicas do LS inicial são bastante sutis e muitas vezes mais proeminente em anexos cutâneos do que na pele interfolicular. Nos

anexos cutâneos podemos observar hiperqueratose e hipergranulose com ou sem distrofia do pêlo. A epiderme apresenta uma leve irregularidade, com focos de acantose psoriasiforme e espessamento da membrana basal. As primeiras alterações dérmicas são homogeneização do colágeno e ectasia dos capilares nas papilas dérmicas. O infiltrado linfocitário pode ser esparso ou denso, liquenóide ou intersticial com exocitose de linfócitos. Melanófagos dérmicos indicam que ocorreu destruição de queratinócitos ou melanócitos (Regauer et al., 2005).

Os aspectos histológicos clássicos de LS são bem estabelecidos e foram basicamente descritos por Darier em 1892. E são os seguintes segundo Wakelin et al. (1997):

1. Atrofia do epitélio com perda (achatamento) das cristas epiteliais, porém o epitélio pode se tornar marcadamente espessado ("acantótico") pelo ato de esfregar e coçar ou pelo desenvolvimento de uma neoplasia associada ao LS;
2. Degeneração hidrópica ("vacuolar") da camada basal;
3. Homogeneização do tecido conjuntivo na derme superior que torna-se hialinizada;
4. Presença de um infiltrado predominantemente linfocítico abaixo da camada de tecido conjuntivo homogeneizado em lesões mais avançadas ou na junção dermo-epidérmica em lesões recentes. As células do infiltrado inflamatório são constituídas por proporções iguais de linfócitos CD4 e CD8, além de, ocasionais macrófagos, mastócitos e plasmócitos.

Outros achados freqüentes são hiperqueratose com tamponamento folicular, dilatação dos capilares linfáticos, edema e um dos mais importantes, a escassez de fibras elásticas (Lever, 1967; Uitto et al., 1980; Wakelin et al., 1997).

2.1.8.2 Fibras Elásticas

O desaparecimento das fibras elásticas da derme superior tem sido observado no LS vulvar (Daroczy et al., 1974; Frances et al., 1983; Friedrich, 1985; Godeau et al., 1982). Mesmo com o microscópio eletrônico apenas pequenos focos de fibras elásticas na derme superficial foram encontrados, infelizmente a diminuição dessas fibras não é enfatizada ou bem difundida entre os patologistas. (Romppanen et al., 1987). A perda de fibras elásticas no LS é usada como critério para distingui-lo da morféia que apresenta quantidade normal de fibras elásticas (Meffert et al., 1995; Patterson et al., 1984; Rahbari, 1989).

2.1.8.3 Microscopia Eletrônica

A Microscopia eletrônica revela danos à zona da membrana basal e alteração tanto nas fibras elásticas como nas colágenas (Hewitt, 1986). Na faixa hialina dérmica do LS há uma importante variação no diâmetro das fibras de colágeno e fibrilas recentemente formadas que estão desorganizadas, ora com muito colágeno, ora com pouco (Forssmann et al., 1964). Segundo Mann et al. (1973) o LS seria uma doença de formação de colágeno, em que a compactação deste estrangularia as estruturas dérmicas adjacentes, levando a uma escassez de vasos sanguíneos e fibroblastos.

Mihara et al. (1994) descreveram as alterações ultraestruturais da membrana basal no LS. Um espessamento difuso geral da membrana basal de até 500 nm foi observado com frequência. Em algumas áreas, haviam pequenos buracos na lâmina, em outras, completa ausência da lâmina deixando queratinócitos basais em contato direto com a derme. Hemidesmossomas normais estavam presentes ao lado da lâmina espessada, mas não quando a membrana basal estava ausente. Eles notaram ainda áreas de replicação da membrana basal.

2.1.9 Tratamento

2.1.9.1 Corticóide tópico

O corticosteróide tópico potente é o tratamento de escolha para LS, mas não há ensaios clínicos randomizados que comparem a potência de esteróides, frequência de aplicação e duração do tratamento. O recomendado e aceito é o uso do propionato de clobetasol tópico 0,05% (Ayhan et al., 2007; Dalziel et al., 1991; Lorenz et al., 1998).

Neill et al. (2010) sugerem o uso do propionato de clobetasol 0,05% aplicado uma vez ao dia, à noite, durante 4 semanas, em seguida, em noites alternadas durante 4 semanas, e depois duas vezes por semana por um período de mais 4 semanas.

Estudo realizado por Lagos et al. (1998) mostram que esteróides potentes só precisam ser aplicado uma vez por dia na pele. A maioria das pacientes com doença em atividade utiliza de 30-60g de pomada de propionato de clobetasol a 0,05% ao ano (Diakomanolis et al., 2002).

2.1.9.2 Testosterona e outros tratamentos hormonais

Embora tenha sido amplamente utilizado no passado, parece não haver nenhuma evidência comprovada para a utilização da testosterona tópica (Neill et al., 2010). Pelo fato do LS afetar predominantemente a região genital foi proposta a influência hormonal, mas nem a gravidez e nem a terapia de reposição hormonal parecem ter qualquer efeito sobre a condição (Bornstein et al., 1998; Cattaneo et al., 1996). Em um estudo clínico duplo-cego realizado por Sideri et al. (1994) comparando a pomada de propionato de testosterona 2% e vaselina no tratamento do LS vulvar não foram demonstradas diferenças estatísticas entre os dois grupos.

2.1.9.3 Crioterapia

Em um pequeno estudo com 12 pacientes com LS vulvar e prurido severo intratável, 75% obtiveram alívio dos sintomas com crioterapia (August et al., 1980).

2.1.9.4 Fototerapia

Sete mulheres com LS genital grave que não conseguiam mais controlar a doença com o uso de corticosteróides tópicos potentes, foram submetidas a sessões de fototerapia com UVA. Cinco pacientes melhoraram com a terapia. Duas apresentaram recidiva e necessitaram de novas aplicações de UVA com resultado final pobre. Mas três tiveram uma boa resposta e conseguiram controlar a doença com o auxílio de corticóides tópicos (Beattie et al., 2006).

2.1.9.5 Terapia Fotodinâmica

Zawislak et al. (2009) colocaram uma placa de adesivo biológico contendo ácido aminolevulínico (ALA) com uma dose de 38 mg/cm² em 10

pacientes e logo depois irradiavam com luz de 630 nm. Depois de 17 ciclos de terapia fotodinâmica (PDT), seis pacientes relataram alívio sintomático significativo e nenhuma fotossensibilidade cutânea.

Hillemanns et al. (1999) utilizaram a PDT com aplicação tópica de ALA em mulheres com LS. A PDT produziu alívio estatisticamente significativo dos sintomas durante uma média de 6,1 meses, com efeitos colaterais mínimos.

2.1.9.6 Laser

O tratamento a laser foi avaliado em um pequeno estudo de 10 pacientes (cinco mulheres e cinco homens) com LS. O laser utilizado foi o de CO₂. Todas as lesões penianas foram clinicamente curadas, no entanto, em um paciente com lesões uretrais as lesões recidivaram. Nas mulheres as recidivas foram mais frequentes (Kartamaa et al., 1997).

2.1.9.7 Inibidores da Calcineurina Tópicos

Estudo de 84 pacientes tem apoiado a eficácia do tacrolimus (Hengge et al., 2006). Em quatro meninas pré-púberes de um outro estudo observou-se uma melhora nos sintomas (Boms et al., 2004). Um dos efeitos colaterais relatados foi a queimação local. A segurança a longo prazo destas drogas ainda não foi determinada. Há trabalhos que mostram o risco da utilização desta no desenvolvimento de neoplasias (Becker et al., 2006; Ormerod, 2005). Assim, recomenda-se que os inibidores de calcineurina não sejam utilizados como tratamento de primeira escolha.

2.1.9.8 Ciclosporina

A ciclosporina tópica não demonstrou benefício clínico ou histológico nos cinco casos de LS da vulva do estudo de Carli et al. (1992). No entanto, por via

oral a ciclosporina foi eficaz na redução dos sintomas (Bulbul Baskan et al., 2007).

2.1.9.9 Metotrexato

Sete pacientes com LS generalizado e refratário à terapia tópica de corticosteróides foram submetidos por 6 meses a pulsos de altas doses de corticosteróides combinados com baixas doses de metotrexato. Todos os pacientes melhoraram. Segundo os autores deste trabalho, esta terapêutica combinada deve ser considerada na doença generalizada, especialmente quando a doença é refratária ao tratamento convencional (Kreuter et al., 2009).

2.1.9.10 Outras medicações

Há relatos de benefícios com a utilização de outros medicamentos tais como o para-aminobenzoato de potássio, anti-maláricos, agentes anti-histamínicos e antibióticos (Neill et al., 2010; Pugliese et al., 2007; Smith et al., 2004).

2.2 Matriz Extracelular

Os tecidos apresentam regiões entre as células que são os espaços extracelulares (Mecham, 2011). Estes são preenchidos pela matriz extracelular que é uma malha organizada composta por uma variedade de proteínas e polissacarídeos em estreita associação com as células adjacentes (Ayad et al., 1998). Este meio intercelular altamente organizado desempenha importantes funções celulares, como adesão, diferenciação, proliferação e expressão gênica, além de modular o comportamento celular (Teodoro et al., 2003, 2004).

A matriz extracelular é mais abundante nos tecidos conjuntivos e determina as suas propriedades físicas (Mecham, 2011). As células do tecido conjuntivo estão distribuídas no seio de uma matriz que elas mesmas produzem, formada por fibras (colágenas e elásticas) e microfibrilas imersas em um material amorfo, um gel hidratado e poroso (proteoglicanos), além de glicoproteínas estruturais (Franco et al., 2010).

Na pele os fibroblastos secretam macromoléculas para o espaço extracelular (Mecham, 2011). Há duas classes principais dessas macromoléculas: (1) cadeias de polissacarídeos conhecidos como glicosaminoglicanos, que são normalmente encontrados covalentemente ligados à proteína sob a forma de proteoglicanos, e (2) as proteínas fibrosas, incluindo o colágeno, a elastina, fibronectina e laminina que tem funções estruturais e de adesão (Mayne et al., 1993).

As moléculas de proteoglicanos localizadas na derme são muito hidratadas e formam um gel (Mecham, 2011). Este gel de polissacarídeo é muito resistente a forças de compressão e permite rápida difusão de nutrientes, metabólitos e hormônios permitindo a troca destas substâncias entre o sangue e as células dos tecidos (Gelse et al., 2003).

2.2.1 Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante nos mamíferos, constitui a maior parte do componente orgânico de tendões, ligamentos, córnea, pele, vasos sanguíneos, entre outros (Mecham, 2011). No século XIX o colágeno era definido como uma substância do tecido conjuntivo que produzia cola.

Atualmente, a definição de colágeno é de uma proteína da matriz extracelular que apresenta um ou mais domínios com tripla hélice (Van Der Rest et al., 1991).

Segundo Hay (1991) são três as condições necessárias para que uma molécula seja considerada colágeno:

1º Exibir uma sequência Hidroxiprolina-Prolina-Glicina repetida nas cadeias;

2º Ter uma extensão de cerca de mil resíduos de aminoácidos;

3º Exibir conformação em tripla hélice.

O colágeno é uma glicoproteína degradada por um grupo de enzimas proteolíticas chamadas de metaloproteinases (Franco et al., 2010). Essas são endopeptidases zinco-dependentes, que atuam principalmente na degradação de componentes protéicos da matriz extracelular (Mecham, 2011). Já foram catalogadas mais de 30 endopeptidases, classificadas em seis grupos de acordo com seu substrato específico e com a organização do seu domínio catalítico (Kupai et al., 2010). As collagenases são as MMP-1, MMP-8 e MMP-13 e são capazes de quebrar principalmente o colágeno I, II e III (Bächinger et al., 2010). A primeira metaloproteinase descrita foi uma collagenase (MMP-1) identificada em 1962 por Jerome Gross e Charles Lapiere quando estudavam a reabsorção da cauda de girino (Gross et al., 1962). As gelatinases são as MMP-2 e MMP-9, que degradam os COL V e IV (Kupai et al., 2010). As matrilisinas, MMP-7 e MMP-26, eliminam a fibronectina (Kupai et al., 2010). As MMPs de membrana são as MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25, que podem degradar inúmeras proteínas da matriz extracelular, como fibronectina e laminina (Kupai et al., 2010). As estromelisinases, MMP-3 e MMP-

10, degradam a fibronectina, laminina e elastina (Navarro et al., 2006). Existe ainda outro grupo amplo de metaloproteinases ainda não classificadas (Kupai et al., 2010).

As metaloproteinases podem ser desativadas pelos Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs) (Min et al., 2012; Nikkola et al., 2005). São quatro os tipos: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 (Schulz, 2007). Ao se unirem às metaloproteinases, os TIMPs obstruem o sítio ativo, isso impossibilita o acesso da metaloproteinase ao seu substrato específico (Spinale et al., 2000).

Os tipos de colágeno são enumerados por algarismos romanos (Franco et al., 2010). Há relatos de 27 tipos de colágenos compilados por 41 genes dispostos em pelo menos 14 cromossomos distintos (Bächinger et al., 2010)

Os colágenos são produzidos basicamente pelos fibroblastos (Figura 1), mas eventualmente as células epiteliais, endoteliais e os miofibroblastos também podem sintetizá-los (Chanut-Delalande et al., 2004). As cadeias individuais polipeptídicas de colágeno são sintetizadas nos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso (RER). Essas cadeias chamadas de pró- α são dirigidas através de sinais da sua porção curta amino-terminal até o lúmen do RER. Há aminoácidos adicionais importantes nas extremidades, chamados de N- e C- terminais. No lúmen do RER, prolinas e lisinas são hidroxiladas para formar hidroxiprolina e hidroxilisina, respectivamente, e algumas das hidroxilisinas serão glicosiladas. Cada cadeia pro- α depois se combina com mais duas cadeias pro- α através de pontes de hidrogênio, formando uma cadeia de tripla hélice, conhecida como procolágeno (Kumar et al., 2010).

Após a secreção, os propeptídeos das moléculas de procolágeno fibrilares são removidos por enzimas proteolíticas específicas. Isto converte as moléculas de procolágeno em moléculas de colágeno, que no espaço extracelular agrupam-se e formam fibrilas de colágeno (Bächinger et al., 2010).

Esses propeptídeos têm pelo menos duas funções. Em primeiro lugar, eles guiam a formação intracelular das moléculas de cadeia tripla de colágeno. Em segundo, são removidos apenas depois da secreção, isto previne a formação de fibrilas de colágeno intracelular, o que seria catastrófico para a célula (Bächinger et al., 2010).

As fibrilas começam a formar-se perto da superfície da célula; ocorre fusão de vesículas secretoras na superfície da membrana plasmática da célula (Gelse et al., 2003).

A fibrilogênese colágena está associada à oxidação de resíduos peculiares de lisina e hidroxilisina por uma enzima extracelular, a lisil oxidase. Isso forma a ligação cruzada entre as cadeias de moléculas pareadas, estabilizando o arranjo próprio do colágeno. A ligação cruzada confere ao colágeno uma forte resistência tênsil (Kumar et al., 2010). As moléculas de tropocolágeno agregam-se segundo uma orientação cabeça-cauda formando as fibrilas de colágeno que podem associar-se para formar as fibras de colágeno (Prockop et al., 1979).

Figura 1 - Resumo da produção de colágeno. 1: Síntese das cadeias alfas. 2: Formação da tripla hélice pelas cadeias alfas para formar o procolágeno. 3: Eliminação dos telopeptídeos para formar a molécula de colágeno ou tropocolágeno. 4: Agregação das fibrilas formando as fibras de colágeno. *Fonte: adaptado de (Bruce et al., 1994).*

O colágeno I é o colágeno mais abundante nos vertebrados. Sugere-se que a evolução deste tipo de colágeno tornou possível aos animais vertebrados viverem fora da água, pois conseguiriam resistir às forças gravitacionais fora de um ambiente aquático. Estima-se que mais de 90% de todas as moléculas de colágeno do corpo sejam do tipo I. Esta molécula é um componente importante de fibrilas de colágeno no osso, tendão, ligamento e pele. Sua molécula contém duas cadeias: alfa-1(I) e uma cadeia alfa-2(I) (Bächinger et al., 2010).

Colágeno do tipo III pertence ao grupo de colágeno fibrilar. A sua estrutura molecular é semelhante à do colágeno de tipo I. A molécula é um homotrímero composto por cadeias alfa-1(III). A derme e aorta são os tecidos que mais apresentam colágeno do tipo III (Bächinger et al., 2010).

2.2.1.1 Colágeno V

Foi na placenta humana que Burgeson et al. (1976) identificaram pela primeira vez o COL V, que logo em seguida foi encontrado na pele por Chung et al. (1976). Ele corresponde a cerca de 2 a 4% do total de fibras colágenas na pele (Smith et al., 1986). É possível ainda, encontrar o COL V no osso, na córnea, músculos, tendões, fígado e pulmões (Gelse et al., 2003).

Fibrilas muito finas de COL V (5 a 10 nm de diâmetro) têm sido descritas na região da membrana basal (Woodley et al., 1987), estendendo-se até a matriz intersticial adjacente (Adachi et al., 1997; Gay et al., 1981; Modesti et al., 1984). Além disso, elas envolvem a porção subendotelial dos vasos sanguíneos (Madri et al., 1980; Mayne et al., 1993).

O COL V pertence ao grupo de colágenos que formam fibrilas, como os tipos I, II, III e XI (Gelse et al., 2003).

O COL V copolimeriza-se com os colágenos dos tipos I e III para configurar fibrilas heterotípicas (I-III-V). Nesta conformação, a parte da tripla hélice helicoidal do COL V encontra-se escondida no meio das fibrilas (Figura 3) e o seu domínio globular amino terminal projeta-se para a superfície e bloqueia fisicamente a ligação de novos monômeros à fibrila (Birk, 2001; Birk et al., 1990; Linsenmayer et al., 1993). Por isso, o COL V tem função importante na organização, no crescimento e dimensionamento do diâmetro das fibrilas heterotípicas (Birk et al., 1990; Gelse et al., 2003).

Figura 2 - Secção transversal (esquema inferior) de uma fibrila heterotípica de colágeno. Composição: colágeno tipo I (branco), III (preto) e V (azul). O domínio amino-terminal da molécula de COL V é importante na regulação do diâmetro da fibrila de colágeno. Ao se projetar na superfície externa da fibrila, presumivelmente bloqueia a agregação de mais moléculas de colágeno através de mudanças na configuração espacial e / ou elétrica da fibrila. As moléculas de colágeno na vista longitudinal (esquema do meio) estão alinhadas em paralelo, em um arranjo escalonado (68 nm), com 40 nm de lacuna entre as moléculas. Além disso, na visão longitudinal (superior), as extremidades das cadeias alfas das moléculas de colágeno mostram ligações cruzadas intermoleculares com as moléculas de colágeno adjacentes. *Fonte: (Tasman et al., 2006).*

Há três isoformas de COL V (Figura 3), que diferem pela composição de suas cadeias. A forma mais comum e largamente distribuída encontrada na pele, pulmão, rim, entre outros é a heterotrímera. Ela é formada por duas cadeias alfa-1 do tipo V e uma cadeia alfa-2 do tipo V [$\alpha 1(V)_2 \alpha 2(V)$]. Há outra forma heterotrímera, composta por três cadeias distintas [$\alpha 1(V) \alpha 2(V) \alpha 3(V)$], que é encontrada mais comumente na placenta, e a forma homotrímera [$\alpha 1(V)_3$], encontrado no tecido fetal (Bächinger et al., 2010; Miller et al., 1982).

Figura 3 - Resumo dos tipos de isoformas de COL V.

O COL V está presente em várias espécies de animais e sempre conserva os seus telopeptídios NH₂ e COOH terminais. Estes quando expostos deixam a molécula mais imunogênica (Niyibizi et al., 1984), e o COL V passa a ser um alvo do sistema imunológico (Haque et al., 2002; Mares et al., 2000). Já vimos acima que o COL V interage com o COL I, de forma que epítomos do COL V fiquem ocultos (escondidos do sistema imunológico) entre as fibrilas heterotípicas. Quando ocorre quebra das fibras de colágeno, o COL V fica desprotegido e expõe seus epítomos que funcionam como um antígeno desconhecido e ativam o sistema imune (Martin et al., 2012). O COL V teria

mais uma função, a de induzir a apoptose, através da regulação da expressão de genes apoptóticos (Parra et al., 2010).

2.2.2 ECM-1

A ECM-1 foi identificada em 1994 como uma glicoproteína de 85-kDa secretada por uma linhagem de células osteogênicas de rato, conhecida como MN7 (Mathieu et al., 1994).

O gene do homólogo humano da ECM-1 foi isolado em 1997 e mapeado no cromossomo 1q21 (Johnson et al., 1997; Smits et al., 1997). O gene da ECM-1 tem três variantes de splicing: ECM-1a, ECM-1b e ECM-1c, que codificam proteínas de 540, 415 e 559 aminoácidos, respectivamente. A ECM-1a é codificada por um gene de 10 exons, enquanto que a ECM-1b perde o exon 7 e a ECM-1c contém um exon 5a adicional dentro do intron 5 (Smits et al., 1997).

O gene da ECM-1 está localizado adjacente à região do complexo de diferenciação epidérmica no cromossoma 1q21, um locus que contém um conjunto de três famílias de genes envolvidos na diferenciação da epiderme (Smits et al., 1997). A ECM-1a foi encontrada nos queratinócitos basais e a ECM-1b em células suprabasais (Smits et al., 2000).

A primeira função atribuída a ECM-1 foi a de um regulador negativo da formação óssea endocondral inibindo a mineralização (Deckers et al., 2001). Já foi demonstrado que as isoformas ECM-1a e ECM-1b foram capazes de estimular a proliferação de células endoteliais e promover a angiogênese em embriões de galinha (Han et al., 2001).

Recentemente ficou demonstrado que ocorre uma interação importante entre a ECM-1 e a MMP-9 (Fujimoto et al., 2006). Esta interação reduz a atividade enzimática da MMP-9 que é uma gelatinase importante na degradação do COL IV e V (Fujimoto et al., 2006). Entretanto, o papel preciso da ECM-1 na pele humana permanece um mistério.

Novas pistas surgiram com anormalidades da ECM-1 sendo implicadas em duas doenças: uma genodermatose rara, a LPE e uma doença de pele inflamatória, o LS (Chan, 2004).

Os possíveis papéis da ECM-1 na pele humana são ilustrados na Figura 4.

Figura 4 - As possíveis funções da ECM-1 na pele humana. *Fonte: adaptado de (Chan, 2004).*

A LPE é uma doença autossômica recessiva rara caracterizada por cicatrizes e espessamento generalizado da pele e mucosas (Hamada, 2002; Urbach et al., 1929). Outras características incluem: pápulas nas pálpebras e principalmente uma voz rouca na infância (Hamada, 2002).

Em 2002, esta doença foi mapeada no cromossomo 1q21 e a sua patogênese associada a perda de função do gene da ECM-1 (Hamada et al., 2002). Esta descoberta forneceu a primeira indicação clínica relevante do potencial da proteína ECM-1.

Ela foi associada a diferenciação epidérmica, a cicatrização de feridas, a angiogênese, e a integridade da membrana basal (Hamada et al., 2003). Histologicamente, a pele de pacientes com LPE mostra hiperqueratose, espessamento da membrana basal na junção dermo-epidérmica e ao redor dos vasos sanguíneos, bem como a presença de material hialino na derme (Hamada, 2002). Isto sugere que a falta da ECM-1 pode influenciar no padrão normal de diferenciação epidérmica, bem como alterar a derme (Hamada, 2002).

As alterações da derme podem ser devido a falta de ligação normal da ECM-1 com perlecan, bem como a outras proteínas, ainda não caracterizadas no interior da derme (Hamada, 2002; Hamada et al., 2003). É plausível que uma das principais funções da ECM-1 na derme é agir como uma "cola biológica", ajudando a regular a membrana basal e a macro montagem do colágeno fibrilar (Chan et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos

Estudar a expressão do COL V e sua relação com a proteína 1 da matriz extracelular no remodelamento da pele de pacientes com LS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Biópsias

Para este estudo foram utilizados 21 blocos parafinados de biópsias da vulva de pacientes com diagnóstico de LS. Os espécimes foram coletados nos laboratórios de Patologia e Dermatopatologia da Faculdade de Medicina da USP. Foram analisados espécimes de 1998 até 2011 de biópsias com diagnóstico de LS na vulva e agrupados por idade entre 45 e 85 anos. Os critérios de exclusão incluíram: 1) pacientes fora da faixa etária referida; 2) exiguidade da amostra; 3) associação com neoplasias ou infecção fúngica na camada córnea e 4) ausência da característica faixa hialinizada na derme superficial à histologia.

Para controle foram incluídas 21 biópsias de vulva obtidas durante a necropsia no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da USP em cadáveres com idade entre 45 e 88 anos, não mais que 6 horas de óbito e ausência de lesões macroscópicas locais.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo 0233/09, Anexo 1).

As biópsias de pele foram fixadas em formol a 10% tamponado e incluídas em parafina. Cortes de 4µm foram corados pela HE, Verhoeff e montados em lâminas com 3-aminopropiltriethoxysilano (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) para imunofluorescência e imunoistoquímica.

As biópsias foram analisadas por dois patologistas que desconheciam as características clínicas das pacientes. Os casos controle apresentavam ausência de doença cutânea.

4.2 Imunofluorescência – Colágenos I, III e V

Para executar a imunocoloração do COL I, COL III e COL V, as lâminas foram preparadas com 3-aminopropiltietoxisilano (Sigma Chemical Co), desparafinadas com xilol e hidratadas em etanol gradualmente.

A recuperação do antígeno foi realizada através de tratamento enzimático com pepsina bovina (10,000 unidades secas/ml) (Sigma Chemical Co.) em solução tampão de ácido acético de 0,5N por 30min a 37°C.

Para a imunodeteção do COL I, COL III and COL V sítios não específicos foram bloqueados com H₂O₂ a 3% por 25 minutos, depois bloqueados com avidina e biotina (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) por 10 minutos cada, e finalmente bloqueados com leite desnatado a 5% em tampão de fosfato-salino (PBS) por 30 minutos.

As amostras de pele foram incubadas de um dia para o outro a 4°C com COL V não humano policlonal de coelho (Spiess et al., 2007) (1:50), com COL III não humano policlonal de coelho (Spiess et al., 2007) (1:200) ou com anticorpos policlonais não humanos de coelho contra COL I (Spiess et al., 2007) (1:150).

Os cortes de pele foram lavados em PBS com Tween20 a 0,05% e incubados por 90 minutos a temperatura ambiente com anticorpo IgG de cabra anti-coelho conjugados com fluoresceína (Sigma Chemical Co.) diluída a 1:50

em uma solução PBS contendo azul de Evans a 0,006%. Finalmente, as amostras foram preparadas em glicerol tamponado e analisadas usando microscopia de fluorescência (Olympus BX51, Olympus Co, Tokyo, Japan). Para controles negativos e autofluorescentes, os cortes foram incubados com PBS e soro normal de coelho ao invés do anticorpo específico. Para controles positivos, foram usados cortes de língua.

A coloração verde fluorescente foi considerada como evidência da presença do Col V nos diferentes compartimentos.

4.3 Reconstrução tridimensional das fibras de COL V e ECM-1

A técnica por imunofluorescência foi utilizada para detectar dupla marcação para o COL V e ECM-1. Foi utilizado COL V não humano policlonal de coelho (Spiess et al., 2007) (1:50) com anticorpo não humano ECM-1 policlonal de rato (Santa Cruz, sc-365335) (1:25), todos diluídos em PBS. IgG de cabra anti-rato conjugado com Alexa 488 (1:200, Invitrogen, Eugene, OR, USA) e IgG de cabra anti-coelho conjugado a Alexa 633 (1:200, Invitrogen) foram usados como anticorpos secundários. Por fim, a reação foi analisada com um microscópio confocal com varredura a laser (Zeiss LSM 510 META/UV, Germany) para a reconstrução 3D das fibras de COL V e da ECM-1.

4.4 Imunoistoquímica - ECM-1

O método da estreptoavidina-biotina foi utilizado para o estudo imunoistoquímico. As amostras foram submetidas a cortes de 4µm de espessura, com recuperação antigênica através da utilização de pepsina a 1%, durante 60 minutos a 37°C. Posteriormente, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 10 volumes, e

consecutivamente, incubação dos anticorpos primários anti-ECM-1 (Santa Cruz, sc-365335, diluição 1:50) em solução tampão TRIS-HCL, pH 7.4. O anticorpo secundário foi utilizado na diluição de 1:100 durante 30 minutos, seguindo-se a incubação do complexo estreptoavidina-biotina (Dako Glostrup Denmark) na diluição de 1:100, por um período de 30 min. Finalmente, os cortes foram revelados por solução cromógena de diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical CO USA).

4.5 Histomorfometria

Histomorfometria por análise digital foi realizada para quantificar a densidade das fibras de COL I, COL III e COL V e imunoexpressão da ECM-1. O sistema de análise de imagem utilizado consiste em uma câmera Olympus (Olympus Co, St Laurent, Quebec, Canada) acoplada a um microscópio Olympus (Olympus BX51), a partir dos quais as imagens são enviadas a um monitor LG mediante um sistema digitalizador (Oculus TCX, Coreco, Inc, St. Laurent, Quebec, Canada) e descarregadas em um computador (Pentium 1330Mhz). As imagens são então processadas com um software ImagePro-Plus 6.0 (Parra et al., 2009).

A fração de área das fibras do colágeno foi obtida em uma área delimitada pela membrana basal, incluindo a derme papilar e parte da derme reticular obtidas no campo microscópico observado em um aumento de x400. O limiar para as fibras de colágeno foi estabelecido para todas as lâminas após o contraste ter sido reforçado para um ponto no qual as fibras foram facilmente identificadas como bandas verdes. A fração de área das fibras do colágeno foi

expressa como a razão entre a área de fibras medidas dividido pela área total estudada (Parra et al., 2009). Todos os campos microscópicos para cada lâmina foram quantificados, e os resultados foram expressos como a média destes campos.

A fração de área ocupada pela expressão de ECM-1 na imunoistoquímica foi realizada ao redor dos vasos sanguíneos e na epiderme. Foram selecionados todos os campos não coincidentes que incluíram os seguintes compartimentos: epiderme, derme superficial e parcialmente a profunda, visualizados sob aumento de 400 vezes. A ECM-1 foi identificada através da intensidade da imunomarcção ao redor dos vasos sanguíneos e na epiderme. Apenas os vasos com forte e média expressão de ECM-1 foram considerados imunomarcados. A fração de área ocupada pela ECM-1 foi obtida pela razão entre a soma das áreas imunomarcadas dividida pela quantidade total de vasos presentes no campo. Na epiderme, a fração de área ocupada pela expressão de ECM-1 foi obtida através da razão entre as áreas imunocoradas divididas pela área total da epiderme no campo.

4.6 Análise Estatística

O software computacional utilizado para auxiliar a análise estatística foi Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA). Os dados foram expressos em média e desvios padrões para as variáveis contínuas e em porcentagens para as variáveis categóricas. O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$ e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%). A distribuição normal dos dados nos grupos foi testado por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e utilizado o teste de Mann-Whitney para a

comparação entre variáveis contínuas não pareadas e não paramétricas e teste t de Student para variáveis contínuas pareadas e paramétricas.

5 RESULTADOS

5.1 Descrição da Casuística

Na Tabela 2 pode ser visualizada a média de idade das pacientes com LS ($67,29 \pm 12,34$) e a do grupo controle ($69,48 \pm 12,23$). Não houve diferença estatística para as médias de idades entre os dois grupos ($p>0,05$).

Tabela 2 - Distribuição das Idades das pacientes de acordo com os grupos.

	Média	Mediana	Mínima	Máxima	Desvio Padrão
Controles	69,48	73,00	45,00	88,00	$\pm 12,23$
LS	67,29	68,00	45,00	85,00	$\pm 12,34$

A Tabela 3 inclui a distribuição dos casos de LS de acordo com idade, cor, queixa e duração no momento em que a paciente se apresenta ao médico. Outras comorbidades presentes também foram incluídas. 71,4% das pacientes com LS eram de cor branca e 28,6% de cor parda. Todas pacientes apresentaram prurido, sendo que 14,28% tiveram vulvodínia e 9,52%, dispareunia. A média do tempo de evolução da doença até o paciente procurar os ambulatórios de ginecologia ou dermatologia da Faculdade de Medicina da USP foi de 14,95 meses $\pm 11,49$. As doenças auto-imunes presentes em pacientes com LS incluíram hipotireoidismo (19,04%) e vitiligo (4,76%).

Tabela 3 - Características clínicas das pacientes com LS

Pacientes	Idade (anos)	Cor	Queixas	Duração (meses)	Outras doenças
1	62	Branca	Prurido	30	HAS*
2	81	Parda	Prurido	15	DM2**+HAS
3	62	Branca	Prurido+Vulvodínia	12	HAS
4	55	Branca	Prurido+Dispareunia	12	
5	85	Parda	Prurido	18	DM2+HAS
6	73	Branca	Prurido	2	Hipotireoidismo
7	84	Branca	Prurido	3	HAS
8	68	Parda	Prurido	18	
9	64	Branca	Prurido	36	
10	73	Branca	Prurido	12	Hipotireoidismo
11	45	Branca	Prurido+Vulvodínia	3	HAS
12	62	Parda	Prurido	6	
13	74	Branca	Prurido	24	DM 2+HAS
14	62	Branca	Prurido	4	
15	72	Branca	Prurido	36	Vitiligo
16	59	Parda	Prurido+Vulvodínia	12	Hipotireoidismo
17	46	Branca	Prurido	3	
18	77	Branca	Prurido	12	HAS
19	84	Branca	Prurido	17	HAS
20	77	Parda	Prurido	3	Hipotireoidismo
21	48	Branca	Prurido+Dispareunia	24	

* HAS = Hipertensão arterial sistêmica, ** DM2 = Diabetes mellitus tipo 2

Na Tabela 4 mostra a idade, cor e causa do óbito dos controles incluídos neste estudo. 76,2% dos controles eram brancos e 23,8% pardos.

Tabela 4 - Características clínicas dos casos controle

Casos	Idade	Cor	Causa do óbito
1	79	Branca	DPOC*
2	45	Parda	Hepatopatia colestática
3	66	Parda	IAM**
4	73	Branca	Edema pulmonar + ateroscleose
5	59	Branca	Tromboembolismo pulmonar
6	85	Branca	Broncopneumonia
7	54	Branca	Edema Agudo de Pulmão
8	82	Branca	Tromboembolismo pulmonar
9	57	Branca	DPOC
10	77	Branca	IAM
11	58	Parda	Miocardiopatia Hipertrófica
12	81	Branca	IAM
13	79	Branca	Aneurisma de Aorta Roto
14	74	Branca	Hemopericardio+Tamponamento cardíaco
15	59	Parda	IAM
16	72	Branca	IAM
17	50	Branca	IAM
18	75	Branca	AVCI***
19	68	Parda	IAM
20	78	Branca	IAM
21	88	Branca	IAM

* DPOC = Doença pulmonar obstrutiva crônica, ** IAM = Infarto agudo do miocárdio,

*** AVCI = Acidente vascular cerebral isquêmico.

5.2 Hematoxilina e Eosina

Sob coloração com HE, a pele do LS caracteriza-se pela presença de área hialina subepidérmica em forma de faixa, atrofia epidérmica, hiperqueratose e um leve infiltrado inflamatório linfocitário na transição entre a área hialina e a derme média (Figura 5).

Figura 5 – A) Pele normal do controle. HE 200x. B) Pele com LS: em que pode ser observado área hialina na região subepidérmica (setas pretas), a escassez de vasos sanguíneos, infiltrado inflamatório linfocítico (seta branca), atrofia epidérmica e hiperqueratose (setas amarelas). HE 200x.

5.3 Verhoeff

Sob coloração com Verhoeff, a faixa hialina observada no LS exibe uma diminuição significativa das fibras elásticas quando comparada à pele dos controles (Figura 6AB). A análise morfométrica mostrou que estes achados foram significativos ($1,85\% \pm 1,46$ vs $10,27\% \pm 1,68$; $p < 0,001$, Figura 6C).

Figura 6 – A) Distribuição normal das fibras elásticas, marcadas em preto pela coloração de Verhoeff (seta branca) (400x). B) Diminuição de fibras elásticas na área hialina (seta verde) no LS pela coloração de Verhoeff (400x). C) Gráfico “Box Plot” mostra a mediana e os intervalos interquartis da quantidade de fibras elásticas no controle e LS. * Controle vs LS ($p < 0,001$).

5.4 Imunofluorescência - Colágenos I e III

Figura 7AB demonstra as fibras do colágeno na derme de peles do grupo controle e de LS, imunocoradas pelo COL I e observadas sob microscópio para imunofluorescência. Peles do grupo controle mostraram fraca e homogênea distribuição das fibras do COL I. Em contraste, peles de pacientes com LS exibiram desarranjo da arquitetura e difuso aumento da fluorescência verde clara do COL I na derme. Observação esta encontrada na mesma região correspondente a faixa hialina observada na coloração HE e com a ausência de fibras elásticas coradas pelo Verhoeff. A fração de área ocupada pelas fibras do COL I é apresentada sob forma de gráfico na Figura 7C. Ela foi significativamente maior na pele de pacientes com LS em comparação com o controle ($39,73\% \pm 6,93$ vs $35,55\% \pm 5,01$; $p=0,03$; Figura 7C).

Figura 7 - Biópsia de pele obtida de pacientes com LS e controle imunocoradas para COL I e visualizadas ao microscópio de fluorescência (A,B). No grupo controle (A) a pele mostra fraca e homogênea imunofluorescência verde do COL I (seta branca), coincidente com a manutenção da arquitetura cutânea demonstrada na coloração de HE. Em contraste, pele dos portadores de LS (B), evidenciou desarranjo da arquitetura dérmica por difuso espessamento da derme superficial e média com evidente aumento de fibras do COL I em verde claro (seta branca). Nota-se ainda clivagem entre a epiderme e derme (seta amarela). O gráfico “Box Plot” (C) mostra a mediana e os intervalos interquartis da quantidade de fibras do COL I no controle e LS. * Controle vs LS ($p=0,030$).

A Figura 8AB apresenta as fibras do colágeno na derme das peles do grupo controle e de LS, imunocoradas com COL III e observadas sob microscópio para imunofluorescência. Peles do grupo controle apresentaram moderada e homogênea distribuição das fibras do COL III. Enquanto isto, peles de pacientes com LS exibiram desarranjo da arquitetura, difuso aumento da fluorescência verde clara na derme. Fato este que se correlacionou com a faixa hialina vista na HE e ausência de fibras elásticas no Verhoeff. A expressão gráfica da fração de área ocupada pelas fibras do COL III é apresentada na Figura 8C. A fração de área ocupada pelas fibras de COL III foi significativamente maior na pele de pacientes com LS em comparação com o controle ($35,30\% \pm 10,71$ vs $26,66\% \pm 1,66$; $p < 0,001$; Figura 8C).

Figura 8 - Biópsia de tegumento cutâneo obtida de pacientes com LS e controle imunocoradas para COL III e visualizadas ao microscópio de fluorescência (A,B). Pele do grupo controle (A) mostra moderada e homogênea imunofluorescência verde fluorescente do COL III (seta branca), coincidente com a manutenção da arquitetura cutânea na HE. Em contraste, espécime cutâneo de pacientes com LS (B) mostra fibras do COL III (seta branca) verde claras fluorescente em meio a um fundo verde mais escuro. Nota-se ainda desarranjo da arquitetura dérmica em disposição difusa e homogênea. Em C, o gráfico “Box Plot” mostra a mediana e os intervalos interquartis da quantidade de fibras do COL III no controle e LS. *Controle vs LS ($p < 0,001$).

5.5 Imunofluorescência - Colágeno V

A análise da Figura 9AB detecta fibras do colágeno na derme das peles do grupo controle e de LS, imunocorados com COL V quando observadas sob microscópio para imunofluorescência. Peles do grupo controle mostraram fraca e homogênea distribuição das fibras do COL V. Em contraste, peles de pacientes com LS exibiram desarranjo da arquitetura e difuso aumento da fluorescência verde na derme. Isto também coincidiu com a área da faixa hialina submetida à coloração HE e no Verhoeff com a ausência de fibras elásticas. A expressão gráfica da fração de área ocupada pelo COL V é apresentada na Figura 9C. A fração de área das fibras de COL V foi significativamente maior na pele de pacientes com LS em comparação com o controle ($6,31\% \pm 1,39$ vs $3,90\% \pm 0,56$; $p < 0,001$; Figura 9C).

Figura 9 - Biópsia de pele obtida de pacientes com LS e controle imunocoradas para COL V e visualizadas ao microscópio de fluorescência (A,B). Pele do grupo controle (A) mostra de fraca a moderada homogeneidade da imunofluorescência verde do COL V (seta branca), coincidente com a manutenção da arquitetura cutânea na HE. Em contraste, espécime cutâneo de pacientes com LS (B) mostra proeminente desarranjo da arquitetura da derme superficial e média. Com fibras do COL V (seta branca) dispostas de forma difusa e não homogênea. Em C, o gráfico “Box Plot” mostra a mediana e os intervalos interquartis da quantidade de fibras do COL V no controle e LS. * Controle vs LS ($p < 0,001$).

5.6 Microscopia Confocal

Figura 10 demonstra as fibras do colágeno na derme de peles do grupo controle e de LS, duplamente imunocoradas com ECM-1 e COL V e observadas sob microscópio confocal a laser. Peles do grupo controle mostraram uma distribuição irregular da ECM-1 e das fibras do COL V na parede de pequenos vasos e ao longo da membrana basal (A). Por outro lado, peles de pacientes com LS, exibiram desarranjo da arquitetura e difuso aumento da fluorescência verde na derme pela presença do COL V (B). Nota-se ainda importante diminuição da ECM-1 nos vasos (B). Isto se correlacionou com a faixa hialina notada na HE e com a ausência de fibras elásticas no Verhoeff.

Figura 10 - A) Co-localização da ECM-1 e do COL V na parede de pequenos vasos (seta) e ao longo da membrana basal de forma intermitente (cabeça da seta) em peles controles. B) Em contraste, no LS houve perda de expressão da ECM-1 nos vasos sanguíneos e difuso aumento da fluorescência verde do COL V (B).

5.7 Imunoistoquímica - ECM-1

Figura 11AB demonstra a expressão proteica da ECM-1 na epiderme, derme e vasos sanguíneos das peles do grupo controle e de LS. Peles do grupo controle mostraram proeminente e homogênea expressão da ECM-1 na parede de pequenos vasos dérmicos e ao longo da membrana basal. Em contraste, peles de pacientes com LS exibiram grande atenuação da imunoexpressão da ECM-1 nos vasos, porém a imunoexpressão foi preservada ao longo da epiderme (B). A fração de área ocupada pela ECM-1 ao redor dos vasos foi significativamente menor na pele de pacientes com LS em comparação com o grupo controle ($50,75\% \pm 4,71$ vs $80,70\% \pm 4,71$; $p < 0,001$; Figura 11C). Enquanto isto, não houve diferença significativa da expressão epidérmica da ECM-1 no grupo controle quando comparado no grupo no LS ($p = 0,274$).

Figura 11 - Biópsia de pele obtida de pacientes com LS e controle imunocoradas para ECM-1 (A,B). Em A, pele do grupo controle mostra expressão proeminente e homogênea da proteína ECM-1 na parede dos pequenos vasos dérmicos (seta amarela). Em contraste, peles de pacientes com LS mostram atenuação da expressão de ECM-1 pelos pequenos vasos dérmicos (seta amarela) enquanto ainda permanece quantitativamente em níveis normais ao longo da epiderme (B). Em C, o gráfico “Box Plot” mostra a mediana e os intervalos interquartis da quantidade ECM-1 no controle e LS. *Controle vs LS ($p < 0,001$).

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi estudada a expressão do COL V e sua relação com a ECM-1 no remodelamento da pele de pacientes com LS. De maneira geral, foi significativamente maior a expressão de COL V (62%), COL III (32%) e COL I (12%) no casos de LS em relação ao controle. Especificamente, os controles mostraram co-localização da ECM-1 e do COL V na parede de pequenos vasos e ao longo da membrana basal, enquanto que no LS houve atenuação ou perda da expressão da ECM-1 e difuso aumento da fluorescência verde do COL V.

Um achado a destacar foi à redução das fibras elásticas, achado também relatado por outros autores (Farrell et al., 2001; Oikarinen et al., 1991). A constatação da diminuição ou ausência de fibras elásticas na área hialina tem sido proposta como um método para distinguir o LS de morféia (Rahbari, 1989).

Segundo Rahbari (1989) a diminuição das fibras elásticas ocorreria nos estágios iniciais do LS, pois o edema na derme superficial desloca as fibras de elastina para a periferia da área hialina, onde são posteriormente destruídas (Steigleder et al., 1961). Ademais, Douglas et al. (1986) demonstraram aumento da atividade de uma protease do tipo elastase em culturas de tecidos derivados de peles com LS quando comparadas a peles normais.

O aumento de COL I e COL III encontrados neste estudo são consistentes com vários outros trabalhos (Correa, 2000; Mihara et al., 1994; Oikarinen et al., 1991). Entretanto, em um estudo de imunoistoquímica utilizando anticorpos para COL I e COL III foi relatada a diminuição de coloração com estes anticorpos na área hialina do LS (Frances et al., 1983).

Pode ser que os anticorpos utilizados por estes autores apresentavam especificidade e sensibilidade diferentes dos anticorpos do presente estudo.

O aumento na síntese de colágeno ou diminuição de sua degradação envolve várias citocinas e outros elementos da matriz extracelular. Tal como, a interleucina pró-fibrótica, IL-4 que está aumentada no LS (Carli et al., 1997; Farrell et al., 2006). Fibroblastos provenientes de pacientes com LS e esclerodermia foram cultivados *in vitro*. Os fibroblastos do LS produziram cerca de 40% a mais de colágeno que o controle e os fibroblastos da morféia 138%. As células do LS também mostraram aumento na produção de glicosaminoglicanos, o que não foi observado nos fibroblastos da morféia (Griffiths et al., 1992).

Segundo Correa et al. (2007), o aumento da deposição de decorina na fase inicial do LS leva a alterações nas fibras de colágeno. Pois ao se ligar à parte externa das fibrilas colagênicas por meio do seu core protéico, a decorina diminui a taxa de formação fibrilar (Scott et al., 1988). Entretanto, com a evolução da doença ocorre gradual substituição da decorina por proteoglicano(s) contendo sulfato de condroitina (Correa et al., 2007), provavelmente devido à degradação da decorina pelas metaloproteinases que estão aumentadas no LS, tal como a metaloproteinase-2 (Bovo et al., 2004). A decorina é um forte inibidor do fator de transformação do crescimento beta (TGF-beta) que por sua vez, é um potente ativador de fibroblastos (Leof et al., 1986). O TGF-beta regula principalmente o aumento da expressão COL I, COL III, COL IV e COL V (Creely et al., 1992; Roberts, 2002). Isto também ocorre no padrão de esclerose mais estudado, a esclerodermia, que exibe aumento da

decorina em sua matriz na fase incipiente da doença, com posterior desaparecimento (Kuroda et al., 1997).

No presente estudo, além do aumento dos COL I e COL III, ocorreu um significativo aumento do COL V, o que também foi demonstrado por Harper et al. (1985) na LPE e detectado em outros estudos de esclerodermia (Bezerra et al., 2006; Teodoro et al., 2004).

O COL V apesar de menos abundante em relação aos demais tipos de colágenos, é um dos responsáveis pela interação com outros colágenos fibrilares. São exemplos, desta interação, o processo de ancoragem na região de membrana basal, através do COL IV, bem como a regulação do diâmetro das fibras heterotípicas, atuando nos colágenos I e III (Birk, 2001), de forma a desempenhar papel fundamental nos processos de proliferação e reparação.

Características moleculares particulares do COL V parecem conferir ainda propriedades imunogênicas a sua molécula, uma vez que conserva seus domínios globulares (NH_2 e COOH) durante a sua síntese, diferente de todos os outros tipos de colágeno (Teodoro, 2001). Tem sido considerado que no modelo animal de SSc induzido por COL V, a exposição destes epítomos ocultos entre as fibrilas de COL I e III, secundário ao processo inflamatório gerado após imunização, poderia funcionar como um neo-antígeno. Este seria capaz de perpetuar o estímulo das células inflamatórias e das demais células, de forma que o aumento do COL V no LS pode contribuir para o aumento ou a perpetuação do processo inflamatório (Martin et al., 2012).

A ocorrência de doenças auto-imunes são mais freqüentes, em pacientes com LS vulvar quando comparada à população em geral (Harrington et al., 1981). No presente estudo, 19,04%, das pacientes apresentaram hipotireoidismo e 4,76%, vitiligo. Em um estudo com 350 pacientes com LS, Thomas et al. (1996) demonstraram que 21,5% delas tinham história pessoal de doença auto-imune.

Várias alterações patológicas detectadas nos constituintes da matriz extracelular do LS podem ser explicadas por dados emergentes sobre o papel da ECM-1 na pele humana. A ECM-1 é conhecida por se ligar ao proteoglicano, perlecan (Mongiat et al., 2003), e a metaloproteinase, MMP-9 (Terlizzi et al., 2004).

A MMP-9 é um regulador chave do COL IV (Niyibizi et al., 1994). É provável que a diminuição da ECM-1 leve a um aumento da MMP-9 livre (Terlizzi et al., 2004). A MMP-9 livre por sua vez quebra o COL IV gerando fragmentos da cadeia alfa-3 de COL IV conhecido por tumistatina (Sercu et al., 2009). A tumistatina ativa TGF-beta que é conhecido por estimular a proliferação de fibroblastos e induzir a síntese e secreção de proteínas da matriz extracelular (Massague, 1998). Além disso, o TGF-beta diminui a expressão de enzimas proteolíticas, tais como a MMP-3 e MMP-9 (Eickelberg et al., 1999). Estes achados poderiam justificar o aumento de TGF-beta no LS de acordo com o relatado por Farrell et al. (2001). E o aumento do TGF-beta ajudaria a explicar o aumento do COL V e das das outras fibras heterotípicas de COL I e III.

Mongiat et al. (2003) demonstraram uma relevante co-localização entre ECM-1 e perlecan ao redor dos vasos sanguíneos dérmicos e dos anexos cutâneos. O perlecan é também conhecido por se ligar a fibronectina, laminina, COL IV, fibulina 2, distroglicana e ao fator de crescimento de fibroblastos (Dunlevy et al., 2000; Mongiat et al., 2003). A Interrupção dessas associações poderia explicar em parte as anomalias observadas na quantidade de colágeno na área hialina do LS (Oyama et al., 2003).

A possibilidade da ECM-1 representar um alvo da imunidade humoral no LS foi levantada pelas alterações histológicas observadas nos casos desta doença. A histologia do LS é semelhante a da LPE, uma doença genética que não produz a ECM-1. Devido a essa semelhança, estudos para buscar anticorpos que poderiam destruir a ECM-1 no LS foram realizados. Oyama et al. (2003) mostraram que auto-anticorpos circulantes contra a ECM-1 estavam presentes no soro da maioria das pacientes com LS. A detecção desses auto-anticorpos contra a ECM-1 no LS, parecia ser mais do que apenas um epifenômeno, uma vez que não foram observados em outras doenças esclerosantes (Oyama et al., 2003).

A LPE foi uma das doenças que mais contribuiu para elucidar algumas das funções dessa proteína. Características observadas no LS parecem também ajudar a melhorar o conhecimento das funções da ECM-1 na pele humana, uma vez que os anticorpos contra a ECM-1 interrompem a função normal dessa proteína. Segundo Smits et al. (2000), a isoforma ECM-1b tem um papel na diferenciação dos queratinócitos, portanto, a sua alteração pode levar a atrofia epidérmica, devido às alterações na dinâmica de maturação de

queratinócitos normais. Na derme, o espessamento da membrana basal e a aparência hialina do colágeno podem decorrer das perturbações na ligação normal da ECM-1 com o perlecan (Mongiat et al., 2003) e a MMP-9 (Terlizzi et al., 2004).

No presente estudo, um achado relevante foi a inversão entre a relação COL V e a proteína ECM-1 na parede de pequenos vasos dérmicos. Este achado favorece a hipótese da destruição desta proteína nos casos de LS. Dessa maneira pode ser concluído que a ECM-1 desempenha um papel importante na estrutura e função normal da pele humana. Ademais a sua diminuição pode ser a responsável, mesmo que indiretamente, pelo aumento de COL V.

7 CONCLUSÕES

Concluimos que houve relação do colágeno V com a proteína 1 da matriz extracelular através das seguintes constatações:

- Com a reconstrução tridimensional do colágeno V e ECM-1, observamos um aumento e desorganização estrutural das fibras deste colágeno nos pacientes com LS e uma co-localização entre ECM-1 e colágeno V, melhor evidenciada nos casos controles.
- O aumento da quantidade de colágeno V na imunofluorescência.
- A diminuição da ECM-1 ao redor dos vasos sanguíneos evidenciada pela imunoistoquímica.

Estratégias terapêuticas para prevenir o aumento da síntese de colágeno V e a diminuição da ECM-1, poderão ser promissoras no prognóstico e tratamento do LS.

Anexo 1: Carta de aprovação da CAPPesq

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 20/05/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0233/09**, intitulado: **"ESTUDO DA EXPRESSÃO DO COLÁGENO V E SUA RELAÇÃO COM A PROTEÍNA 1 DA MATRIZ EXTRACELULAR NO REMODELAMENTO DA PELE DE PACIENTES COM LÍQUEN ESCLEROSO"** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

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: **Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi**

Pesquisador (a) Executante: **Charles Antonio Pires de Godoy**

Orientadores: **Profa. Dra. Miriam N. Soffo, Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari, Dr. Edwin R. Parra, Dra. Walcy Rosolia Teodoro**

CAPPesq, 21 de Maio de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aaronson L.D., Schiff B.L., Baler G.R. Lichen Sclerosus Et Atrophicus Occurring in Childhood. *Archives of dermatology*. 1962;85(6):746-&.
2. Abrahams I., Brownste.Mh, Curth H.O., Frank S.B., Minkin W., Auerbach R. Lichen Sclerosus and Atrophicus. *Archives of dermatology*. 1973;108(3):433-
3. Adachi E., Hopkinson I., Hayashi T. Basement-membrane stromal relationships: interactions between collagen fibrils and the lamina densa. *International review of cytology*. 1997;173:73-156.
4. August P.J., Milward T.M. Cryosurgery in the treatment of lichen sclerosus et atrophicus of the vulva. *Brit J Dermatol*. 1980;103(6):667-70.
5. Ayad S., Boot-Handford R., Humphries M.J., Kadler K.E., Shuttleworth A. 2 - Extracellular matrices. *The Extracellular Matrix FactsBook (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 1998. p. 11-20.
6. Ayhan A., Guven S., Guvendag Guven E.S., Sakinci M., Gultekin M., Kucukali T. Topical testosterone versus clobetasol for vulvar lichen sclerosus. *Int J Gynaecol Obstet*. 2007;96(2):117-21.
7. Azevedo L.M.S., Santos M.L., Pereira Júnior A.C. Líquen escleroso e atrófico. *An Bras Dermatol*. 1989;64(3):179-82.
8. Bächinger H.P., Mizuno K., Vranka J.A., Boudko S.P. *Collagen Formation and Structure*. Portland - USA: Elsevier; 2010.
9. Barker L.P., Gross P. Lichen Sclerosus Et Atrophicus of Female Genitalia. *Archives of dermatology*. 1962;85(3):362-&.
10. Beattie P.E., Dawe R.S., Ferguson J., Ibbotson S.H. UVA1 phototherapy for genital lichen sclerosus. *Clin Exp Dermatol*. 2006;31(3):343-7.

11. Becker J.C., Houben R., Vetter C.S., Brocker E.B. The carcinogenic potential of tacrolimus ointment beyond immune suppression: a hypothesis creating case report. *BMC Cancer*. 2006;6:7.
12. Berkeley C., Bonney V. Leucoplakic vulvitis and its relation to kraurosis vulvae and carcinoma vulvae. *Brit Med J*. 1909;1909:1739-44.
13. Bezerra M.C., Teodoro W.R., De Oliveira C.C., Velosa A.P., Ogido L.T., Gauditano G., et al. Scleroderma-like remodeling induced by type V collagen. *Archives for dermatological research Archiv fur dermatologische Forschung*. 2006;298(2):51-7.
14. Bibby A.V. Carcinoma of the vulva; a review of 71 cases. *The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Empire*. 1957;64(2):263-6.
15. Birenbaum D.L., Young R.C. High prevalence of thyroid disease in patients with lichen sclerosus. *J Reprod Med*. 2007;52(1):28-30.
16. Birk D.E. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron*. 2001;32(3):223-37.
17. Birk D.E., Fitch J.M., Babiarz J.P., Doane K.J., Linsenmayer T.F. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci*. 1990;95 (Pt 4):649-57.
18. Boms S., Gambichler T., Freitag M., Altmeyer P., Kreuter A. Pimecrolimus 1% cream for anogenital lichen sclerosus in childhood. *BMC Dermatol*. 2004;4(1):14.
19. Bornstein J., Heifetz S., Kellner Y., Stolar Z., Abramovici H. Clobetasol dipropionate 0.05% versus testosterone propionate 2% topical application for severe vulvar lichen sclerosus. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178(1 Pt 1):80-4.

20. Bornstein J., Sideri M., Tatti S., Walker P., Prendiville W., Haefner H.K., et al. 2011 Terminology of the Vulva of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2012;16(3):290-5 10.1097/LGT.0b013e31825934c7.
21. Bovo A.C., Da Silva I.D.C.G., Takita L.C., Fochi J., Stavale J.N., Marks G., et al. A comparative study of MMP-2 in vulvar neoplasms. *Gynecol Oncol*. 2004;93(2):454-7.
22. Brain R.T. Lichen Sclerosus et Atrophicus. *Brit J Dermatol*. 1950;62(11):449-51.
23. Breisky A. Uber Kraurosis vulvae. *Z Heilkkr*. 1885;6.
24. Bruce A., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing; 1994.
25. Bulbul Baskan E., Turan H., Tunali S., Toker S.C., Saricaoglu H. Open-label trial of cyclosporine for vulvar lichen sclerosis. *J Am Acad Dermatol*. 2007;57(2):276-8.
26. Burgeson R.E., El Adli F.A., Kaitila, li, Hollister D.W. Fetal membrane collagens: identification of two new collagen alpha chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976;73(8):2579-83.
27. Cairns J.S., Curtsinger J.M., Dahl C.A., Freeman S., Alter B.J., Bach F.H. Sequence polymorphism of HLA DR beta 1 alleles relating to T-cell-recognized determinants. *Nature*. 1985;317(6033):166-8.
28. Carli P., Cattaneo A., Taddei G., Giannotti B. Topical cyclosporine in the treatment of vulvar lichen sclerosis: clinical, histologic, and immunohistochemical findings. *Archives of dermatology*. 1992;128(9):1279-80.

29. Carli P., Moretti S., Spallanzani A., Berti E., Cattaneo A. Fibrogenic cytokines in vulvar lichen sclerosus. An immunohistochemical study. *J Reprod Med.* 1997;42(3):161-5.
30. Cattaneo A., Carli P., De Marco A., Sonni L., Bracco G., De Magnis A., et al. Testosterone maintenance therapy. Effects on vulvar lichen sclerosus treated with clobetasol propionate. *J Reprod Med.* 1996;41(2):99-102.
31. Chalmers R.J., Burton P.A., Bennett R.F., Goring C.C., Smith P.J. Lichen sclerosus et atrophicus. A common and distinctive cause of phimosis in boys. *Archives of dermatology.* 1984;120(8):1025-7.
32. Chan I. The role of extracellular matrix protein 1 in human skin. *Clin Exp Dermatol.* 2004;29(1):52-6.
33. Chan I., El-Zurghany A., Zendah B., Benghazil M., Oyama N., Hamada T., et al. Molecular basis of lipoid proteinosis in a Libyan family. *Clinical and Experimental Dermatology.* 2003;28(5):545-8.
34. Chan I., Liu L., Hamada T., Sethuraman G., Mcgrath J.A. The molecular basis of lipoid proteinosis: mutations in extracellular matrix protein 1. *Exp Dermatol.* 2007;16(11):881-90.
35. Chan I., Oyama N., Neill S.M., Wojnarowska F., Black M.M., Mcgrath J.A. Characterization of IgG autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosus. *Clin Exp Dermatol.* 2004;29(5):499-504.
36. Chanut-Delalande H., Bonod-Bidaud C., Cogne S., Malbouyres M., Ramirez F., Fichard A., et al. Development of a functional skin matrix requires deposition of collagen V heterotrimers. *Mol Cell Biol.* 2004;24(13):6049-57.
37. Chiesa-Vottero A., Dvoretzky P.M., Hart W.R. Histopathologic study of thin vulvar squamous cell carcinomas and associated cutaneous lesions: a

correlative study of 48 tumors in 44 patients with analysis of adjacent vulvar intraepithelial neoplasia types and lichen sclerosis. *The American journal of surgical pathology*. 2006;30(3):310-8.

38. Chung E., Rhodes K., Miller E.J. Isolation of three collagenous components of probable basement membrane origin from several tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976;71(4):1167-74.

39. Clark J.A., Muller S.A. Lichen Sclerosis Et Atrophicus in Children - a Report of 24 Cases. *Archives of dermatology*. 1967;95(5):476-&.

40. Clifton M.M., Garner I.B., Kohler S., Smoller B.R. Immunohistochemical evaluation of androgen receptors in genital and extragenital lichen sclerosis: evidence for loss of androgen receptors in lesional epidermis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1999;41(1):43-6.

41. Cooper S.M., Ali I., Baldo M., Wojnarowska F. The association of lichen sclerosis and erosive lichen planus of the vulva with autoimmune disease: a case-control study. *Archives of dermatology*. 2008;144(11):1432-5.

42. Cooper S.M., Gao X.H., Powell J.J., Wojnarowska F. Does treatment of vulvar lichen sclerosis influence its prognosis? *Archives of dermatology*. 2004;140(6):702-6.

43. Correa A.C. Líquen escleroso vulvar: estudo da matriz extracelular, especial enfoque na trama colágena. Rio de Janeiro: Universidade Federal do; 2000.

44. Correa A.C., Azevedo L., Almeida G., Do Val I., Cuzzi T., Takiya C.M. Decorin and chondroitin sulfate distribution in vulvar lichen sclerosis - Correlation with distinct histopathologic stages. *J Reprod Med*. 2007;52(1):38-42.

45. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
46. Creely J.J., Dimari S.J., Howe A.M., Haralson M.A. Effects of transforming growth factor-beta on collagen synthesis by normal rat kidney epithelial cells. *The American journal of pathology*. 1992;140(1):45-55.
47. Crissey J.T., Osborne E.D., Jordon J.W. Lichen sclerosus et atrophicans and kraurosis vulvae. *New York state journal of medicine*. 1955;55(20):2912-5.
48. Csillag J. Dermatitis lichenoides chronica atrophicans. *Ikonographia Dermatol*. 1909;4.
49. Dalziel K.L., Millard P.R., Wojnarowska F. The treatment of vulval lichen sclerosus with a very potent topical steroid (clobetasol propionate 0.05%) cream. *The British journal of dermatology*. 1991;124(5):461-4.
50. Darier J. Leçons cliniques sur les maladies cutanées et syphilitiques [Comment]. *Union Med Can*. 1887;43.
51. Darier J. Lichen plan scléreux. *Ann Derm Syph* (2nd series). 1892;23.
52. Daroczy J., Torok E. Electronmicroscopy of lichen sclerosis et atrophicus. *Transactions of the St John's Hospital Dermatological Society*. 1974;60(2):183-7.
53. Datta C., Dutta S.K., Chaudhuri A. Histopathological and immunological studies in a cohort of balanitis xerotica obliterans. *Journal of the Indian Medical Association*. 1993;91(6):146-8.
54. De Vito J.R., Merogi A.J., Vo T., Boh E.E., Fung H.K., Freeman S.M., et al. Role of *Borrelia burgdorferi* in the pathogenesis of morphea/scleroderma and lichen sclerosus et atrophicus: a PCR study of thirty-five cases. *J Cutan Pathol*. 1996;23(4):350-8.

55. Deckers M.M., Smits P., Karperien M., Ni J., Tylzanowski P., Feng P., et al. Recombinant human extracellular matrix protein 1 inhibits alkaline phosphatase activity and mineralization of mouse embryonic metatarsals in vitro. *Bone*. 2001;28(1):14-20.
56. Di Paola G.R., Rueda-Leverone N.G., Belardi M.G. Lichen sclerosis of the vulva recurrent after myocutaneous graft. A case report. *J Reprod Med*. 1982;27(10):666-8.
57. Diakomanolis E.S., Haidopoulos D., Syndos M., Rodolakis A., Stefanidis K., Chatzipapas J., et al. Vulvar lichen sclerosis in postmenopausal women: a comparative study for treating advanced disease with clobetasol propionate 0.05%. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2002;23(6):519-22.
58. Dogliotti M., Bentley-Phillips C.B., Schmaman A. Lichen sclerosis et atrophicus in the Bantu. *Brit J Dermatol*. 1974;91(1):81-5.
59. Douglas C.P., Barnes C.F.J. Proteolytic enzyme activity measured on extracellular matrix in vulval dystrophies. *Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1986;6(3):193-5.
60. Dunlevy J.R., Hassell J.R. Heparan sulphate proteoglycans in basement membranes: Perlecan, agrin and collagen XVIII. In: Iozzo RV, editor. *Structure, Biology and Molecular Interactions*. New York Marcel Dekker Inc; 2000. p. 275–336.
61. Eickelberg O., Kohler E., Reichenberger F., Bertschin S., Woodtli T., Erne P., et al. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3. *The American journal of physiology*. 1999;276(5 Pt 1):L814-24.

62. Eisendle K., Grabner T., Kutzner H., Zelger B. Possible role of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in lichen sclerosus. *Archives of dermatology*. 2008;144(5):591-8.
63. Fabry J. Concerning a case of kraurosis penis with white spots on the scrotum. *Dermatologische Wochenschrift*. 1928;86(1/26):7-9.
64. Farrell A.M., Dean D., Charnock M., Wojnarowska F. Distribution of transforming growth factor-beta isoforms TGF-beta 1, TGF-beta 2 and TGF-beta 3 and vascular endothelial growth factor in vulvar lichen sclerosus. *J Reprod Med*. 2001;46(2):117-24.
65. Farrell A.M., Dean D., Millard P.R., Charnock F.M., Wojnarowska F. Alterations in fibrillin as well as collagens I and III and elastin occur in vulval lichen sclerosus. *J Eur Acad Dermatol*. 2001;15(3):212-7.
66. Farrell A.M., Dean D., Millard P.R., Charnock F.M., Wojnarowska F. Cytokine alterations in lichen sclerosus: an immunohistochemical study. *The British journal of dermatology*. 2006;155(5):931-40.
67. Fischer G., Rogers M. Vulvar disease in children: A clinical audit of 130 cases. *Pediatr Dermatol*. 2000;17(1):1-6.
68. Fleischmajer R., Gay S., Perlish J.S., Cesarini J.P. Immunoelectron microscopy of type III collagen in normal and scleroderma skin. *J Invest Dermatol*. 1980;75(2):189-91.
69. Forssmann W.G., Holzmann H., Cabre J. [Electronmicroscopic Studies of the Skin in Lichen Sclerosus and Atrophicans]. *Arch Klin Exp Dermatol*. 1964;220:584-99.
70. Foulds I.S. Lichen Sclerosus Et Atrophicus of the Scalp. *Brit J Dermatol*. 1980;103(2):197-200.

71. Frances C., Wechsler J., Meimon G., Labat-Robert J., Grimaud J.A., Hewitt J. Investigation of intercellular matrix macromolecules involved in lichen sclerosis. *Acta Derm Venereol.* 1983;63(6):483-90.
72. Franco M., Montenegro M.R., Brito T., Bachi C.E., Almeida P. *Patologia dos Processos Gerais.* 5a ed. São Paulo 2010.
73. Friedman R.J., Kopf A.W., Jones W.B. Malignant melanoma in association with lichen sclerosis on the vulva of a 14-year-old. *The American Journal of dermatopathology.* 1984;6 Suppl:253-6.
74. Friedrich E.G., Jr. Vulvar dystrophy. *Clinical obstetrics and gynecology.* 1985;28(1):178-87.
75. Friedrich E.G., Jr., Kalra P.S. Serum levels of sex hormones in vulvar lichen sclerosis, and the effect of topical testosterone. *The New England journal of medicine.* 1984;310(8):488-91.
76. Fujimoto N., Terlizzi J., Aho S., Brittingham R., Fertala A., Oyama N., et al. Extracellular matrix protein 1 inhibits the activity of matrix metalloproteinase 9 through high-affinity protein/protein interactions. *Exp Dermatol.* 2006;15(4):300-7.
77. Fujiwara H., Fujiwara K., Hashimoto K., Mehregan A.H., Schaumburg-Lever G., Lange R., et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA (*B. garinii* or *B. afzelii*) in morphea and lichen sclerosis et atrophicus tissues of German and Japanese but not of US patients. *Archives of dermatology.* 1997;133(1):41-4.
78. Garcia-Bravo B., Sanchez-Pedreno P., Rodriguez-Pichardo A., Camacho F. Lichen Sclerosis et Atrophicus - A study of 76 cases and their relation to diabetes. *J Am Acad Dermatol.* 1988;19(3):482-5.

79. Gay S., Rhodes R.K., Gay R.E., Miller E.J. Collagen molecules comprised of alpha 1(V)-chains (B-chains): an apparent localization in the exocytoskeleton. *Coll Relat Res.* 1981;1(1):53-8.
80. Gelse K., Pöschl E., Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2003;55(12):1531-46.
81. Godeau G., Frances C., Hornebeck W., Brechemier D., Robert L. Isolation and partial characterization of an elastase-type protease in human vulva fibroblasts: its possible involvement in vulvar elastic tissue destruction of patients with lichen sclerosus et atrophicus. *J Invest Dermatol.* 1982;78(4):270-5.
82. Goolamali S.K., Barnes E.W., Irvine W.J., Shuster S. Organ-specific antibodies in patients with lichen sclerosus. *Br Med J.* 1974;4(5936):78-9.
83. Gorczyca W., Bigman K., Mittelman A., Ahmed T., Gong J.P., Melamed M.R., et al. Induction of DNA Strand Breaks Associated with Apoptosis during Treatment of Leukemias. *Leukemia.* 1993;7(5):659-70.
84. Graves W.P., Smith G.V.S. Kraurosis vulvae. *JAMA.* 1929;92:1244-52.
85. Griffiths M.R., Priestley G.C. A comparison of morphoea and lichen sclerosus et atrophicus in vitro: the effects of para-aminobenzoate on skin fibroblasts. *Acta Derm Venereol.* 1992;72(1):15-8.
86. Gross J., Lapiere C.M. Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues - a Tissue Culture Assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1962;48(6):1014-&.
87. Gunthert A.R., Faber M., Knappe G., Hellriegel S., Emons G. Early onset vulvar Lichen sclerosus in premenopausal women and oral contraceptives.

European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology. 2008;137(1):56-60.

88. Haefner H.K., Tate J.E., Mclachlin C.M., Crum C.P. Vulvar intraepithelial neoplasia: age, morphological phenotype, papillomavirus DNA, and coexisting invasive carcinoma. Hum Pathol. 1995;26(2):147-54.

89. Hallopeau H. Du lichen plan et particulièrement de sa forme atrophique. L' Union Medicale (Paris). 1887;42.

90. Hamada T. Lipoid proteinosis. Clinical and Experimental Dermatology. 2002;27(8):624-9.

91. Hamada T., Mclean W.H., Ramsay M., Ashton G.H., Nanda A., Jenkins T., et al. Lipoid proteinosis maps to 1q21 and is caused by mutations in the extracellular matrix protein 1 gene (ECM1). Human molecular genetics. 2002;11(7):833-40.

92. Hamada T., Wessagowit V., South A.P., Ashton G.H., Chan I., Oyama N., et al. Extracellular matrix protein 1 gene (ECM1) mutations in lipoid proteinosis and genotype-phenotype correlation. J Invest Dermatol. 2003;120(3):345-50.

93. Han Z., Ni J., Smits P., Underhill C.B., Xie B., Chen Y., et al. Extracellular matrix protein 1 (ECM1) has angiogenic properties and is expressed by breast tumor cells. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2001;15(6):988-94.

94. Haque M.A., Mizobuchi T., Yasufuku K., Fujisawa T., Brutkiewicz R.R., Zheng Y., et al. Evidence for immune responses to a self-antigen in lung transplantation: Role of type V collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection. J Immunol. 2002;169(3):1542-9.

95. Harper J.I., Duance V.C., Sims T.J., Light N.D. Lipoid proteinosis: an inherited disorder of collagen metabolism? *The British journal of dermatology*. 1985;113(2):145-51.
96. Harrington C.I., Dunsmore I.R. An investigation into the incidence of auto-immune disorders in patients with lichen sclerosus and atrophicus. *Brit J Dermatol*. 1981;104(5):563-6.
97. Hart W.R., Norris H.J., Helwig E.B. Relation of lichen sclerosus et atrophicus of the vulva to development of carcinoma. *Obstet Gynecol*. 1975;45(4):369-77.
98. Hay E.D. *Cell biology of extracellular matrix*. New York: Plenum; 1991.
99. Hazen H.H. An Anomalous Case of White-Spot Disease. *JAMA*. 1913;61:393-6.
100. Helm K.F., Gibson L.E., Muller S.A. Lichen-Sclerosus-Et-Atrophicus in Children and Young-Adults. *Pediatr Dermatol*. 1991;8(2):97-101.
101. Hengge U.R., Krause W., Hofmann H., Stadler R., Gross G., Meurer M., et al. Multicentre, phase II trial on the safety and efficacy of topical tacrolimus ointment for the treatment of lichen sclerosus. *The British journal of dermatology*. 2006;155(5):1021-8.
102. Hewitt J. Histologic criteria for lichen sclerosus of the vulva. *J Reprod Med*. 1986;31(9):781-7.
103. Heymann W.R. Lichen sclerosus. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2007;56(4):683-4.
104. Hillemanns P., Untch M., Prove F., Baumgartner R., Hillemanns M., Korell M. Photodynamic therapy of vulvar lichen sclerosus with 5-aminolevulinic acid. *Obstet Gynecol*. 1999;93(1):71-4.

105. Hussain S.P., Hofseth L.J., Harris C.C. Radical causes of cancer. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(4):276-85.
106. Irgang S. Lichen sclerosus et atrophicus - Report of its occurrence in a Negro. *Arch Dermatol Syph*. 1944;50(2):120-2.
107. Jacyk W.K., Isaac F. Lichen sclerosus et atrophicus in Nigerians. *Journal of the National Medical Association*. 1979;71(4):387-8.
108. Janovski N.A., Ames S. Lichen Sclerosus Et Atrophicus of Vulva - a Poorly Understood Disease Entity. *Obstet Gynecol*. 1963;22(6):697-&.
109. Jeffcoat T.N.A. Chronic Vulval Dystrophies. *Am J Obstet Gynecol*. 1966;95(1):61.
110. Johnson M.R., Wilkin D.J., Vos H.L., Ortiz De Luna R.I., Dehejia A.M., Polymeropoulos M.H., et al. Characterization of the human extracellular matrix protein 1 gene on chromosome 1q21. *Matrix Biol*. 1997;16(5):289-92.
111. Johnston J.C., Sherwell S. White-Spot Disease. *J Cutan Dis*. 1903;21:302-7.
112. Jones R.W., Sadler L., Grant S., Whineray J., Exeter M., Rowan D. Clinically identifying women with vulvar lichen sclerosus at increased risk of squamous cell carcinoma: a case-control study. *J Reprod Med*. 2004;49(10):808-11.
113. Jones R.W., Scurry J., Neill S., Maclean A.B. Guidelines for the follow-up of women with vulvar lichen sclerosus in specialist clinics. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198(5):496 e1-3.
114. Karram M., Tabor B., Smotkin D., Wettstein F., Bhatia N., Micha J. Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid from vulvar

dystrophies and vulvar intraepithelial neoplastic lesions. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159(1):22-3.

115. Kartamaa M., Reitamo S. Treatment of lichen sclerosus with carbon dioxide laser vaporization. *The British journal of dermatology.* 1997;136(3):356-9.

116. Kaufman R.H., Dipaola G.R., Friedrich E.G., Hewitt J., Woodruff J.D. New Nomenclature for Vulvar Disease. *J Cutan Pathol.* 1976;3(3):159-61.

117. Kelly S.C., Helm K.F., Zaenglein A.L. Lichen sclerosus of the lip. *Pediatr Dermatol.* 2006;23(5):500-2.

118. Klenk-Pfeifer E. Lichen sclerosus et atrophicus faciei bei 12 jährigem Mädchen. *Z Hautkr.* 1974;49:841.

119. Kogoj F. Lichen sclerosus (atrophicus) primitivus. *Arch Dermatol Syph-G.* 1934;169(4):465-9.

120. Kogoj F. About the position of Lichen sclerosus in the system. *Arch Dermatol Syph-G.* 1936;173(6):615-23.

121. Kohlberger P.D., Joura E.A., Banicher D., Gitsch G., Breiteneker G., Kieback D.G. Evidence of androgen receptor expression in lichen sclerosus: an immunohistochemical study. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation.* 1998;5(6):331-3.

122. Kreuter A., Tigges C., Gaifullina R., Kirschke J., Altmeyer P., Gambichler T. Pulsed high-dose corticosteroids combined with low-dose methotrexate treatment in patients with refractory generalized extragenital lichen sclerosus. *Archives of dermatology.* 2009;145(11):1303-8.

123. Kumar R., Abbas A., Delancey A., Malone R. Robbins and Cotran pathologic basis of disease: Elsevier; 2010.

124. Kupai K., Szucs G., Cseh S., Hajdu I., Csonka C., Csont T., et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J Pharmacol Toxicol.* 2010;61(2):205-9.
125. Kuroda K., Shinkai H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Archives for dermatological research Archiv fur dermatologische Forschung.* 1997;289(10):567-72.
126. Lagos B.R., Maibach H.I. Frequency of application of topical corticosteroids: an overview. *The British journal of dermatology.* 1998;139(5):763-6.
127. Larre Borges A., Todorovic-Zivkovic D., Lallas A., Moscarella E., Gurgitano S., Capurro M., et al. Clinical, dermoscopic and histopathologic features of genital and extragenital lichen sclerosus. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV.* 2012.
128. Leibowitch M., Neill S., Pelisse M., Moyalbaracco M. The epihelial changes associated with squamous-cell carcinoma of the vulva - A review of the clinical, histological and viral findings in 78 women. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 1990;97(12):1135-9.
129. Leof E.B., Proper J.A., Goustin A.S., Shipley G.D., Dicorleto P.E., Moses H.L. Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor beta: a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1986;83(8):2453-7.

130. Lever W.F. LEVER,WF - HISTOPATHOLOGY OF SKIN. Archives of Pathology. 1967;84(6):665-&.
131. Linsenmayer T.F., Gibney E., Igoe F., Gordon M.K., Fitch J.M., Fessler L.I., et al. Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. J Cell Biol. 1993;121(5):1181-9.
132. Loening-Baucke V. Lichen sclerosus et atrophicus in children. Am J Dis Child. 1991;145(9):1058-61.
133. Lorenz B., Kaufman R.H., Kutzner S.K. Lichen sclerosus. Therapy with clobetasol propionate. J Reprod Med. 1998;43(9):790-4.
134. Lynch P.J., Micheletti L., Bogliatto F. Vulvar lichen sclerosus: Clinical aspects and guidelines to management. CME Journal of Gynecologic Oncology. 2005;10(3):179-87.
135. Madri J.A., Dreyer B., Pitlick F.A., Furthmayr H. The Collagenous Components of the Subendothelium - Correlation of Structure and Function. Lab Invest. 1980;43(4):303-15.
136. Mann P.R., Cowan M.A. Ultrastructural changes in four cases of lichen sclerosus et atrophicus. Brit J Dermatol. 1973;89(3):223-31.
137. Mares D.C., Heidler K.M., Smith G.N., Cummings O.W., Harris E.R., Foresman B., et al. Type V collagen modulates alloantigen-induced pathology and immunology in the lung. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2000;23(1):62-70.
138. Marnett L.J. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis. 2000;21(3):361-70.

139. Maronn M.L., Esterly N.B. Constipation as a feature of anogenital lichen sclerosus in children. *Pediatrics*. 2005;115(2):E230-E2.
140. Marren P., Jell J., Charnock F.M., Bunce M., Welsh K., Wojnarowska F. The association between lichen sclerosus and antigens of the HLA system. *Brit J Dermatol*. 1995;132(2):197-203.
141. Marren P., Millard P.R., Wojnarowska F. Vulval lichen sclerosus: lack of correlation between duration of clinical symptoms and histological appearances. *J Eur Acad Dermatol*. 1997;8(3):212-6.
142. Martin P., Teodoro W.R., Velosa A.P., De Moraes J., Carrasco S., Christmann R.B., et al. Abnormal collagen V deposition in dermis correlates with skin thickening and disease activity in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2012;11(11):827-35.
143. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:753-91.
144. Mathieu E., Meheus L., Raymackers J., Merregaert J. Characterization of the osteogenic stromal cell line MN7: identification of secreted MN7 proteins using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, western blotting, and microsequencing. *J Bone Miner Res*. 1994;9(6):903-13.
145. Mayne R., Burgeson R. *Biology of Extracellular Matrix*. 20 ed. Ulecham R, editor. London: Academic Press; 1993.
146. Mc Adams A.J., Kistner R.W. The relationship of chronic vulvar disease, leukoplakia, and carcinoma in situ to carcinoma of the vulva. *Cancer*. 1958;11(4):740-57.
147. Mecham R.P. *The Extracellular Matrix: an Overview* New York: Springer; 2011.

148. Meffert J.J., Davis B.M., Grimwood R.E. Lichen sclerosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1995;32(3):393-416; quiz 7-8.
149. Meigel W.N., Gay S., Weber L. Dermal architecture and collagen type distribution. *Archives for dermatological research Archiv fur dermatologische Forschung*. 1977;259(1):1-10.
150. Meyrick T.R.H., Ridley C.M., McGibbon D.H., Black M.M. Lichen sclerosis et atrophicus and autoimmunity—a study of 350 women. *Brit J Dermatol*. 1988;118(1):41-6.
151. Mihara Y., Mihara M., Hagari Y., Shimao S. Lichen sclerosis et atrophicus. A histological, immunohistochemical and electron microscopic study. *Archives of Dermatological Research*. 1994;286(8):434-42.
152. Miller E.J., Rhodes R.K. Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods Enzymol*. 1982;82 Pt A:33-64.
153. Milligan A., Graham-Brown R.A., Burns D.A. Lichen sclerosis et atrophicus following sunburn. *Clin Exp Dermatol*. 1988;13(1):36-7.
154. Min B.S., Kim N.K., Jeong H.C., Chung H.C. High levels of serum VEGF and TIMP-1 are correlated with colon cancer liver metastasis and intrahepatic recurrence after liver resection. *Oncology letters*. 2012;4(1):123-30.
155. Modesti A., Kalebic T., Scarpa S., Togo S., Grotendorst G., Liotta L.A., et al. Type V collagen in human amnion is a 12 nm fibrillar component of the pericellular interstitium. *Eur J Cell Biol*. 1984;35(2):246-55.
156. Mongiat M., Fu J., Oldershaw R., Greenhalgh R., Gown A.M., Iozzo R.V. Perlecan protein core interacts with extracellular matrix protein 1 (ECM1), a glycoprotein involved in bone formation and angiogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(19):17491-9.

157. Montgomery F.H., Ormsby O.S. "White spot disease" (morphoea guttata) and lichen planus sclerosus et atrophicus. J Cutan Dis. 1907;25.
158. Montgomery H., Hill W.R. Lichen sclerosus et atrophicus. Arch Dermatol Syph. 1940;42(5):755-79.
159. Murphy R. Lichen sclerosus. Dermatologic clinics. 2010;28(4):707-15.
160. Navarro V.P., Nelson Filho P., Silva L.a.B., Freitas A.C. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. Rev Odontol UNESP. 2006;35(4):233-8.
161. Neill S.M., Lewis F.M., Tatnall F.M., Cox N.H. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of lichen sclerosus 2010. Brit J Dermatol. 2010;163(4):672-82.
162. Nikkola J., Vihinen P., Vuoristo M.S., Kellokumpu-Lehtinen P., Kahari V.M., Pyrhonen S. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2005;11(14):5158-66.
163. Niyibizi C., Chan R., Wu J.J., Eyre D. A 92 Kda Gelatinase (Mmp-9) Cleavage Site in Native Type-V Collagen. Biochem Bioph Res Co. 1994;202(1):328-33.
164. Niyibizi C., Fietzek P.P., Van Der Rest M. Human placenta type V collagens. Evidence for the existence of an alpha 1(V) alpha 2(V) alpha 3(V) collagen molecule. The Journal of biological chemistry. 1984;259(22):14170-4.
165. Oberfield R. Lichen Sclerosus Et Atrophicus and Kraurosis Vulvae - Are They Same Disease. Archives of dermatology. 1961;83(5):806-&.

166. Oikarinen A., Sandberg M., Hurskainen T., Kinnunen T., Kallioinen M. Collagen biosynthesis in lichen sclerosus et atrophicus studied by biochemical and in situ hybridization techniques. *Acta Derm Venereol Suppl* (Stockh). 1991;162:3-12.
167. Ormerod A.D. Topical tacrolimus and pimecrolimus and the risk of cancer: how much cause for concern? *The British journal of dermatology*. 2005;153(4):701-5.
168. Ormsby O.S. Lichen planus sclerosus et atrophicus (Hallopeau) A report of six cases (five new) with a review of the literature. *J Amer Med Assoc*. 1910;55:901-7.
169. Oyama N., Chan I., Neill S.M., Hamada T., South A.P., Wessagowit V., et al. Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosus. *Lancet*. 2003;362(9378):118-23.
170. Parra E.R., Aguiar A.C., Jr., Teodoro W.R., De Souza R., Yoshinari N.H., Capelozzi V.L. Collagen V and vascular injury promote lung architectural changes in systemic sclerosis. *Clin Respir J*. 2009;3(3):135-42.
171. Parra E.R., Bielecki L.C., Ribeiro J.M., Andrade Balsalobre F., Teodoro W.R., Capelozzi V.L. Association between decreases in type V collagen and apoptosis in mouse lung chemical carcinogenesis: a preliminary model to study cancer cell behavior. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(4):425-32.
172. Patterson J.A., Ackerman A.B. Lichen sclerosus et atrophicus is not related to morphea. A clinical and histologic study of 24 patients in whom both conditions were reputed to be present simultaneously. *The American Journal of dermatopathology*. 1984;6(4):323-35.

173. Petrozzi J.W., Wood M.G., Tisa V. Palmar-Plantar Lichen Sclerosus Et Atrophicus. *Archives of dermatology*. 1979;115(7):884-.
174. Pichevin R., Pettit A. Leucoplasie Vulvovaginale. *Semaine Gynéc Par*. 1897;2:257.
175. Powell J., Wojnarowska F. Childhood vulvar lichen sclerosis: An increasingly common problem. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001;44(5):803-6.
176. Powell J., Wojnarowska F. Childhood vulvar lichen sclerosis - The course after puberty. *J Reprod Med*. 2002;47(9):706-9.
177. Powell J.J., Wojnarowska F. Lichen sclerosis. *Lancet*. 1999;353(9166):1777-83.
178. Prockop D.J., Kivirikko K.I., Tuderman L., Guzman N.A. Biosynthesis of Collagen and Its Disorders. *New Engl J Med*. 1979;301(1):13-23.
179. Pugliese J.M., Morey A.F., Peterson A.C. Lichen sclerosis: review of the literature and current recommendations for management. *J Urol*. 2007;178(6):2268-76.
180. Purcell K.G., Spencer L.V., Simpson P.M., Helman S.W., Oldfather J.W., Fowler J.F., Jr. HLA antigens in lichen sclerosis et atrophicus. *Archives of dermatology*. 1990;126(8):1043-5.
181. Purres J., Krull E.A. Lichen Sclerosus Et Atrophicus Involving Palms. *Archives of dermatology*. 1971;104(1):68-&.
182. Rahbari H. Histochemical differentiation of localized morphea-scleroderma and lichen sclerosis et atrophicus. *J Cutan Pathol*. 1989;16(6):342-7.

183. Raspollini M.R., Asirelli G., Moncini D., Taddei G.L. A comparative analysis of lichen sclerosis of the vulva and lichen sclerosis that evolves to vulvar squamous cell carcinoma. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197(6):592 e1-5.
184. Rawal N., Saridogan E., Khan N., Weekes A. Leiomyosarcoma of the vulva in association with lichen sclerosis. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology.* 2005;25(1):87-8.
185. Regauer S., Liegl B., Reich O. Early vulvar lichen sclerosis: a histopathological challenge. *Histopathology.* 2005;47(4):340-7.
186. Ridley C.M. Lichen sclerosis et atrophicus. *Archives of dermatology.* 1987;123(4):457-60.
187. Roberts A.B. The ever-increasing complexity of TGF-beta signaling. *Cytokine & growth factor reviews.* 2002;13(1):3-5.
188. Rodke G., Friedrich E.G., Jr., Wilkinson E.J. Malignant potential of mixed vulvar dystrophy (lichen sclerosis associated with squamous cell hyperplasia). *J Reprod Med.* 1988;33(6):545-50.
189. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today.* 1997;18(6):263-6.
190. Romppanen U., Rantala I., Lauslahti K., Reunala T. Light- and electron-microscopic findings in lichen sclerosis of the vulva during etretinate treatment. *Dermatologica.* 1987;175(1):33-40.
191. Rosamilia L.L., Schwartz J.L., Lowe L., Gruber S.B., Quint E.H., Johnson T.M., et al. Vulvar melanoma in a 10-year-old girl in association with lichen sclerosis. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54(2 Suppl):S52-3.

192. Rosen A., Casciola-Rosen L. Clearing the way to mechanisms of autoimmunity. *Nature medicine*. 2001;7(6):664-5.
193. Sakkas L.I., Platsoucas C.D. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(6):1721-33.
194. Sander C.S., Ali I., Dean D., Thiele J.J., Wojnarowska F. Oxidative stress is implicated in the pathogenesis of lichen sclerosus. *Brit J Dermatol*. 2004;151(3):627-35.
195. Savill A. Pruritus Vulvae : Leukoplakia and Kraurosis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1942;49(3):310-40.
196. Schulz R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2007;47:211-42.
197. Scott J.E., Haigh M. Identification of Specific Binding-Sites for Keratan Sulfate Proteoglycans and Chondroitin Dermatan Sulfate Proteoglycans on Collagen Fibrils in Cornea by the Use of Cupromeronic Blue in Critical-Electrolyte-Concentration Techniques. *Biochem J*. 1988;253(2):607-10.
198. Sercu S., Oyama N., Merregaert J. Importance of extracellular matrix protein 1 (ECM1) in maintaining the functional integrity of the human skin. 2009.
199. Serpier H., Gillery P., Salmon-Ehr V., Garnotel R., Georges N., Kalis B., et al. Antagonistic effects of interferon-gamma and interleukin-4 on fibroblast cultures. *J Invest Dermatol*. 1997;109(2):158-62.
200. Sideri M., Origoni M., Spinaci L., Ferrari A. Topical testosterone in the treatment of vulvar lichen sclerosus. *Int J Gynecol Obstet*. 1994;46(1):53-6.

201. Sideri M., Parazzini F., Rognoni M.T., Lavecchia C., Negri E., Garsia S., et al. Risk-Factors for Vulvar Lichen Sclerosus. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;161(1):38-42.
202. Sideri M., Rognoni M., Rizzolo L., Micheletti L., Barbero M., Origoni M., et al. Antigens of the HLA system in women with vulvar lichen sclerosis. Association with HLA-B21. *J Reprod Med.* 1988;33(6):551-4.
203. Simpkin S., Oakley A. Clinical review of 202 patients with vulval lichen sclerosis: A possible association with psoriasis. *The Australasian journal of dermatology.* 2007;48(1):28-31.
204. Smith L.T., Holbrook K.A., Madri J.A. Collagen types I, III, and V in human embryonic and fetal skin. *The American journal of anatomy.* 1986;175(4):507-21.
205. Smith Y.R., Haefner H.K. Vulvar lichen sclerosis : pathophysiology and treatment. *American journal of clinical dermatology.* 2004;5(2):105-25.
206. Smits P., Ni J., Feng P., Wauters J., Vanhul W., Elboutaibi M., et al. The human extracellular matrix gene 1 (ECM1): Genomic structure, cDNA cloning, expression pattern, and chromosomal localization. *Genomics.* 1997;45(3):487-95.
207. Smits P., Poumay Y., Karperien M., Tylzanowski P., Wauters J., Huylebroeck D., et al. Differentiation-dependent alternative splicing and expression of the extracellular matrix protein 1 gene in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2000;114(4):718-24.
208. Souza R.B.C., Borges C.T.L., Capelozzi V.L., Carrasco S., Velosa A.P.P., Teodoro W.R., et al. Abnormal collagen type V deposition in lung

- fibroblast is correlated with a worse pulmonary capacity in scleroderma (SSc). Arthritis and rheumatism. 2005;52(9):S177-S.
209. Spiess K., Teodoro W.R., Zorn T.M. Distribution of collagen types I, III, and V in pregnant mouse endometrium. Connect Tissue Res. 2007;48(2):99-108.
210. Spinale F.G., Coker M.L., Bond B.R., Zellner J.L. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. Cardiovascular research. 2000;46(2):225-38.
211. Steigleder G., Raab W.P. Lichen Sclerosus Et Atrophicus. Archives of dermatology. 1961;84(2):219-&.
212. Suurmond D. Lichen Sclerosus Et Atrophicus of the Vulva. Archives of dermatology. 1964;90:143-52.
213. Tasker G.L., Wojnarowska F. Lichen sclerosus. Clin Exp Dermatol. 2003;28(2):128-33.
214. Tasman W., Jaeger E.A. Duane's Clinical Ophthalmology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2006.
215. Taussig F.J. Precancerous lesions of the skin of the vulva - Leukoplakic vulvitis, kraurosis, pruritus. Arch Dermatol Syph. 1920;1(6):621-35.
216. Taussig F.J. Leucoplakic vulvitis and cancer of the vulva (etiology, histopathology, treatment, five year results). Am J Obstet Gynecol. 1929;18:472-503.
217. Taussig F.J. Cancer of the vulva - An analysis of 155 cases. Am J Obstet Gynecol. 1940;40:764-79.
218. Taylor A.H., Guzail M., Al-Azzawi F. Differential expression of oestrogen receptor isoforms and androgen receptor in the normal vulva and vagina

compared with vulval lichen sclerosus and chronic vaginitis. *The British journal of dermatology*. 2008;158(2):319-28.

219. Teodoro W.R. Imunogenicidade ao colágeno tipo V em coelhos: um novo modelo experimental para o estudo da patogenese da vasculite de hipersensibilidade. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 2001.

220. Teodoro W.R., Velosa A.P., Witzel S.S., Garippo A.L., Farhat C., Parra E.R., et al. Architectural remodelling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathology, research and practice*. 2004;200(10):681-91.

221. Terlizzi J., Li K., Aho S., Fujimoto N., Oyama N., Hamada T., et al. Characterization of ECM-1 protein interactions by yeast two-hybrid system. *The Journal of investigative dermatology*. 2004;122(3):A38-A.

222. Thomas R.H., McGibbon D.H., Munro D.D. Basal cell carcinoma of the vulva in association with vulval lichen sclerosus et atrophicus. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 1985;78 Suppl 11:16-8.

223. Thomas R.H., Ridley C.M., McGibbon D.H., Black M.M. Anogenital lichen sclerosus in women. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 1996;89(12):694-8.

224. Thomas R.H.M., Kennedy C.T.C. The development of lichen sclerosus et atrophicus in monozygotic twin girls. *Brit J Dermatol*. 1986;114(3):377-9.

225. Thomas R.H.M., Ridley C.M., Sherwood F., Black M.M. The Lack of Association of Lichen Sclerosus Et Atrophicus with Hla-a and B Tissue Antigens. *Clin Exp Dermatol*. 1984;9(3):290-2.

226. Tremaine R., Adam J.E., Orizaga M. Morphea coexisting with lichen sclerosus et atrophicus. *International journal of dermatology*. 1990;29(7):486-9.
227. Tudino M.E., Wong A.K. Bullous Lichen Sclerosus Et Atrophicus on the Palms and Wrists. *Cutis*. 1984;33(5):475-6.
228. Uitto J., Santa Cruz D.J., Bauer E.A., Eisen A.Z. Morphea and lichen sclerosus et atrophicus. Clinical and histopathologic studies in patients with combined features. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1980;3(3):271-9.
229. Unna P.G. Kartenblattförmige Sclerodermie. *Lehrbuch der speziell path Anatomie* (8 Lief). . Berlin: A Hirschwald. 1894.
230. Urbach E., Wiethe C. Lipoidosis cutis et mucosae. *Virchows Arch A*. 1929;273(2):285-319.
231. Val I., Almeida G. An overview of lichen sclerosus. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2005;48(4):808-17.
232. Van Der Rest M., Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1991;5(13):2814-23.
233. Van Seters M., Ten Kate F.J., Van Beurden M., Verheijen R.H., Meijer C.J., Burger M.P., et al. In the absence of (early) invasive carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia associated with lichen sclerosus is mainly of undifferentiated type: new insights in histology and aetiology. *Journal of clinical pathology*. 2007;60(5):504-9.
234. Von Zumbusch L.R. Über Lichen albus eine bisher unbeschriebene Erkrankung. *Arch Dermatol Syph (Berlin)*. 1906;82.

235. Wakelin S.H., Marren P. Lichen sclerosis in women. Clin Dermatol. 1997;15(1):155-69.
236. Wallace E.G., Nomland R. Lichen Sclerosus Et Atrophicus of the Vulva. Arch Dermatol Syph. 1948;57(2):240-54.
237. Wallace H.J. Lichen sclerosis et atrophicus. Transactions of the St John's Hospital Dermatological Society. 1971;57(1):9-30.
238. Wang J.B., Yan H., Yang H.Y., Si J.Y., Jia L.P., Li K., et al. Histopathological and ultrastructural changes of Lichen sclerosis et atrophicus on the vulva. Chinese Medical Journal. 1991;104(10):868-71.
239. Weber L., Meigel W.N., Spier W. Collagen polymorphism in pathologic human scars. Archives for dermatological research Archiv fur dermatologische Forschung. 1978;261(1):63-71.
240. Weigand D.A. Microscopic features of lichen sclerosis et atrophicus in acrochordons: a clue to the cause of lichen sclerosis et atrophicus? J Am Acad Dermatol. 1993;28(5 Pt 1):751-4.
241. Westberg F. Ein Fall von mit weissen flecken Einherhe hender, bisher nicht bekannten Dermatose. Monatschr Prakt Dermatol. 1901;33.
242. Woodley D.T., Scheidt V.J., Reese M.J., Paller A.S., Manning T.O., Yoshiike T., et al. Localization of the Alpha-3 (V) Chain of Type-V Collagen in Human-Skin. The Journal of investigative dermatology. 1987;88(3):246-52.
243. Yates V.M., King C.M., Dave V.K. Lichen sclerosis et atrophicus following radiation therapy. Archives of dermatology. 1985;121(8):1044-7.
244. Zaki I., Dalziel K.L., Solomonsz F.A., Stevens A. The under-reporting of skin disease in association with squamous cell carcinoma of the vulva. Clin Exp Dermatol. 1996;21(5):334-7.

245. Zawislak A.A., Mccluggage W.G., Donnelly R.F., Maxwell P., Price J.H., Dobbs S.P., et al. Response of vulval lichen sclerosus and squamous hyperplasia to photodynamic treatment using sustained topical delivery of aminolevulinic acid from a novel bioadhesive patch system. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2009;25(2):111-3.

10 APÊNDICES