

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CAMILA MARIA BÉDER RIBEIRO

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA-HISTOLÓGICA E ESTUDO DE
POLIMORFISMOS DAS RESPOSTAS T-HELPER-1 e 2 (Th1/2) NAS
DOENÇAS IMUNOLOGICAMENTE MEDIADAS COM
MANIFESTAÇÕES BUCAIS: LÍQUEN PLANO ORAL E REAÇÃO
LIQUENÓIDE ORAL POR AMÁLGAMA DENTAL

Tese de Doutorado apresentada a
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da UNICAMP para
obtenção do título de Doutor em
Estomatopatologia, na Área de
Patologia.

Orientador: Jacks Jorge Junior

Este exemplar corresponde à
versão final da Tese
defendida pelo aluno, e orientada
pelo Prof.Dr. Jacks Jorge Junior

Assinatura do Orientador

PIRACICABA, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

R354c Ribeiro, Camila Maria Béder, 1982-
Caracterização clínica-histológica e estudo de polimorfismos das respostas T-Helper-1 e 2 (Th1/2) nas doenças imunologicamente mediadas com manifestações bucais: líquen plano oral e reação liquenóide oral por amálgama dental / Camila Maria Béder Ribeiro. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Jacks Jorge Junior.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Doenças auto-imunes. 2. Citocinas. 3. Polimorfismo de fragmento de restrição. I. Jorge Junior, Jacks, 1962- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Clinical-histological characterization and study of polymorphisms of T-Helper-1 and 2 (Th1 / 2) responses in immune-mediated diseases with oral manifestations: oral lichen planus and amalgam-associate oral lichenoid reaction

Palavras-chave em Inglês:

Autoimmune diseases

Cytokines

Polymorphism, restriction fragment length

Área de concentração: Patologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Jacks Jorge Junior [Orientador]

Adriele Ferreira Gouvêa Vasconcellos

Vanessa Rocha Lima Shcaira

Andréia Aparecida da Silva

Maria Letícia Cintra

Data da defesa: 24-02-2012

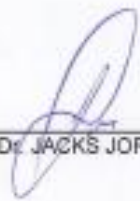
Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



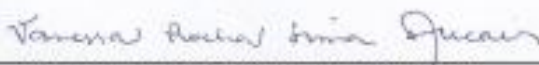
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

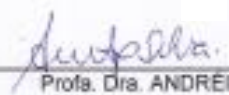


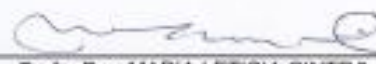
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 24 de Fevereiro de 2012, considerou a candidata CAMILA MARIA BÉDER RIBEIRO aprovada.



Prof. Dr. JACKS JORGE JUNIOR

Profa. Dra. ADRIELE FERREIRA GOUVÊA VASCONCELLOS

Profa. Dra. VANESSA ROCHA LIMA SHCAIRA

Profa. Dra. ANDRÉIA APARECIDA DA SILVA

Profa. Dra. MARIA LETÍCIA CINTRA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Nair e Voldi**, e ao meu “paidrasto” **Adelson**, aos quais devo agradecer por tudo o que sou hoje! O amor incondicional que sempre dedicaram a mim pôde fazer com que eu atingisse os meus objetivos, mesmo que para isso eles tivessem que colocar seus sonhos em segundo plano. Se hoje conquisto mais essa etapa é porque sei que vocês estão ao meu lado, lutando e torcendo por mim! Vocês são exemplos de dedicação e perseverança! Essa vitória é nossa!

Dedico também aos meus irmãos **Bruno e Víctor**, companheiros para todas as horas. Compreensivos quando fui ausente e amigos quando precisei de apoio. Hoje vocês podem ficar muito felizes por essa conquista, afinal a ajuda de vocês foi fundamental. Sem o amor e a amizade de vocês eu não conseguiria caminhar tão tranqüila por essa estrada que escolhi.

E não poderia deixar de dedicar aos meus **demais familiares** e em especial às minhas Tias **Neci e Dade**, e ao meu **Voinho José Béder**, pelo amor, carinho e pelo incentivo, tão importantes. Obrigada por entenderem e abraçarem os meus objetivos junto comigo de forma tão carinhosa e com apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço em especial ao meu orientador, **Prof. Dr. Jacks Jorge Jr.**, exemplo de profissionalismo e amor à docência e à pesquisa. O seu incentivo e a sua paciência em momentos de difíceis escolhas me ajudaram a tomar decisões corretas. Obrigada pela confiança em mim depositada. Obrigada pela sua prontidão em sempre me orientar e ajudar quando preciso.

Agradeço também em especial ao **Prof. Dr. Jair Carneiro Leão**, que me incentivou desde a minha formação acadêmica. Obrigada pelas orientações tanto teóricas quanto clínicas durante meu Mestrado, que me deram base para fazer o meu Doutorado. Obrigada igualmente pela sua prontidão em sempre me orientar e ajudar quando preciso.

Agradeço também em especial a **Profa. Dra. Maria Elvira Pizzigatti Côrrea**, que me acolheu no Hemocentro de Campinas. Obrigada pelas orientações tanto teóricas quanto clínicas durante meu estágio no Hemocentro, Hospital de Clínicas da UNICAMP e no Laboratório de Hemostasia. Agradeço pela oportunidade de ter te conhecido e de ter construído uma grande e produtiva amizade.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi construído e realizado com apoio de muitas pessoas dentre as quais gostaria de agradecer especialmente:

Inicialmente, agradeço ao **Nosso Deus** pela vida, pelas pessoas colocadas em minha vida e por todas as possibilidades de crescimento e evolução pessoal;

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na pessoa do seu Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**;

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP), na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Jacks Jorge Jr.**;

À coordenadora geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas **Profa. Dra. Renata C. Matheus R. Garcia**;

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP;

Aos **Profs. Drs. Alan Roger Santos Silva, Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Oslei Paes de Almeida, Pablo Agustin Vargas e Ricardo Della Coletta**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

Ao **Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza**, Professor do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e Coordenador do Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro) da UNICAMP, pela possibilidade do desenvolvimento deste trabalho;

À **Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi**, Professora do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP

e chefe do Laboratório de Hemostasia do Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro) da UNICAMP, pelo apoio incondicional ao desenvolvimento deste trabalho;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)** pela concessão de bolsa de estudos e financiamentos do projeto;

Às amigas de curso de doutorado **Rebeca de Souza Azevedo, Adriele Ferreira Gouvêa Vasconcellos, Ana Terezinha Marques Mesquita e Carolina Cavalcanti Bitu**, as minhas primeiras amizades conquistadas em Piracicaba. Obrigada por dividirem as alegrias, as angústias e seus momentos em família comigo;

Aos amigos do curso de Estomatopatologia **Patrícia Feio, Renato Hopp e Michele Kellermann**, principalmente pela bela amizade, pelos momentos de aprendizado e pelas risadas compartilhadas nas idas e vindas ao Hemocentro da UNICAMP;

À minha amiga de infância, irmã e comadre por afinidade, **Júlia Nogueira de Almeida**; à minha querida irmã por afinidade **Lívia Nogueira Miranda**; à minha amiga de “barriga”, **Lívia Pessoa Campello**; e à minha amiga de colegial, **Ana Karina Chagas**, verdadeiras amigas que cresceram junto comigo e ainda participam de cada passo alcançado, dando apoio incondicional, ainda que geograficamente distantes;

À minha querida “mãe” de São Paulo, **Thereza de Jesus Cavalcanti Vasques** e seu esposo **Cid Marcus Vasques**, por sempre me acolherem em seu espaço familiar e sempre me terem como uma “filha” cuidando carinhosamente de mim, na ausência de minha mãe biológica;

Aos meus amigos **Alfredo de Aquino Gaspar** e **Manuela Lopes**, pelo incentivo pessoal e amizade verdadeira durante todo o tempo de nossa convivência;

Aos meus amigos da **Dental Prev**, em especial **Profa. Carolina Guimarães**, **ACD Simone Vicente**, **ACD Fabióla Suruagy**, **Dr. André Emery**, **Profa. Águida Henriques**, **Lairce Lima**, **Michelle Cruz e família**, com quem pude compartilhar os meus primeiros passos acadêmicos durante o Mestrado e sempre estiveram ao meu lado me apoiando;

Aos meus vizinhos de Piracicaba, a **Dona Leni**, **Seu Valdir**, **Dona Ana** e **Seu Samuel** por estarem sempre disponíveis na nossa morada no Bairro do São Dimas, em Piracicaba;

Ao colega **Luiz Alcino Gueiros**, pelo crescimento profissional conjunto nos últimos quatro anos e, principalmente, pela amizade e apoio nos momentos de realização deste trabalho;

Aos colegas do **Laboratório de Hemostasia do Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro) - UNICAMP**, em especial a **Ucha**, **Deva**, **Josie** e **Cris** pela amizade, carinho e ajuda na biologia molecular deste trabalho;

Aos colegas do **Laboratório de Polimorfismos do Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro) - UNICAMP**, em especial à **Clarisa**, ao **Dr. Afonso** e à **Grazi**, pela amizade, carinho e ajuda na biologia molecular deste trabalho;

Aos colegas do **Ambulatório de Hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro) – UNICAMP**, em especial, à **Márcia**, à **Fernanda** e ao **Wilson** por todo o empenho com os pacientes transplantados;

Ao **Prof. Pedro Duarte Novaes** - Professor Associado do Departamento de Morfologia e **Eliene Ap. Orsini Narvaes** - Bióloga da Área de Microscopia

Eletrônica e Confocal - FOP/UNICAMP, pela liberação de uso do fotomicroscópio do **Laboratório de Histologia da FOP-UNICAMP**, sem a autorização de vocês não seria possível fotografar as belas imagens desta tese!

Aos amigos do curso de Estomatopatologia: **Andréia Aparecida da Silva, Andreia Bufalino, Bruno Andrade, Daniel Berreta, Katya Pulido, Jorge Esquiche León, Rose Mara Ortega, Victor Toral-Rizo**. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados e, principalmente, pelos muitos momentos descontraídos que passamos juntos. Com certeza tudo fica melhor quando se tem amigos;

Aos demais amigos do programa de pós-graduação em Estomatopatologia: **Alan Roger dos Santos Silva, Ana Carolina Prado Ribeiro, Fabiana Seguin, Fernanda Basso, Fernando Mariano, Lilia Rocha, Livia Paranaíba, Manoela Pereira, Marco Antonio Carvalho, Marco Aurélio Carvalho de Andrade, Mario José Románach Gonzalez Sobrinho, Michele Agostini, Tânia Soares, Rogério Gondak, Sibeles de Aquino, Wilfredo Alejandro Gonzalez Arriagada, Julianna Joanna de Carvalho Moraes, Tânia Cristina Benetti Soares, Ana Lucia Noronha Francisco, Bruno Augusto Benevenuto de Andrade**;

Aos estagiários do Ambulatório Odontológico e do Ambulatório do TMO do Hemocentro, UNICAMP, **Profa. Camila Boer, Prof. Cesar Noce, Profa. Dra. Flávia Riqueto Gambarelli, Manuela Pinotti, Prof. Paulo Moraes, Profa. Dra. Vanessa Shcaira** pelos momentos e conhecimentos compartilhados durante o estágio com os pacientes tão especiais;

À amiga **Andreia Bufalino**, pela amizade e por compartilhar seus conhecimentos nas técnicas de biologia molecular e outras informações fundamentais para a realização deste trabalho;

A todos os amigos do **Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Estomatologia da Universidade Federal de Pernambuco**, em especial **Talita**

França T. de Carvalho, Catarina Brasil e Rachel Alcoforado, companheiras das primeiras experiências em laboratório e auxílio durante o começo do meu doutorado;

Aos funcionários do **Laboratório de Patologia Geovânia Almeida e Fabiana Casarotti**, aos funcionários do **Orocentro Dr. Rogério de Andrade Elias, Maria Aparecida Campion, Débora e Cidinha (Maria Mardegan)**, à **Beth** e aos estagiários do Orocentro, **Valéria Totti, Ângela Pierrotti e Karen Mendes Granner**, pela colaboração e generosidade quando necessárias;

Ao meu aluno de Orientação de Iniciação Científica (PIBIC da FOP-UNICAMP), **Douglas Cardoso de Siqueira**, e às minhas alunas de orientação de Trabalho de Conclusão de Curso, **Vanessa Lisbôa e Gabriella Nobre**, pelos conhecimentos compartilhados na execução desse trabalho, essa vitória também é nossa!

Aos **pacientes do Orocentro da FOP-UNICAMP e da Clínica de Estomatologia da UFPE e pacientes do Hemocentro - UNICAMP**, por me fazerem ver que a vida é o nosso dom mais precioso;

Aos professores e pesquisadores da Universidade de Pernambuco e Universidade Federal Rural de Pernambuco, **Prof. Dr. Belmiro Cavalcanti do Egito Vasconcelos, Prof. Dr. Joaquim Celestino da Silva Neto, Prof. Dr. José Ricardo de Holanda Vasconcellos e Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior**, pelas oportunidades concedidas durante minha graduação, incentivando-me e orientando-me nos projetos de iniciação científica e trabalho de conclusão de curso. Por meio de seus exemplos de competência e profissionalismo despertaram em mim a vontade de seguir a carreira acadêmica;

A **todas as pessoas** que conviveram comigo durante a realização dessa tese, e também aquelas pessoas que estão em convívio pessoal ou profissional atualmente, por entenderem as minhas ausências até os dias atuais;

E por fim, agradeço aos meus **Colegas, Funcionários e Alunos do Centro Universitário CESMAC**, Maceió, Alagoas, em especial à amiga **Michelle Tavares**, aos professores e amigos **Fernanda Peixoto, Aurea Valéria, Sonia Ferreira, Vinicius Holanda** e **José Ricardo Mikami**, por sempre me apoiarem nos momentos de minha ausência das atividades acadêmicas em virtude do doutorado.

EPÍGRAFE

“Se você conhece o inimigo e conhece a si mesmo, não precisa temer o resultado de cem batalhas. Se você se conhece, mas não conhece o inimigo, para cada vitória ganha sofrerá também uma derrota. Se você não conhece nem o inimigo nem a si mesmo, perderá todas as batalhas.”

(Sun Tzu)

RESUMO

As lesões liquenóides orais (LLO), como líquen plano oral (LPO) e reação liquenóide oral por amálgama dental (RLO-AD), são doenças imunologicamente mediadas (DIM) com características histopatológicas semelhantes, porém com prognósticos distintos. As suas etiopatogenias têm sido relacionadas a polimorfismos gênicos e secreção citocinas de inflamatórias (CI), as quais são responsáveis pelas respostas imunológicas inadequadas, que causam danos estruturais à mucosa oral (MO) e estimulam o recrutamento de células inflamatórias. Assim, foi realizado um estudo em voluntários portadores de LLO (grupo-1, n=39), em voluntários saudáveis (grupo-2, n=39), e em cem amostras de DNA provenientes de voluntários saudáveis (grupo-3, n=100). A pesquisa teve como objetivos selecionar e diferenciar casos de LLO clássicas (LLO-c) por meio dos critérios de diagnósticos de LLO da Organização Mundial de Saúde (Cdx-LLO-OMS); determinar a hipossalivação nesses pacientes; analisar outros achados histopatológicos presentes nas LLO; quantificar linfócitos T (LT-CD3, LT-CD8), linfócitos B (LB), plasmócitos, mastócitos, imunomarcados contidos no infiltrado inflamatório subepitelial (IISE) nos casos de LLO a fim de avaliar as respostas Th1/2; e estimar a frequência dos polimorfismos dos genes Th1/2 envolvidos na síntese de CI através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP). De forma geral, pacientes do gênero feminino com idade média de 53,13 anos apresentaram maior frequência de LLO ($p=0,06$; OR:2,57). O infiltrado inflamatório perivascular profundo e a presença de folículos linfóides foram frequentes nas RLO-AD ($p<0,001$). A contagem de LB foi maior nas RLO-AD ($p<0,05$). A hipossalivação foi frequente em portadores de LLO ($p<0,001$; OR:19,72). Os alelos mutados IL4-590T, TNF- α -308A, e IL10592C foram freqüentes nos portadores de LLO ($p<0,0001$). Portadores de LPO apresentaram mais alelos mutados IL4-590T e IL10-592C ($p<0,05$). Concluiu-se, portanto que pacientes do gênero feminino com média de idade de 53 anos apresentam mais LLO. A hipossalivação foi associada à presença da lesão oral em portadores de LLO. As LLO estão associadas aos altos índices de células de reação inflamatória crônica e à expressão gênica das citocinas relacionadas às respostas Th1/2.

Palavras-chave: Doenças Auto-Imunes. Citocinas. Polimorfismo gênico. Polimorfismo de Fragmento de Restrição.

ABSTRACT

Oral lichenoid lesions (OLL), such as oral lichen planus (OLP) and amalgam-associate oral lichenoid reaction (AAOLR) are immunologically mediated diseases (IMD) with similar histopathologic features but distinct prognoses. Their etiopathogenesis have been related to gene polymorphisms and inflammatory cytokine (IC) secretion, which are responsible for the inappropriate immune responses that cause structural damage to the oral mucosa (OM) and stimulate the recruitment of inflammatory cells. Therefore, this study was conducted in a group of volunteers with OLL (group-1, n=39), another group comprised of healthy volunteers (group-2, n=39), and a third group comprised of hundred DNA samples obtained from healthy volunteers (group-3, n = 100). The research aimed to select and differentiate classic cases of OLL by means of diagnostic criteria for OLL of the World Health Organization (WHO-OLL-CDx), to determine the hyposalivation in these patients, to analyze other histological findings features present in OLL; to evaluate the Th1/2 by means of quantification of inflammatory cells, T-lymphocytes (CD3-TL, CD8-TL), B lymphocytes (BL), plasma cells and mast cells immunostained contained in the subepithelial inflammatory infiltrate (SEII) on the slides of OLL, and estimate the frequency of polymorphisms of genes Th1/2 involved in the synthesis of IC by means of polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). Overall, female patients with mean age of 53.13 years had a higher frequency of OLL ($p = 0.06$, OR: 2.57). The deep perivascular inflammatory infiltrate and lymphoid follicles were common in the AAOLR ($p < 0.001$). The LB count was higher in AAOLR ($p < 0.05$). The hyposalivation was common in patients with OLL ($p < 0.001$, OR: 19.72). Mutated alleles of IL4-590T, TNF- α -308A and IL10-592C were frequent in patients with OLL ($p < 0.0001$). Patients with OLP had more mutated alleles IL4 and IL10-590T-592C, when compared to AAOLR ($p < 0.05$). Therefore it was concluded that female patients with a mean age of 53 have more OLL. Hyposalivation was associated with the presence of oral lesions in patients with OLL. The oral lichenoid lesions are associated with high rates of chronic inflammatory cell reaction and gene expression of cytokines related to Th1/2 response.

Key Words: Autoimmune Diseases. Cytokines. Polymorphism. Genetic Polymorphism. Restriction Fragment Length.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR: Artrite Reumatóide

BS: Boca Seca

CDx-OMS-LLO: Critérios da OMS (2003) para Diagnóstico das LLO

CI: Citocinas Inflamatórias

CL: Células de Langherans

DAI: Doenças Auto-imunes

DECHc: Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro Crônica

DIM: Doenças Imunologicamente Mediadas

DNA: Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados, do inglês *Deoxynucleotide Triphosphates*

H&E: Hematoxilina e Eosina

IIBSE: Infiltrado Inflamatório em Banda Subepitelial

IFN: Intérferons

IFN- γ : Intérferon- γ

IHQ: Imuno-histoquímica

IL: Interleucinas

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL4: Interleucina 4

IL10: Interleucina 10

LED: Lúpus Eritematoso Discóide

LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico

LL: Lesões Liquenóides

LLO: Lesões Liquenóides Orais, do inglês *Oral Lichenoid Lesions (OLL)*

LP: Líquen Plano

LPC: Líquen Plano Cutâneo

LPM: Lesão Potencialmente Malignizável

LPO: Líquen Plano Oral, do inglês *Oral Lichen Planus (OLP)*

LT: Linfócitos T

neLPO: Forma não erosiva do LPO

OMS: Organização Mundial de Saúde

Overnight: Designa que o procedimento durou a noite inteira

PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato, do inglês: *phosphate-buffered saline*

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

q.s.p.: Quantidade Suficiente Para

RFLP: Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição, do inglês: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RL: Reação Liquenóide, do inglês *Lichenoid Reaction (LR)*

RLO-AD: Reações Liquenóides Orais por Amálgama Dental, do inglês *Amalgam-Associate Oral Lichenoid Reaction (AAOLR)*

RNA: Acido Ribonucléico, do inglês *Ribonucleic Acid*

RTL: Reações Teciduais Liquenóides, do inglês *Lichenoid Tissue Reaction (LTR)*

SJ: Síndrome de Sjögren

SNP: Polimorfismos de Único Nucleotídeo, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*

Th1: T-helper1

Th2: T-helper2

TNF: Fatores de Necrose Tumoraais, do inglês: *Tumor Necrosis Factor*

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α

VNTR: Número Variável de Repetições em Tandem, do inglês: *Variable Number Tandem Repeat*

ZMB: zona da membrana basal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1	DOENÇAS IMUNOLOGICAMENTE MEDIADAS	5
2.2	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO LP, LPO E RLO-AD	8
2.3	PATOGÊNESE DAS LLO: LPO e RLO-AD	17
2.4	CRITÉRIOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO LPO E RLO-AD	19
2.5	CITOCINAS INFLAMATÓRIAS, POLIMORFISMOS GÊNICOS E SUAS RELAÇÕES COM LPO E RLO-AD	27
3	PROPOSIÇÃO	37
3.1	OBJETIVOS GERAIS	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	DESENHO DO ESTUDO E DIVISÃO DOS GRUPOS	39
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS VOLUNTÁRIOS E MEIOS DE CONVOCAÇÃO DOS SUJEITOS	42
4.3	APLICAÇÃO DOS CRITÉRIOS OMS, 2003 PARA SELEÇÃO DOS CASOS DE LPO E RLO-AD	45
4.4	COLETAS DOS DADOS E DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES PROVENIENTES DOS BANCOS DE DADOS DAS UNIDADES RELACIONADAS	47
4.5	ANÁLISES DAS AMOSTRAS	49
4.6	ASPECTOS ÉTICOS	62
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	62

5	RESULTADOS	65
5.1	RESULTADOS DESCRITIVOS	65
5.2	RESULTADOS DAS ANÁLISES DOS DEMAIS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS	72
5.3	RESULTADOS DAS ANÁLISES DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO SUBEPITELIAL E DA ESPESSURA EPITELIAL	78
5.4	RESULTADOS DAS ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICAS	79
5.5	RESULTADOS DA ANÁLISE DA HIPOSSALIVAÇÃO	84
5.6	FREQÜÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DOS GENES IL1- β , IL4, TNF- α E IL10 NOS GRUPOS 1 E 3 E SUA CORRELAÇÃO COM A PRESENÇA DE LLO	86
5.7	REAVALIAÇÕES DOS CASOS DO SUBGRUPO 1.3	108
6	DISCUSSÃO	113
7	CONCLUSÕES	129
	REFERÊNCIAS	131
	APÊNDICE 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido	149
	APÊNDICE 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido	151
	APÊNDICE 3 - Questionários da pesquisa	153
	APÊNDICE 4 - Questionários da pesquisa	155
	ANEXO - Certificado de aprovação do Comitê de Ética da FOP-UNICAMP	157

1 INTRODUÇÃO

As doenças imunologicamente mediadas (DIM) compõem um grupo amplo, distinto de entidades patológicas que comumente acometem a pele e mucosas e possuem como principal fator etiológico a participação de uma resposta imunológica inadequada (Mattila *et al.*, 2007).

A presença de lesões bucais associadas a essas condições é frequente. Em muitas situações pode ser a primeira manifestação da doença, se constitui como parte importante do quadro clínico e não raro apresentam controle complexo. Dentro desse grupo encontram-se as lesões liquenóides orais (LLO), representadas pelas reações liquenóides orais por amálgama dental (RLO-AD), além de outras LLO de curso clínico mais complexo e que acometem mais órgãos e sistemas, como as diversas formas de líquen plano oral (LPO), as LLO associadas às doenças auto-imunes (DAI) e a doença do enxerto contra hospedeiro crônica (DECHc) (Bron, 1994; Gratwohl *et al.*, 1995; Al-Hashimi *et al.*, 2007).

Todas estas patologias representam entidades de particular interesse à Estomatologia/Patologia Bucal e, portanto há uma constante preocupação na busca dos perfis clínicos, histológicos, etiológicos, patogênicos (Fernandez-González *et al.*, 2011) e também dos perfis genéticos envolvidos na síntese de citocinas relacionadas às LLO (Xavier *et al.*, 2007; Fujita *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009).

Estas LLO apresentam sinais clínicos muito semelhantes, pois apresentam lesões orais clinicamente representadas por estrias brancas “liquenóides” que se estendem ao longo das mucosas orais e, portanto, podem ser agrupadas em um estudo único, entretanto há uma necessidade de compreensão mais adequada das suas etiopatogenias de modo a possibilitar um manejo clínico mais adequado (Sugerman *et al.*, 2002; DeRossi & Ciarrocca, 2005).

Apesar de possuírem mecanismos patogênicos distintos, que parecem estar relacionados à ocorrência de eventos mediados por alterações da resposta imune, a maioria das LLO são tratadas similarmente por meio de terapias imunossupressoras inespecíficas, principalmente corticosteróides utilizados de forma tópica ou sistêmica, que freqüentemente estão associadas a efeitos adversos de graus variados de intensidade e nem sempre alcançam o controle adequado das suas manifestações clínicas (Al-Hashimi *et al.*, 2007; Barret & Blanc, 2008; Arora, 2008). Deste modo, o entendimento dos mecanismos de patogênese deste grupo de doenças é fundamental para desenvolvimento de alvos terapêuticos e tratamentos alvos-específicos que visem potencializar resultados relacionados ao controle da doença e minimizar os efeitos colaterais observados na terapêutica atual (Scully *et al.*, 1998; DeRossi & Ciarrocca, 2005).

Embora a resposta imunológica pareça ser similar, muitos autores têm objetivado estabelecer a caracterização histopatológica e imuno-histoquímica do infiltrado inflamatório associada às respostas imunológicas T-helper1 (Th1) e T-helper2 (Th2) e demais eventos celulares a fim de relacioná-los com as

manifestações clínicas destas doenças (McCartan & Lamey, 1997; Mega *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2005; Bascones-Illundain *et al.*, 2006; Köse *et al.*, 2007).

Uma das manifestações clínicas destas doenças é a sintomatologia da boca seca (BS), que é mais comumente causada por alterações na função das glândulas salivares, desidratação, alterações cognitivas da região maxilofacial (Osailan *et al.*, 2011), além de diabetes, distúrbios da tireóide, doenças do tecido conjuntivo, e DECHc (Atkinson & Wu, 1994; Scully, 2003). Os sintomas de BS podem ser classificados como subjetivo (xerostomia) (Fox *et al.*, 1985), no qual o paciente relata o sintoma; e objetivo (hipossalivação) (Bergdahl & Bergdahl, 2000) que é avaliado por meios de quantificação do fluxo salivar produzido em um período de cinco minutos e mensurado em unidades de mililitros por minuto (mL/min), ou seja, pacientes que produzem um volume menor de 0,7 mL/min são considerado portador de hipossalivação (Krasse; 1986).

Outros aspectos relacionados às DAI são o controle genético da expressão gênica e do nível de produção de citocinas que podem ser modificados de acordo com mudanças no genoma em decorrência dos polimorfismos gênicos. Os polimorfismos em um único nucleotídeo (SNP) são variações na sequência de ácido desoxirribonucleico (DNA) com prevalência em 1% ou mais da população. Uma grande importância do estudo dos SNP na pesquisa biomédica é a possibilidade de comparar regiões do genoma entre gerações bem como a correspondência com coortes de pacientes com e sem uma determinada doença (Zhang *et al.*, 2008).

A caracterização da associação do polimorfismo dos genes associados à resposta inflamatória e a relação destes com a síntese de citocinas tem se mostrado importante ferramenta na descoberta da etiopatogenia das DAI. Estudos dos SNP relacionados especificamente à síntese de citocinas das respostas Th1 e Th2 têm sido realizados com o objetivo de entendimento da patogênese do LPO (Sugerman *et al.*, 2002; Pezelj-Ribaric *et al.*, 2004; Carrozzo *et al.*, 2004; Xavier *et al.*, 2007).

Portanto, esse trabalho objetivou analisar os achados clínicos e histopatológicos das LLO clássicas, estudo morfométrico para determinar a quantidade de células inflamatórias contidas no infiltrado inflamatório subepitelial (IISE) marcadas por meio da técnica imuno-histoquímica, análise de fluxo salivar em pacientes portadores de LLO, e estudo dos polimorfismos envolvidos nessas respostas Th1 e Th2, que pode auxiliar na compreensão dos mecanismos patogénéticos do LPO e da RLO-AD.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Doenças imunologicamente mediadas

As doenças imunologicamente mediadas (DIM) ou doenças auto-imunes (DAI) compõem um grupo amplo e distinto de entidades patológicas (Quadro 1). Essas possuem como principal fator etiológico a participação de uma resposta imunológica inadequada (Mattila *et al.*, 2007).

Quadro 1. Lista das doenças auto-imunes.

Miastenia gravis	Síndrome de Goodpasture
Tireóide de Hashimoto	Febre familiar do mediterrâneo
Artrite reumatóide (AR)	Doença de Graves
Síndrome de Sjögren (SJ)	Doença Celíaca
Vitiligo	Hepatite auto-imune
Psoríase	Síndrome miastênica de Lambert-Eaton
Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)	Oftalmia simpática
DAI do sistema nervoso central (DAI-SNC)	Pênfigos e Penfigóides
Diabetes Mellitus Tipo I	Púrpuras auto-imunes
Doença de Addison	Trombocitopenia idiopática
Anemia Hemolítica	Doença de Crohn
Síndrome Antifosfolípídica Auto-Imune	Síndrome Antifosfolípídica SOE
Dermatite herpetiforme	Espondilite anquilosante
Glomerulonefrite por IgA e membranosa	Retrocolite ulcerativa
Síndrome de Churg-Strauss	Síndrome de Behçet

Fonte: Adaptada de Mattila *et al.*, 2007.

As DAI que se manifestam na pele e mucosas são também conhecidas como doenças inflamatórias da pele. Tradicionalmente possuem padrões clínico-patológicos reconhecidos como lesões liquenóides (LL) ou reações teciduais liquenóides (RTL) (Pinkus, 1973; Sontheimer, 2009). Frequentemente essas doenças causam sintomas orofaciais e estomatognáticos, os quais se constituem como os sintomas característicos do envolvimento da mucosa oral (Márton, 2003).

As RTL dessas condições inflamatórias são freqüentes e em muitas situações podem ser a primeira manifestação da doença, são parte importante do quadro clínico e apresentam um manejo complexo (Sontheimer, 2009). Dentro deste grupo de afecções encontram-se, principalmente as LLO associadas ao LES, à SJ (Márton, 2003), à AR (Pawelczyk-Madalińska *et al.*, 2006), as RLO-AD (Östman *et al.*, 1996), o LPO (Al-Hashimi *et al.*, 2007) e a DECHc (Bron, 1994; DeRossi & Ciarrocca, 2005; Woo *et al.*, 2005; Elad & Levitt, 2008).

Os portadores dessas DAI podem apresentar a sintomatologia da boca seca (BS). Exemplos de condições e doenças sistêmicas nas quais a BS pode ser uma queixa relevantes incluem diabetes, distúrbios da tireóide, doenças do tecido conjuntivo (AR, LES e SJ), DECHc (Atkinson & Wu, 1994; Scully, 2003) e o LPO (Colquhoun & Ferguson, 2004). Sabe-se que esse sintoma é mais comumente causado por alterações na função das glândulas salivares, desidratação e alterações cognitivas da região maxilofacial (Osailan *et al.*, 2011). Outros fatores como ansiedade ou depressão e estresse podem ser causa, tanto subjetivas (Fox *et al.*, 1985) quanto objetivas, dos sintomas de BS (Bergdahl & Bergdahl, 2000).

A prevalência da BS na população de idosos (indivíduos com 60 anos ou mais) é de aproximadamente 20% (Ben-Aryeh *et al.*, 1985; Nederfors, 2000; Nayak *et al.*, 2004). A prevalência de xerostomia na população em geral varia entre 10% e 20% em diferentes estudos publicados (Fox *et al.*, 1985; Pujol *et al.*, 1998). Observa-se que essa prevalência é maior em mulheres e aumenta com o uso de alguns tipos específicos de medicamentos (Nederfors, 2000; Schein *et al.*, 1999).

Devido às diferenças entre dados de xerostomia e hipossalivação, Krasse (1986) apresentou critérios para caracterizar objetivamente o fenômeno de hipossalivação, os quais estabelecem que o volume de saliva entre 1,0 a 3,0 mL/min, é considerado fluxo normal; um volume de 0,7 a 1,0 mL/min, é considerado fluxo baixo; e volume menor de 0,7 mL/min, é considerado hipossalivação. Frente a esses dados divergentes também foi convencionado que a coleta de saliva total não estimulada (STNE) deve ser realizada no período padronizado até dez horas da manhã para que não haja influência do ciclo circadiano, visto que a adoção desse método não altera a constituição natural da saliva do paciente, que pode ser modificada quando estimulada ou quando coletada em horários não padronizados (Navazesh, 1993; Arvidson *et al.*, 1994).

Após a constatação dessa correlação entre as DAI e a BS, foi realizado estudo para avaliar a presença de xerostomia em pacientes portadores de LPO comparada com pacientes controles saudáveis pareados em gênero e idade. Por meio da metodologia empregada, os autores encontraram maior incidência de xerostomia em pacientes portadores de LPO quando comparada com as dos indivíduos saudáveis ($p < 0,001$). Concluiu-se que há associação entre o LPO e xerostomia em alguns indivíduos (Colquhoun & Ferguson, 2004).

Outro estudo foi conduzido por Aliko *et al.* (2010) para estimar a frequência e o caráter de lesões da mucosa bucal em pacientes com artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e esclerose sistêmica e a relação entre o acometimento da mucosa oral e hipossalivação. As lesões da mucosa oral (MO) foram observadas em 58,9% dos pacientes. Aspectos clínicos das lesões variaram e os locais mais

afetados da cavidade oral foram: palato, mucosa bucal e labial e língua. Foram constatados variados tipos de lesão na MO, não foram encontradas associações significantes entre a presença de lesões orais e hipossalivação nestes pacientes, exceto a relação entre a hipossalivação e a candidíase oral, que foi observada nos pacientes analisados. Por meio da metodologia empregada foi observado que pacientes com AR, LES e ES têm um alto índice de lesões na MO, mas a associação com a presença de hipossalivação não foi observada.

2.2 – Características gerais do LP, LPO e RLO-AD

O líquen plano (LP) é uma DAI crônica, mucocutânea que afeta a MO, pele, mucosas genitais, unhas e o couro cabeludo (Sugerman *et al.*, 2002). Esta doença foi descrita pela primeira vez em 1869 pelo médico Erasmus Wilson, que deu o nome “líquen” por achar as lesões de pele bastante semelhante ao líquen (plantas primitivas compostas por algas e fungos), e o nome “plano” do latim “*planus*”. Naquela época, os autores descreviam os “sinais distintivos de LP”: a presença de pápulas poligonais delimitadas, ovais ou redondas, com superfície lisa, brilhante, base rosada, que às vezes apresentam superfície discretamente escamosa e frequentemente apresentavam padrão umbilicado central. Durante muitos anos aquelas pápulas que se apresentavam agrupadas sob a forma de um “mosaico” foram reconhecidas como lesões de LP (Wilson, 1871).

Em 1895 o médico dermatologista francês Louis-Frédéric Wickham, em seu artigo intitulado “*Sur un signe pathognomonique du lichen plan de Wilson (lichen plan)*”, acrescentou à descrição dos relatos anteriores os sinais descritos por ele

como estriações acinzentadas ou "*stries et punctuations grisatres*" (pontos e estrias acinzentadas). Então, a partir daí, essa característica foi reconhecida como as "estrias de Wickham", que embora comum, não havia sido percebido pelos autores anteriores, foi descrito como um sinal freqüente e acrescentado às características clínicas do LP (Wickham, 1895; Steffen & Dupree, 2004).

Relatos sobre a presença e prevalência de LP com manifestações orais, reconhecidas como LPO, foram realizados no ano de 1956, quando Samman relatou a presença de lesões orais estriadas e esbranquiçadas em 77% dos 121 casos de LP analisados (Samman, 1956). Em outra série de 227 casos de LP provenientes dos Hospitais Unidos Bristol entre 1949-1956, foi observada a presença das lesões na boca em 51% destes indivíduos (Warin *et al.*, 1958).

A presença de LL restritas à cavidade oral foi relatada em 1958, quando Warin *et al.* realizaram um trabalho com a proposta de apresentar o LP como doença que poderia ser exclusiva da MO, com pouca ou nenhuma erupção cutânea. Os autores relataram a incidência de 45 casos de pacientes com lesões estriadas brancas em região de mucosa jugal bilateral, dorso de língua e gengiva inserida (Warin *et al.*, 1958).

O LPO possui incidência importante em indivíduos de meia-idade, com uma maior predileção por pacientes do gênero feminino numa proporção 2:1 (Xue *et al.*, 2005; Ingafou *et al.*, 2006). Estima-se que a prevalência do LPO apresente-se em 1,6% em indivíduos do gênero masculino e 2,2% em mulheres (Axéll & Rundquist, 1987). Outros estudos citam prevalências que variam entre 2% (Kovac-Kovacic & Skaleric, 2000; Espinoza *et al.*, 2003) e 4% (Scully *et al.*, 1998, Souza &

Rosa, 2008). No entanto, já foi descrita a prevalência de 11, 62% (Bornstein *et al.*, 2006) a depender da população estudada. Em revisão crítica sobre a real prevalência do LPO, foram selecionados 45 artigos relevantes, desses, 21 estudos de casos e 24 estudos populacionais. Após o cruzamento dos dados obtidos na literatura consultada foi constatada uma prevalência Mundial média (corrigida pela média de idade) do LPO de 1,27%, com maior incidência no gênero feminino (McCartan & Healy, 2008).

Clinicamente o LPO caracteriza-se pela presença de lesões leucoplásicas estriadas, conhecidas como as estrias de Wickham, pápulas e/ou placas leucoplásicas, ulcerações, bolhas e até eritemas (Ismail *et al.*, 2007). Desta forma, são reconhecidas seis variantes do LPO, de acordo com a sua apresentação clínica, denominadas de LPO reticular, LPO papular, LPO em placa, LPO erosivo, LPO atrófico e LPO bolhoso (Andreasen, 1968; Sugerman *et al.*, 2002; Al-Hashimi *et al.*, 2007). Os locais mais afetados da cavidade oral são a mucosa jugal bilateral, dorso da língua e gengiva inserida. Usualmente, as lesões distribuem-se de forma simétrica, bilateralmente ao longo das superfícies afetadas (van der Meij & van der Waal, 2003; Ismail *et al.*, 2007; Al-Hashimi *et al.*, 2007). O paciente portador de LPO pode não apresentar queixas, contudo quando presentes, os sintomas mais comuns são dor, ardência e outros incômodos semelhantes (Colquhoun & Ferguson, 2004; Ismail *et al.*, 2007).

O diagnóstico de LPO inicialmente é baseado em sua aparência clínica e posteriormente confirmado por uma biópsia e análise histopatológica (Eisen *et al.*, 2005; Van der Meij *et al.*, 2007), mas pode ser mais seguro quando as lesões

cutâneas características estão presentes (Edwards & Kelsch, 2002). O diagnóstico diferencial clínico do LPO reticular deve ser feito com as lesões brancas da cavidade oral, que podem apresentar estrias esbranquiçadas semelhantes às aquelas encontradas nas ceratoses reacionais e em algumas lesões potencialmente malignizáveis (LPM), como as leucoplasias, eritroleucoplasias, leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) (Gouvêa *et al.*, 2010), entre outras LLO, como aquelas encontradas nos efeitos adversos de alguns tipos de medicamentos (Quadro 2) (Scully & Bagán, 2004) ou materiais dentários (Aggarwal *et al.*, 2010), DECHc (Soares *et al.*, 2005), as LLO associadas ao LES e SJ (Márton, 2003).

Quadro 2. Medicamentos relacionados a reações liquenóides*.

Ácido para-aminossalicílico	Dapsona	Oxiprenolol
Alopurinol	Espironolactona	Paládio
Amiftenazol	Estreptomicina	Penicilamina
Anfotericina B	Fenclofenaco	Pirimetamina
Arsênicos	Fenilbutazona	Piritinol
Bismuto	Fenotiazinas	Practolol
Captopril	Furosemda	Propanolol
Carbamazepina	Hidroxicloroquina	Quinacrina
Cetoconazol	Levamisol	Quinidina
Cianamida	Lítio	Sais de ouro
Cimetidina	Lorazepam	Sulfoniluréia
Cloroquina	Mercúrio	Tetraciclina
Clorotiazida	Metildopa	Tolbutamida
Clorpropamida	Metopromazina	Tripolidina

* Adaptada Scully *et al.*, 1998; Scully & Bagán, 2004; Torgerson *et al.*, 2007.

Após a confirmação clínico-histológica do LPO reticular, o seu tratamento é necessário apenas quando o paciente refere sintomatologia (Silverman *et al.*, 1985; Stoopler *et al.*, 2003; Sahebamee & Arbabi-Kalati, 2005). O uso de

corticosteróides tópicos nos casos mais brandos tem sido relatado (Carbone *et al.*, 2009). Por outro lado, a corticoterapia sistêmica pode ser utilizada nos casos mais graves, principalmente naqueles em que há a presença de ulcerações concomitantemente com as estrias esbranquiçadas. Quando do emprego da corticoterapia sistêmica prolongada, o paciente deve ser encaminhado a um médico endocrinologista para fins de acompanhamento do funcionamento das suas glândulas adrenais e demais sistemas, que podem ser afetados pelo uso contínuo de corticóides (Chainani-Wu *et al.*, 2001; Carbone *et al.*, 2009; Lozada-Nur & Miranda, 2006).

Outras drogas, como o tacrolimus (Olivier *et al.*, 2002; Stoopler *et al.*, 2003), talidomida (Macario-Barrel *et al.*, 2003), metronidazol (Büyüç & Kavala, 2000), griseofulvina (Matthews & Scully, 1992) e hidroxi-cloroquina (Eisen, 1993) têm sido descritas para o tratamento do LPO. A atividade imunomoduladora ou antimicrobiana dessas drogas parece representar um possível mecanismo de ação, mas não há muito ensaios clínicos que confirmem esses dados (Sahebamee & Arbabi-Kalati, 2005).

O prognóstico do LPO reticular, em geral, é favorável e após curto período de tratamento o paciente não refere sintomatologia. No entanto, o potencial de transformação maligna do LPO é um tema extremamente controverso e discute-se a importância do correto diagnóstico das lesões brancas que ocorrem na cavidade oral (Axelrod *et al.*, 2006). Na literatura disponível, foram relatados alguns casos de transformação maligna do LPO em carcinoma espinocelular oral (CEC), contudo sabe-se que a etiologia do CEC oral é multifatorial, e dentre os fatores

relacionados à carcinogênese oral, estão os extrínsecos, como o uso crônico de tabaco e bebidas alcoólicas, e os fatores intrínsecos, como a ativação de oncogenes, dentre outros (WHO, 1978; De Jong *et al.*, 1984; Ismail *et al.*, 2007; Souza & Rosa, 2008; Cortés-Ramírez, 2010). Por esse motivo, deve ser realizado o acompanhamento de todas as lesões leucoplásicas, visto que algumas LPM podem ser confundidas, clinicamente, com o LPO (Müller, 2011).

Similarmente, foi relatado o potencial de transformação maligna LPO, quando na presença de algum grau de displasia no exame histopatológico, porém estes dados ainda são controversos no que concerne ao diagnóstico final da lesão, visto que algumas LPM podem apresentar aspectos clínicos e histopatológicos liquenóides e, portanto, descritas como uma entidade conhecida como “lesão displásica com aspecto de LLO” (Lind *et al.*, 1986; Müller, 2011). Quando da presença de atipias epiteliais, o grau de displasia deve ser referido e o termo “displasia liquenóide” tem sido sugerido (Krutchkoff & Eisenberg, 1985; Aguirre-Urizar, 2008; Viridi *et al.*, 2010). No entanto, este termo como diagnóstico histopatológico, é considerado um fator de confusão destas lesões e, portanto, deve ser evitado (van der Waal, 2009).

Durante a evolução do LPO pode haver períodos de exacerbação e de quiescência. Nos períodos mais críticos de sintomatologia, os pacientes apresentam áreas eritematosas e, em alguns casos, úlceras, sintomatologia dolorosa e ardência. Nos períodos de quiescência, são observadas apenas as estrias esbranquiçadas e os pacientes não referem incômodos. Os períodos de exacerbação do LPO têm sido associados a diversos fatores, como por exemplo,

os fatores psicogênicos, estresse, ansiedade e até mesmo o trauma mecânico, proveniente de *morsicatio buccarum*, lesão essa proveniente do hábito da mastigação crônica da mucosa jugal, que origina o fenômeno de Koebner. Outros fatores como trauma relacionado a procedimentos odontológicos, restaurações que retêm placa microbiana ou hábitos parafuncionais também são associados aos períodos de exacerbação da sintomatologia do LPO (Holmstrup *et al.*, 1990; Eisen, 2002).

As reações liquenóides orais (RLO) foram descritas pela primeira vez, em 1973, como “lesão estriada, leucoplásica que acomete a mucosa oral, associada a algum fator causal e com padrão histológico inespecífico para qualquer outra doença” (Pinkus, 1973). Estas por sua vez, compõem amplo grupo de alterações da mucosa oral decorrentes de fatores relacionados ao seu aparecimento, tais como, reações adversas a medicamentos, DAI, reação de hipersensibilidade aos materiais dentários, dentre outras (Steffen & Dupree, 2004; Aguirre-Urizar, 2008; Cobos-Fuentes *et al.*, 2009; Müller, 2011).

A terminologia das RLO por amálgama dental (RLO-AD) foi proposta originalmente por Finne *et al.* (1982) que as definiram como “lesões com fator específico, associado ao desprendimento de componentes da liga metálica que compõe o amálgama”, e foram reafirmadas em 1986, após os achados de Lind *et al.* (1986) que empregaram o termo “Reação Liquenóide” (RL) para se referir às lesões clínicas relacionadas topograficamente com restaurações dentárias de amálgama dental (Lind *et al.*, 1986; Van der Meij *et al.*, 2007; do Prado *et al.*, 2009).

Diante disso, pode-se dizer que as RLO podem ser classificadas em quatro tipos principais: 1) lesões associadas topograficamente à restauração de amálgama dental (DeRossi & Greenberg, 1998; Ostman *et al.*, 1996; Dunschen *et al.*, 2003; Issa *et al.*, 2005; Thornhill *et al.*, 2006), 2) relacionadas a determinados fármacos, 3) lesões liquenóides na DECHc, e 4) as lesões liquenóides não classificadas, que têm um aspecto semelhante ao LPO, mas que não apresentam um ou mais aspectos clínicos característicos, como por exemplo, lesão eritematosa limitada na gengiva sem sinais de LPO "clássico", mudanças de localização das LL não associadas a fatores causais, ou lesões que possuem aspecto de LPO, mas sem uma ou mais características clínicas, como por exemplo, a apresentação bilateral e simétrica (van der Waal, 2009).

Estudos sobre a prevalência das LLO (Franklin & Jones, 2006) mostram que as RLO podem acometer cerca de 1% da população que possui fatores predisponentes a esta condição, como os fatores citados nos quadros 1 e 2, dentre outros, como as reações de hipersensibilidade às ligas metálicas de materiais dentários utilizados na confecção de próteses ou restaurações em amálgama de prata (Ismail *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2010). A RLO-AD é, no entanto, uma LLO um pouco menos freqüente, visto que existe uma alta quantidade de pessoas com restaurações em amálgama de prata e poucos casos descritos sobre essa associação (Agarwal *et al.*, 2010).

Acredita-se que os componentes da cavidade oral possuem mecanismos de defesa que protegem os seus tecidos, tais como, a presença de eletrólitos na saliva, a capacidade tampão da saliva, que dilui constantemente os componentes

alergênicos, e também a rica vascularização que tende a eliminar estes componentes (Dusnche *et al.*, 2003). Outros fatores também associados a esses mecanismos de defesa incluem a integridade e a queratinização da mucosa oral, as quais dificultam a adesão celular de antígenos a haptenos específicos (DeRossi & Greenberg, 1998), e evitam a formação de um conjunto hapteno-carreador, denominado “conjugado”. Esses fatores fazem com que os antígenos não fiquem disponíveis para unirem-se aos seus anticorpos e esse fato culmina no impedimento da geração do evento alérgico. Sabe-se que o termo hapteno é designado a toda espécie molecular não imunogênica ligada a um receptor, que se combina com uma macromolécula imunogênica carreadora (*carrier*) e é capaz de deflagrar a resposta imune específica no hospedeiro. Esses haptenos possuem essas funções, pois penetram na epiderme, se conjugam na maioria das vezes com proteínas do corpo, assim são carreadas e finalmente são responsáveis pela geração da resposta alérgica (Schena *et al.*, 2008).

Clinicamente as RLO-AD possuem características muito semelhantes às encontradas no LPO, porém durante o exame físico intra-oral, é possível ver a estreita relação entre uma restauração de amálgama e lesão estriada, justaposta ao material restaurador de prata (Aggarwal *et al.*, 2010). Em geral, essas lesões são localizadas e não apresentam o aspecto simétrico bilateral encontrado no LPO (Müller, 2011). Os pacientes que têm alterações previamente diagnosticadas como reações liquenóides apresentam lesões que não migram e, usualmente, envolvem apenas a mucosa em contato direto com o amálgama dentário. Essas lesões tendem a regredir rapidamente após a remoção da

restauração adjacente e devem ser diagnosticadas como RLO-AD, e não como LPO idiopático (Ostman *et al.*, 1996).

Assim como no LPO, as biópsias das RLO-AD são necessárias para descartar o diagnóstico de LPM, as quais possuem, em seus estágios mais iniciais, características clínicas similares a uma RLO, pois não apresentam padrão de simetria e possuem o aspecto estriado e leucoplásico, além de por vezes, possuírem características histopatológicas semelhantes (Müller, 2011). Para a confirmação de diagnóstico também podem ser realizados testes cutâneos de hipersensibilidade, como os “*patch tests*” (Issa *et al.*, 2005).

O tratamento deve ser conduzido com a remoção do agente causador se o paciente referir sintomatologia. Após a remoção da restauração em amálgama em geral as lesões desaparecem após um mês do procedimento (Issa *et al.*, 2005). A aplicação de corticosteróides tópicos pode ser necessária, em casos extremos de sintomatologia dolorosa ou quando há a presença de ulcerações (Al-Hashimi *et al.*, 2007). O prognóstico das RLO-AD em geral é excelente quando da remoção do agente causador da reação de hipersensibilidade, no entanto, em alguns casos as lesões podem permanecer por mais algum tempo após a remoção do material restaurador (DeRossi & Greenberg, 1998; Dunschen *et al.*, 2003; Thornhill *et al.*, 2006).

2.3 - Patogênese das LLO: LPO e RLO-AD

Apesar de dependerem de mecanismos patogênicos distintos, essas LLO apresentam-se clinicamente semelhantes, como estrias brancas e liquenóides que

se estendem ao longo da MO. Tais mecanismos parecem estar relacionados à alterações da resposta imune (Al-Hashimi *et al.*, 2007; Barret & Blanc, 2008; Arora, 2008). Portanto, observa-se que há necessidade da compreensão mais adequada da etiopatogenia e comportamento clínico-patológico das LLO, de modo a possibilitar diagnóstico correto e tratamentos mais adequados dessas duas lesões (DeRossi & Ciarrocca, 2005).

A patogênese do LPO está relacionada a mecanismos antígeno-específicos e não-específicos; como exemplos desses mecanismos específicos, pode ser citada a apresentação de antígenos pela camada basal do epitélio seguida de dano citotóxico promovido por linfócitos T-CD8, visto que são células responsáveis pela liberação de citocinas e outros mediadores, como por exemplo, o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e isso ocasiona a regulação imunológica das lesões estabelecidas (Sugerman *et al.*, 2002). Por outro lado, os mecanismos antígenos não-específicos, como por exemplo, a degranulação de mastócitos (Zhao *et al.*, 1997) e acúmulo de linfócitos T (LT) adjacentes à lâmina própria, são responsáveis pela degeneração da camada basal durante o desenvolvimento da lesão (Jontell *et al.*, 1986; Sugerman *et al.*, 2002).

A perda da integridade imune do epitélio normal parece ser um importante evento também ligado à manifestação clínica das LLO. A participação de citocinas produzidas pelos LT-CD4 tem um papel fundamental nesse processo, como a liberação de interferon- γ (IFN- γ) e a produção da CI TNF- α pelos LT-CD8, que por sua vez podem induzir a apoptose de queratinócitos basais (Lodi *et al.* 2005) e

estão associados ao recrutamento de mastócitos (Zhao *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1998).

A patogênese da RLO-AD, é explicada por uma alergia de contato resultante de uma reação de hipersensibilidade tipo IV tipo de dermatite de contato (Van der Meij & Van der Waal, 2003). Este tipo específico de reação é iniciado após o contato e ligação dos haptenos na mucosa oral. Estas moléculas são antígenos incompletos que se ligam a proteínas inatas para produzirem o antígeno completo, e que quando penetram na lâmina própria, são capturadas pelas células de Langherans (CL) e são apresentadas aos linfócitos. Essa reação é responsável pela ativação e proliferação de LT efetores e de memória (DeRossi & Greenberg, 1998).

2.4 - Critérios clínicos e histopatológicos do LPO e RLO-AD

Muitos estudos tentaram estabelecer parâmetros clínico-patológicos de diagnóstico do LPO e RLO-AD pelo fato dessas condições patológicas terem mecanismos patogênicos distintos, mas resposta imunológica e apresentações clínicas e histopatológicas similares. Alguns estudos têm objetivado estabelecer uma caracterização histopatológica e imuno-histoquímica do infiltrado inflamatório e dos eventos celulares, a fim de relacioná-los com as manifestações clínicas dos diferentes tipos de LPO e DAI com manifestações liquenóides (McCartan & Lamey, 1997; Villar, 2000; Mega *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2005; Bascones-Illundain *et al.*, 2006; Thornhill *et al.*, 2006; Köse *et al.*, 2007; Al-Hashimi *et al.*, 2007; Jahanshahi & Aminzadeh, 2010; Fernandez-González *et al.*, 2011).

O termo “reação liquenóide tecidual” ou “estomatite de interface” foi descrito em 1973, quando Pinkus relacionou as características histológicas para essas alterações. Foram estabelecidas as características histopatológicas classificadas como “essenciais” tais como danos aos queratinócitos da camada basal por apoptose, infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo que poderia se estender até o epitélio (exocitose) e a presença de queratose (hiperparaqueratose). Este padrão histológico poderia ser encontrado em muitos espécimes de lesões biopsiadas da cavidade oral, como o LPO, eritema multiforme (EM), lúpus eritematoso discóide (LED) e DECHc (Pinkus, 1973).

O LPO foi caracterizado clínica e histopatologicamente em 1978, quando foram estabelecidos critérios clínico-patológicos pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Dentre os critérios clínicos mais importantes estavam: a presença de lesões brancas estriadas e distribuídas de forma bilateral, e dentre os critérios histopatológicos mais importantes, poderiam ser citados a presença de um infiltrado inflamatório rico em linfócitos e a ausência de displasia epitelial (Kramer *et al.*, 1978). Diante das dificuldades de caracterização clínico-patológica das LLO e da falta de um consenso para o seu diagnóstico, até meados de 1997, ainda não haviam sido testados os critérios da OMS na distinção entre o LPO e as RLO (McCartan & McCreary, 1997).

Diante dessa dificuldade diagnóstica das LLO, o LPO foi então reconhecido como uma lesão benigna e foram estabelecidos critérios histopatológicos para diagnosticar o LPO. As características histológicas foram divididas em duas classes denominadas: “achados essenciais”, representados pela liquefação da

camada basal, infiltrado linfocitário intenso disposto em faixa subjacente ao epitélio, com apagamento da camada basal, padrão normal de maturação das células epiteliais; e “achados não essenciais”, observados como cristas interpapilares em forma de “dentes de serra”; alterações epiteliais como hiperparaqueratose ou hiperortoqueratose, acantose, atrofia, aumento da camada de células granulosas; presença dos corpos de “Civatte”, que são queratinócitos em apoptose; e a separação entre o epitélio e a lâmina própria (Vincent *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1993; Eisenberg, 2000). Essa última alteração, também conhecida como fendas artefatuais ou espaços de Max-Joseph, é atribuída à vacuolização da camada basal ou artefatos devido ao processamento histotécnico (Scully, 1999).

Com o advento dos avanços tecnológicos, foi possível observar novas modalidades diagnósticas na tentativa de caracterizar o LPO, visto que, ao longo da evolução dos relatos da literatura, o LPO poderia ser uma lesão potencialmente malignizável (LPM) (van der Meij *et al.*, 2003). Dessa forma, foi então utilizado pela primeira vez o termo “displasias liquenóides”, que designariam aquelas lesões com padrão clinicamente compatível com LPO, por se caracterizarem clinicamente como estrias esbranquiçadas assimétricas, ou padrão histologicamente compatível com LPO por apresentarem eventos celulares semelhantes àqueles encontrados no LPO, mas que, no entanto poderiam exibir algum grau de displasia epitelial (Eisenberg & Krutchkoff, 1985). Então essas LLO foram caracterizadas histopatologicamente após os relatos de caso de possíveis

potenciais de malignização de uma lesão de LPO (Krutchkoff *et al.*, 1978; van der Meij *et al.*, 1999; Souza & Rosa, 2008).

No entanto, observou-se que, em geral, as lesões de LPO apresentavam achados histopatológicos clássicos, mas algumas lesões não manifestavam as características clínicas típicas (Boisnic *et al.*, 1990). Diante disso, novos estudos sugeriram que esses parâmetros poderiam ser mal-compreendidos, pois algumas vezes tomava-se o termo diagnóstico “compatível com LPO” como diagnóstico final, quando na verdade se tratava de uma lesão com padrão clínico ou histopatológico de um LPO, mas não era propriamente LPO (van der Meij; van der Waal, 2003; Lodi *et al.*, 2005).

Para tanto, em 2003, Van der Meiji *et al.* estabeleceram critérios clínicos e histopatológicos (Quadro 3) para o diagnóstico das LLO e esses critérios foram adotados pela OMS. Clinicamente, o LPO e as RLO devem ser diagnosticados quando apresentarem os critérios clínicos e histopatológicos estabelecidos pela OMS e modificados por Vander Meij *et al.* (2003).

Quadro 3. Critérios de diagnóstico da OMS para o líquen plano oral (LPO ou OLP) e lesão liquenóide oral (LLO ou OLL) modificados por Van der Meiji *et al.* (2003).

<i>Critérios clínicos*</i> Presença de lesões bilaterais, a maioria simétrica. Presença de redes entrelaçadas de linhas cinza-esbranquiçadas ligeiramente elevadas (padrão reticular). Lesões erosivas, atróficas, bolhosas e papulares (aceitas como subtipos somente na presença de lesões reticulares em outras regiões da mucosa oral).
<i>Critérios histopatológicos[†]</i> Presença de uma faixa bem definida de zona de infiltração celular limitada à porção superficial do tecido de contato, composta predominantemente por linfócitos. Sinais de “degeneração liquefativa” nas células da camada basal. Ausência de displasia epitelial.
<i>Diagnóstico final para LPO e LLO.</i> Para chegar a um diagnóstico final, os critérios clínicos e histopatológicos deverão ser associados. O diagnóstico do LPO requer uma observação dos critérios clínicos e histopatológicos. O termo LLO será usado mediante as seguintes condições: 1. Clinicamente típico de LPO, mas histopatologicamente somente compatível com LPO. 2. Histopatologicamente típico de LPO, mas clinicamente somente compatível com LPO. 3. Clínica e histopatologicamente compatível com LPO.

* Em todas as lesões que se assemelhem ao LPO, mas que não completem os critérios acima mencionados, o termo “*cl clinicamente compatível com*” deverá ser utilizado.

[†] Quando as características histopatológicas são pouco óbvias, o termo “histopatologicamente compatível com” deverá ser utilizado.

Na tentativa de se estabelecer diferenças entre o LPO e a RLO-AD, Thornhill *et al.*, (2006) realizaram um estudo clínico-histológico com as avaliações de patologistas bucais do Reino Unido, selecionados pelo seu grau de experiência em diagnóstico histopatológico. Os autores enviaram uma caixa com 24 lâminas de casos de LLO, dos quais eram 12 casos de LPO e 12 casos de RLO-AD,

misturadas aleatoriamente e um questionário com uma lista das características histológicas utilizadas para distinguir as lesões liquenóides do LED, LPO, lesões por galvanismo e leucoplasias, propostas por Schiødt (1984). Após a análise das respostas fornecidas pelos patologistas bucais selecionados, os pesquisadores concluíram que é impossível fazer a distinção das duas lesões por meio de critérios histopatológicos apenas. Mas elas poderiam ser caracterizadas com o envio do sumário da história clínica com indicativos com lesões bilaterais na mucosa jugal, para LPO, e a presença de lesão justaposta a um material restaurador, para a RLO-AD.

Além dos achados clínicos, os mesmos autores avaliaram critérios histopatológicos, e concluíram que existem características histológicas fortemente associadas às LLO analisadas. Os resultados de Thornhill *et al.*, (2006) foram consistentes no que diz respeito à presença de algumas características histológicas determinantes e discriminantes nas lesões de LPO e RLO-AD. De acordo com os resultados dos pesquisadores, as características determinantes para diagnóstico das duas LLO foram: hiper orto ou paraqueratose, degeneração liquefativa da camada basal, e a presença de linfócitos e histiócitos no infiltrado inflamatório subepitelial. Em suma, as características discriminantes para a RLO-AD foram: 1) a presença de infiltrado inflamatório localizado superficialmente ou profundo em algumas ou todas as áreas, 2) infiltrado inflamatório perivascular profundo, 3) plasmócitos no infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo, 4) neutrófilos no infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo, enquanto que, no LPO essas características estavam ausentes.

As caracterizações histoquímicas e imuno-histoquímicas dos eventos celulares e do infiltrado inflamatório também têm sido amplamente utilizadas na distinção entre o LPO e a RLO-AD, visto que, como já mencionado anteriormente, apresentam manifestações clínicas e histológicas muito semelhantes (McCartan & Lamey, 1997; Mega *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2005; Bascones-Ilundain *et al.*, 2006; Köse *et al.*, 2007).

A presença de plasmócitos foi relatada nas lesões do líquen plano e a explicação para a presença dessas células em alguns casos específicos permanece desconhecida, embora tais lesões possam representar uma nova variante histológica (Lupton & Goette, 1981; Roustan *et al.*, 2004). Os plasmócitos foram avaliados e suas quantidades comparadas nas lesões dermatológicas do líquen plano cutâneo (LPC) e das lesões orais do LPO, no entanto foi constatada uma maior quantidade dessas células dos espécimes de biópsias provenientes das lesões orais, e portanto, os plasmócitos podem acompanhar linfócitos no LPO, mas estão ausentes no LPC (Navas-Alfaro *et al.*, 2002).

O aumento de neutrófilos e plasmócitos no infiltrado inflamatório também foi observado nas análises histopatológicas das lesões do LPO clinicamente ulceradas ou com a co-infecção por *Candida albicans* visto que estas alterações estão associadas ao recrutamento dos plasmócitos e neutrófilos encontrados no exame histopatológico de lesões de LPO (Thorrhill *et al.*, 2006).

Similarmente, foi descrita a presença de mastócitos no LPO, dispostos principalmente no tecido conjuntivo profundo, ao redor de vasos, elementos neurais e membrana basal (Jontell *et al.*, 1986; Zhao *et al.*, 1998). Um estudo

morfométrico foi realizado com os objetivos de comparar e quantificar essas células no infiltrado inflamatório subepitelial de lesões de LPO e DECHc. Os mastócitos foram quantificados em cinco imagens computadorizadas com área de 0,0049 mm², obtida a partir de cinco campos selecionados em cada imagem. Por meio da metodologia empregada, foi possível observar que os mastócitos apresentavam maior quantidade de grânulos, e coloração mais intensa, nas RLO da DECHc do que os mastócitos observados nos casos de LPO, os quais mostravam menor quantidade de grânulos e coloração mais pálida. Contudo, no infiltrado inflamatório, o número de mastócitos no LPO foi significativamente maior que aquele observado nas RLO da DECHc (Villar, 2001).

Jahanshahi & Aminzadeh (2010) realizaram um estudo com o objetivo de diferenciar o LPO das RLO, por meio da identificação de mastócitos corados com coloração histoquímica de azul de toluidina e imuno-histoquímica para estas células. A presença de mastócitos foi avaliada quantitativamente e qualitativamente (estado de degranulação) nas duas lesões e, posteriormente, os resultados foram comparados. Por meio da metodologia empregada pelos pesquisadores não foram observadas diferenças nas contagens de mastócitos, no entanto os resultados da análise qualitativa das duas LLO mostraram que a degranulação de mastócitos foi estatisticamente maior nas RLO do que no LPO, o que confirma a íntima relação dos grânulos dos mastócitos na patogênese das RLO (Jose *et al.*, 2001; Juenja *et al.*, 2006).

2.5 - Citocinas inflamatórias, polimorfismos gênicos e suas relações com LPO e RLO-AD

As citocinas inflamatórias (CI) são proteínas reguladoras que podem atuar como hormônios e também de forma autócrina e parácrina (Liles & Van Voorhis, 1995) e são produzidas principalmente pelos macrófagos, leucócitos, células endoteliais e fibroblastos (Abbas & Pober, 2000). Dessa forma, a exposição simultânea a diferentes citocinas pode resultar em respostas diferentes nas células-alvo (Tarlow *et al.*, 1993; El-Omar *et al.*, 2000) e controlar ou modular as células alvo por meio da ligação com receptores específicos (Vilcek, 2003; Smith & Humphries, 2009).

Essa ligação aos receptores específicos inicia um sinal de transdução que ativa uma cadeia de mensageiros secundários. Além disso, agem também como mediadores químicos pleiotrópicos, ou seja, podem exercer diferentes funções em diferentes tecidos ou situações, como a ativação celular, proliferação, fagocitose, quimiotaxia e diferenciação celular (Carvalho, 2005).

As CI podem ser classificadas, didaticamente, de acordo com as suas ações ou propriedades em: pró-inflamatórias e antiinflamatórias; ou pelo seu papel como fatores de crescimento ou pelos seus efeitos no sistema hematopoiético. Esse grupo de substâncias inclui as interleucinas (IL), os interferons (IFN) e a família do fator de necrose tumoral (TNF) (Carvalho, 2005). No entanto, algumas citocinas podem ser pró- ou antiinflamatórias de acordo com o ambiente em que estão. As chamadas pró-inflamatórias (IL1, IL2, IL6, IL8, IL12, TNF- α e IFN- γ)

ativam o processo inflamatório, auxiliam na eliminação dos patógenos com consequente resolução da inflamação. Por outro lado, as citocinas antiinflamatórias (IL4, IL10, IL13, TGF- β) reduzem a resposta inflamatória por meio da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da supressão da ativação de monócitos (Remick, 2003).

A produção das CI está sob controle genético e, pode ser aumentada ou diminuída de acordo alterações no genoma. Os genes das citocinas fazem parte de um grupo extremamente polimórfico e as suas mutações afetam vários órgãos e sistemas do organismo, como por exemplo, a sua atuação no desencadeamento da ativação ou supressão de diversos outros genes (Carvalho, 2005).

Polimorfismo gênico é definido como a presença de múltiplos alelos para um determinado gene, devido a alterações na sequência de nucleotídeos. Eles diferem da mutação pela frequência em que aparecem na população, que deve ser maior que 1% (Nelson, 2001; Slavkin, 2001). Os polimorfismos podem ocorrer de três formas principais: polimorfismos de troca de nucleotídeo único (SNP), número variável de repetições em tandem (VNTR) ou microssatélites (Thompson & Thompson, 2002).

Polimorfismos do tipo SNP são definidos como variações na sequência de DNA com prevalência em 1% ou mais da população, que ocorrem no genoma quando um único nucleotídeo – A (adenina), T (timina), C (citosina), G (guanina) - ou outra sequência compartilhada, difere entre os membros de uma espécie ou entre pares de cromossomos em um mesmo indivíduo (Rhodus *et al.*, 2005;

Rhodus *et al.*, 2006). SNP apresentam dois alelos possíveis, reconhecidos por sítios de restrição. A alteração de um par de bases na sequência do DNA pode criar um sítio de restrição, ou seja, na dependência do nucleotídeo presente, a sequência será ou não reconhecida e clivada por uma enzima de restrição específica. Esse tipo de polimorfismo apresenta-se uniformemente distribuído por todo o genoma e é mais freqüente que o VNTR e o microsatélite (Thompson & Thompson, 2002).

Os SNP podem afetar a transcrição gênica, a estabilidade do ácido ribonucléico (RNA) e até mesmo a codificação de proteínas (Takashiba & Naruishi, 2000; Thompson & Thompson, 2002; Nielsen, 2004). A grande maioria dos polimorfismos encontrados em genes das citocinas e seus receptores estão localizados em regiões promotoras dos genes, região intrônica ou na região 3', regiões estas não traduzidas, mas que, mesmo assim, podem influenciar a expressão de um gene (Jin *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005). O DNA bruto dos seres humanos para análises de SNP pode ser adquirido por diversas técnicas, dentre essas, por meio de células contidas nas amostras de sangue periférico ou, por meio da coleta das células provenientes da camada superficial da mucosa oral, na qual o voluntário é orientado a realizar um bochecho com cinco mililitros (mL) solução de sacarose a 3% por 60 segundos, com movimentos que objetivam raspar os dentes contra as mucosas bucais e a língua (Aidar & Line, 2007). Esse protocolo foi testado em estudos que afirmam que a qualidade do DNA bruto é semelhante aquele obtido nas extrações de DNA proveniente de sangue periférico (Bufalino, 2010; Aquino, 2011).

Os polimorfismos em regiões promotoras podem alterar ou anular as atividades de elementos reguladores da transcrição, entre outras moléculas, e comprometerem o seu sinal da transdução (Jin *et al.*, 2004). Apesar de ser muito freqüente, a grande maioria dos polimorfismos observados nos genes das citocinas parece ter pouca ou nenhuma influência na produção de citocinas ou na expressão gênica (Keen, 2002). Contudo existem trabalhos que relacionam os polimorfismos em genes de citocinas com as DAI (Sakamoto *et al.*, 2006; Dickinson *et al.*, 2008). Dentre esses estudos, há aqueles que relacionam polimorfismos em genes de citocinas com DAI orais, como o líquen plano oral, aftas e outras como a doença periodontal, síndrome da ardência bucal e mucosite oral associada à quimioterapia e/ou radioterapia (Lang *et al.*, 2000; Sonis *et al.*, 2002; Trevilatto *et al.*, 2003; Rhodus *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2006; Rhodus *et al.*, 2007; Xavier *et al.*, 2007).

Outro aspecto é o fato de que estas variações podem afetar a forma como os seres humanos desenvolvem doenças, como respondem a agentes patogênicos, produtos químicos, medicamentos, vacinas e outros agentes terapêuticos. Uma grande importância do estudo dos polimorfismos SNP na pesquisa biomédica é a possibilidade de comparar regiões do genoma entre gerações de indivíduos, bem como a correspondência com coortes de pacientes com e sem uma doença (Zhang *et al.*, 2008).

Os SNP localizados, principalmente, na região promotora de alguns genes relacionados às respostas inflamatórias, podem regular a expressão dessas citocinas. Esses SNP promovem a expressão de alelos que podem interagir com

diferentes fatores transcricionais, aumentar a produção dessas proteínas e elevar seus níveis séricos (Turner *et al.*, 1997; Fishman *et al.*, 1998; Eskdale *et al.*, 1998; Tagore *et al.*, 1999) e salivares (Rhodus *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008) das CI por eles reguladas.

Os polimorfismos se manifestam como fenótipos com alta, intermediária ou baixa produção de proteínas (Wilson *et al.*, 1997; Pravica *et al.*, 1999; Visentainer *et al.*, 2008). Um grande número de polimorfismos gênicos tem sido identificado em genes das citocinas inflamatórias e vários estudos demonstram uma associação destes polimorfismos com um efeito protetor ou uma maior predisposição ao desenvolvimento de doenças (Dutra *et al.*, 2009).

A correlação da presença dos SNP com a dosagem de citocinas séricas, em pacientes portadores de DAI orais, tem sido método bastante utilizado para a avaliação da associação do genótipo com o fenótipo e, por conseguinte, a compreensão da patogênese e prognóstico desse grupo de doenças (Wilson *et al.*, 1992; Yamamoto & Ozaki, 1995). Estudos dos SNPs relacionados, especificamente, à síntese de citocinas das respostas Th1 e Th2, têm sido realizados com o objetivo de se entender a patogênese do LPO (Sugerman *et al.*, 2002; Pezelj-Ribaric *et al.*, 2004).

A IL1- β é uma CI que tem efeitos em vários tipos celulares e interage com outras citocinas (Dinarello, 1996; Dinarello, 1997; Arend, 2002). Essa IL apresenta efeitos biológicos sobre a superexpressão de genes das citocinas e mediadores pró-inflamatórios. A produção de IL1- β pode ser estimulada por fatores

microbiológicos (presença de vírus, bactérias ou fungos) e não microbiológicos, como outras citocinas (Dinarello, 1996). Quando em conjunto, a IL1- β e TNF- α , possuem efeitos sinérgicos, como indução de moléculas de adesão, essenciais para as fases iniciais da resposta inflamatória (Santila *et al.*, 1998; Dinarello, 2000).

Atualmente há dois polimorfismos bastante estudados na IL1- β : o -511C/T localizado na região promotora do gene, e o +3953 C/T localizado no quinto exon (Bensen *et al.*, 2003). Os macrófagos de indivíduos com o genótipo 3953 T/T tendem a produzir mais IL1- β , quando comparados aos de indivíduos com o genótipo 3953 C/C (Pociot *et al.*, 1992). Esses polimorfismos têm sido associados com diferentes DAI e com outras doenças com o componente inflamatório relevante (Kornman *et al.*, 1997; Gore *et al.*, 1998).

O gene IL4 é localizado cromossomo 5q31. A substituição do nucleotídeo (C-T) na posição -590 da região promotora do gene também tem sido associada a várias DAI (Kahn *et al.*, 2003), pois sabe-se que essa CI é responsável pela mudança de expressão da imunoglobulina M (IgM) para imunoglobulina E (IgE) nos linfócitos B (LB) que media os processos auto-imunes (Marsh *et al.*, 1994; Carvalho, 2005).

Além disso, sabe-se que a supressão da DAI está ligada à presença de células T do subtipo Th2, o qual está relacionado com secreção de IL4 e confere efeito protetor aos portadores de DAI (Friedman & Weiner 1994; Hancock *et al.*, 1994). Além disso, o gene IL4 regula as reações imunes mediadas pela

imunoglobulina E (IgE) e por células como mastócitos e eosinófilos. Essa IL também exerce importantes ações sobre diversas as funções de tipos celulares e podem atuar como fator de crescimento e diferenciação das células T e estimular a expressão de certas moléculas de adesão (Ribeiro *et al.*, 2010).

A superexpressão de IL4 foi avaliada nos queratinócitos e em células provenientes do infiltrado inflamatório de pacientes com LPO, e esse fato mostrou que houve um aumento na produção desta IL4 associada à presença de LPO (Yamamoto & Osaki, 1995). Além disso, foi realizada a análise do impacto de polimorfismos dos genes Th1 e Th2 produtores de citocinas em coorte de pacientes chineses portadores de LPO. Para tanto, foram investigados polimorfismos do gene IFN- γ e do gene IL4 em 151 pacientes com LPO e 143 controles saudáveis. Os dados revelaram que as frequências do alelo IL4 C-590 ($p = 0,001$) e do genótipo CC ($p = 0,024$) nos pacientes com a forma não erosiva do LPO (neLPO) foram significativamente maiores que as dos pacientes do grupo controle. Os autores concluíram que os polimorfismos do gene IL4 parecem ter uma ação protetora sobre os indivíduos, uma vez que essa CI influencia negativamente a suscetibilidade ao desenvolvimento de formas mais graves da doença e progressão do LPO nessa coorte de etnia chinesa (Bai *et al.*, 2008).

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica que exerce importantes atividades pró-inflamatórias (Carswell *et al.*, 1975) e é produzida principalmente por monócitos e macrófagos, embora outras células como LB e LT também a secretem (Wilson *et al.*, 1997). Essa CI é codificada pelo gene TNF que está localizado junto à região

de codificação do complexo de histocompatibilidade maior III (MHC-classe III) (Hoffstedt *et al.*, 2000). O TNF- α é um mediador primário da resposta inflamatória e atua na patogênese de DAI, pois é a primeira CI a ser secretada durante processos inflamatórios e é responsável pelo desencadeamento da cascata de ativação de vários outros genes como os das IL1 e IL6 (Makhatadze, 1998; Hoffstedt *et al.*, 2000).

O polimorfismo mais comumente estudado no gene TNF é o -308 G/A e é também conhecido como TNF 1/2. Esse SNP é localizado na região promotora do gene na posição -308 e possui dois alelos possíveis: TNF-308 A1, que apresenta uma guanina (G) e é a forma mais freqüente, e o TNF-308 A2, que possui uma adenina (A) e é a forma menos freqüente. O alelo menos freqüente parece estar associado à maior atividade e, portanto, é responsável pelo aumento dos níveis séricos de TNF frente a estímulos celulares (Carvalho, 2005).

O polimorfismo do TNF- α na posição -308G/A tem sido associado com a ocorrência e/ou predisposição a várias enfermidades, como sarcoidose, leishmaniose, malária e LES, entre outras. Alguns trabalhos demonstram uma correlação positiva entre o genótipo -308G/A e o desenvolvimento de DECHc (Takahashi *et al.*, 2000). Há trabalhos na literatura que associam o polimorfismo -308G/A com a ocorrência de LPO, quando se comparam os dados com os de pacientes controles (sem a doença), visto que esse fenótipo propicia o aumento da síntese das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ (Carrozzo *et al.*, 2004; Xavier *et al.*, 2007).

O gene IL10 é codificado por cinco exons no cromossomo 1 e pode ser expresso em várias células usualmente em resposta a estímulos de outras citocinas. Vários polimorfismos têm sido descritos na região 5' do gene IL10, dentre estes, 3 mutações em ponto nas posições -1082G/A, -819C/T e -592C/A, as quais são as mais estudadas e determinam 3 possíveis haplótipos GCC (-1082G, -819C e -592C), ACC (-1082A, -819C e -592C) ou ATA (-1082A, -819T e -592A). Dentre os genótipos possíveis, podem ser definidos os fenótipos: AT/AT - baixo produtor, AC/AT ou AC/AC ou GC/AT ou GC/AC - produtor intermediário e GC/GC - alto produtor (Carvalho, 2005). Nos humanos, a interleucina 10 (IL10) é produzida nos LB, linfócitos Th2 e nos monócitos. Essa IL possui uma função inibitória da proliferação dos linfócitos Th1 (Sivula *et al.*, 2009) e da produção de IFN- γ e IL2, IL1- β , IL6, IL8, IL12 e TNF- α (Reitamo *et al.*, 1994; Lazarus *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2001; Nolan *et al.*, 2004).

Contrariamente a essa ação antiinflamatória, a IL10 promove a resposta de células B, em parte por funcionar como fator de crescimento destas células, e em outra pela inibição das células L-Th1, atuar nas células B dos centros germinativos aumentando a expressão do gene bcl-2, fato esse que impede a apoptose de células B auto-reativas. Portanto seria facilitador das manifestações auto-imunes (Moore *et al.*, 2001, Carvalho, 2005). E, a partir desses achados, foi possível observar a influência positiva do polimorfismo da IL10, em portadores de LPO (Xavier *et al.*, 2007).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos gerais

Diferenciar o Líquen Plano Oral (LPO) da reação liquenóide oral associada ao amálgama dental (RLO-AD) por meio de características clínica, histopatológica, presença de hipossalivação e análise de polimorfismos.

3.2 Objetivos específicos

1. Distinguir o LPO da RLO-AD por meio da análise de outros achados histopatológicos, como hiperqueratose, acantose, atrofia epitelial, fenda subepitelial focal, projeção em dente de serra, derrame pigmentar, exocitose e presença de folículo linfóide, presença de corpo de Civatte e infiltrado inflamatório perivascular profundo (localizado na submucosa);
2. Distinguir o LPO da RLO-AD por meio da espessura epitelial e espessura do infiltrado inflamatório em banda subepitelial (IIBSE);
3. Analisar o IIBSE e distinguir o LPO da RLO-AD por meio da quantidade de linfócitos T CD-3, T-CD-8, linfócitos B, plasmócitos e mastócitos imunomarcados no em área de 1mm²;
4. Analisar hipossalivação no grupo de voluntários portadores de LLO comparada com voluntários saudáveis, por meio de mensuração do fluxo salivar;
5. Identificar a frequência dos polimorfismos nos genes das respostas Th1/2: IL1-β+3953C/T, IL4-590C/T, TNF-α-308G/A e IL10-592A/C, em pacientes portadores de LLO.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo e divisão dos grupos

O estudo foi transversal e compreendeu três grupos de estudos, que foram subdivididos de acordo com as análises realizadas (Figura 1).

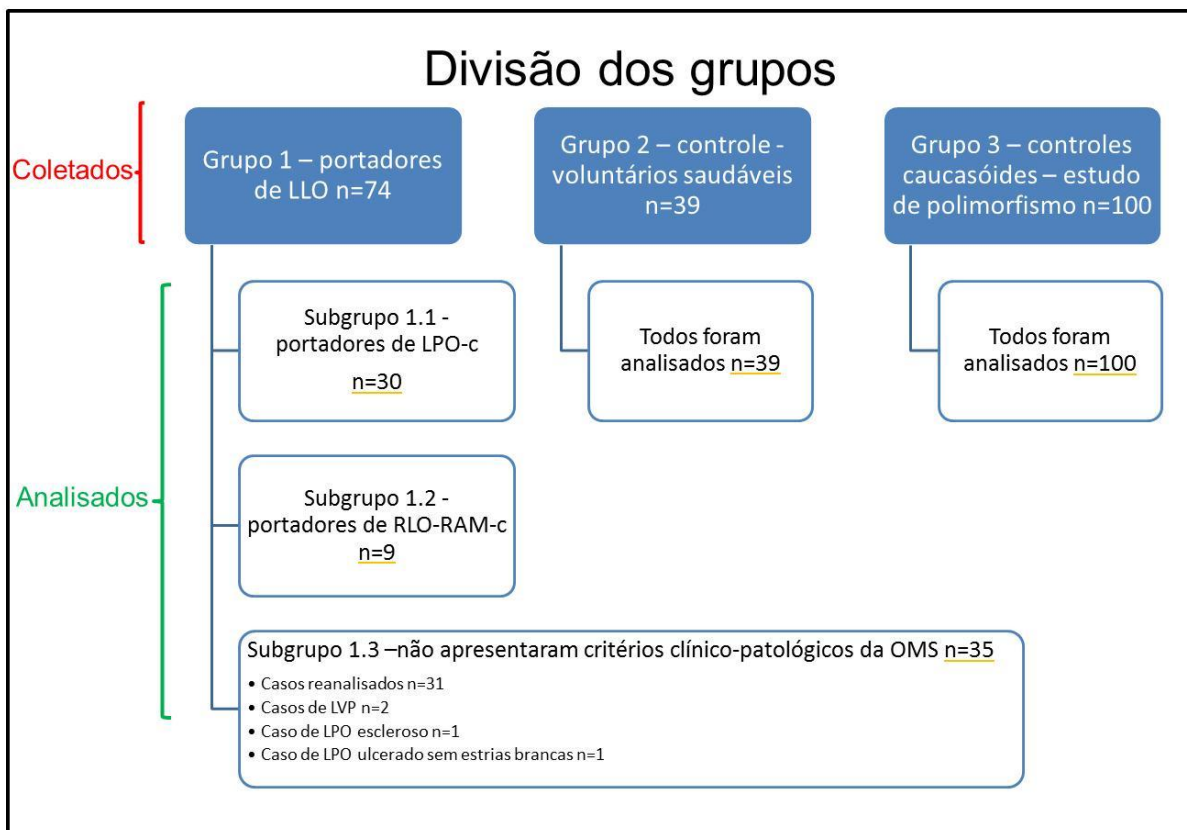


Figura 1 – Fluxograma da divisão dos grupos.

O grupo 1 foi composto 74 voluntários, de ambos os gêneros, com idades entre 18 e 60 anos, em bom estado geral de saúde de acordo com o cálculo amostral, portadores de lesões liquenóides orais (LLO), selecionados a partir do banco de lâminas e laudos, que apresentaram diagnósticos histopatológicos de LPO, compatível com LPO, RLO-AD ou compatível com RLO-AD dos laboratórios

de patologia da FOP-UNICAMP (Piracicaba, SP), Faculdade de Odontologia da UFPE (Recife, PE) e pacientes provenientes da demanda espontânea do atendimento do Orocentro da FOP-UNICAMP (Piracicaba, SP), Clínica de Estomatologia da UFPE (Recife, PE). Os voluntários que compuseram o grupo-1 foram pacientes que já haviam sido submetidos ao exame físico extra e intraoral com luz artificial proveniente do equipo odontológico e uso de instrumentais convencionais para exame físico. De posse dos dados presentes em suas fichas clínicas foram novamente analisados de acordo com os critérios clínico-histopatológicos propostos pela OMS e a partir daí foram selecionadas os casos de LPO e RLO-AD para compor os subgrupos 1.1 e 1.2.

Para compor o grupo 2, para estudo da variável hipossalivação, foram selecionados 39 voluntários saudáveis pareados com os pacientes dos subgrupo 1.1 e 1.2 de acordo com gênero e idade com variação de mais ou menos cinco anos, em bom estado geral de saúde e que possuíam restaurações em amálgama, mas que eram livres de líquen plano oral (LPO) ou reação liquenóide oral (RLO) e se enquadravam nos critérios de elegibilidade (vide critérios de inclusão/exclusão do grupo de controles para hipossalivação) atendidos no Orocentro da FOP-UNICAMP (Piracicaba, SP) e Clínica de Estomatologia UFPE (Recife, PE).

Para compor o grupo de controles utilizados no estudo dos polimorfismos dos genes $IL1-\beta^{-3953C/T}$, $TNF-\alpha^{-308G/A}$, $IL10^{-592A/C}$ e $IL4^{-590C/T}$ (grupo 3), foram utilizadas 100 amostras de DNA isoladas extraídas de sangue periférico do grupo de voluntários caucasóides, não relacionados parentalmente, provenientes do

banco amostras do Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP – Hemocentro da UNICAMP (Campinas, SP). A coleta de amostras para extração de DNA e genotipagem foi autorizada previamente e independente dessa pesquisa, após esclarecimento dos procedimentos e possível utilização do material coletado para análise de polimorfismos em uma população saudável e assinatura de termo de consentimento padrão para doadores voluntários daquela unidade, que contempla autorização para uso das amostras para estudos.

O tamanho da amostra foi baseado na prevalência das manifestações orais de lesões liquenóides em diversos estudos. Foram considerados estudos que avaliaram a prevalência (p) do LPO $p = 1\%$ a $11,62\%$ e da RLO-AD $p = 1\%$. Observou-se que a prevalência variou entre 1% a $11,62\%$, sendo o ponto médio deste intervalo $p = 5,81\%$. O erro amostral foi estimado pela diferença entre as prevalências estudada e real, e quanto menor fosse o erro amostral, maior seria o tamanho da amostra, portanto foi ideal calcular pelo menor erro amostral (Medronho *et al.*, 2002). Portanto, para o cálculo amostral foi adotado nível de significância de 5% e prevalência estimada de 12% , que resultou em uma amostra de no mínimo $n = 30$ sujeitos. Entretanto foram consideradas as perdas durante o seguimento da pesquisa, por isso foram coletados dados mais de 30 voluntários portadores de LLO, dos quais foram selecionados 39 casos de LLO para as análises clínicas, histopatológicas, imuno-histoquímicas, de hipossalivação e polimorfismos gênicos.

4.2 Critérios de inclusão e exclusão dos voluntários e meios de convocação dos sujeitos

4.2.1. Grupo de casos portadores de LLO (LPO ou RLO-AD) – Grupo

1

4.2.1.1 Critérios de inclusão

- Ser portador de LPO ou RLO-AD com laudos com os seguintes diagnósticos histopatológicos: LPO, compatível com LPO, RLO ou compatível com RLO. Foram considerados os critérios de diagnóstico da Organização Mundial de Saúde (OMS) do LPO e LLO modificados por Van der Meiji *et al.*, 2003;
- Ambos os gêneros com idade acima de 18 anos e aptos a assinar o TCLE;
- Ser saudável não portador de DAI (quadro 2) que não faziam uso dos medicamentos potencialmente associados a reações liquenóides (Quadro 3) e não ter sido tratado pelo transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH);;
- Consentir a sua participação na pesquisa por meio da assinatura do TCLE.

4.2.1.2 Critérios de exclusão

- Não ser portador de LPO ou RL-AD com laudos com os seguintes diagnósticos: LPO, compatível com LPO, RLO ou compatível com RLO. Foram considerados os critérios de diagnóstico da Organização Mundial de Saúde (OMS) do LPO e LLO modificados por Van der Meiji *et al.*, 2003;
- Idade inferior a 18 e não aptos para assinar o TCLE;
- Indivíduos portadores de DAI (quadro 2) ou em uso dos medicamentos potencialmente associados a reações liquenóides (Quadro 3);

- Não se enquadrar nos critérios de elegibilidade ou não consentir a sua participação na pesquisa.

Após obtenção da aprovação do comitê de ética e pesquisa em seres humanos da FOP-UNICAMP (ANEXO), a sistemática de recrutamento dos voluntários que compuseram o grupo-1 seguiu a seguinte ordem:

1. Verificação do arquivo de laudos e fichas clínicas do laboratório de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco e Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP entre os anos de 1990 a 2009 e também identificação dos pacientes provenientes da demanda espontânea dos centros descritos;
2. Após a verificação e identificação do registro dos voluntários, foram acessadas as informações de contatos de telefone e/ou correspondência a fim de serem recrutados por esses meios. Os voluntários que compareceram foram distribuídos em um grande grupo de estudo de portadores de LLO (grupo 1). Aqueles pacientes que faltavam ao primeiro contato eram novamente convocados por mais duas tentativas, até que na quarta, esse voluntário era excluído da pesquisa.
3. Os voluntários que foram recrutados e compareceram, e os novos pacientes provenientes da demanda espontânea dos centros de diagnóstico descritos passaram pelos procedimentos de pesquisa conforme os itens 4.4 a 4.7.

4.2.2. Grupo Controle- estudo de hipossalivação– Grupo 2

4.2.2.1 Critérios de inclusão

- Apresentar restauração em amálgama de prata há pelos menos cinco anos;
- Não apresentar LPO, reações liquenóides induzidas por uso de medicamentos e/ou contato com restauração (ões) de amálgama além não ter sido tratado pelo transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH);
- Pacientes pareados com os grupos 1 para gênero e idade considerando um intervalo de +/- 5 anos;
- Ser saudável, não portador de DAI (quadro 2) e não utilizarem medicamentos potencialmente associados a reações liquenóides (Quadro 3);
- Consentir a sua participação na pesquisa por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.2.2.2 Critérios de exclusão

- Não possuir restauração em amálgama de prata há pelo menos cinco anos;
- Apresentar sinais de LPO, reações liquenóides induzidas por uso de medicamentos e/ou contato com restauração (ões) de amálgama.
- Ser portador de DAI (quadro 2) ou estar em uso de medicamentos potencialmente associados a reações liquenóides (Quadro 3);
- Não se enquadrar nos critérios de elegibilidade.

4.2.3. Grupo controle - estudo dos polimorfismos – Grupo 3

4.2.3.1 Critérios de inclusão

- Amostras de DNA proveniente do grupo de controles caucasoides (CC) do Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP;

- Estar pareado com os grupos 1 e 2 para gênero e idade considerando um intervalo de +/- 5 anos;
- Por fazerem parte do grupo de CC, já haviam consentido a sua participação nas pesquisas de polimorfismos, visto que assinaram um TCLE específico do Hemocentro da UNICAMP no momento da coleta do seu material genético.

4.2.3.2 Critérios de exclusão

- Amostras de DNA de pacientes não pareados em gênero e idade e não serem provenientes do grupo de CC do Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP;
- Não se enquadrar nos critérios de elegibilidade.

4.3 Aplicação dos critérios OMS, 2003 para seleção dos casos de LPO e RLO-AD

No momento do novo exame clínico foram obtidas fotografias da mucosa oral bilateralmente de todos os pacientes, com o objetivo de arquivar as imagens clínicas. Estes procedimentos eram realizados de forma habitual nos serviços relacionados a esta pesquisa. No caso de pacientes novos, provenientes da demanda espontânea dos serviços, foram realizados exames clínicos, tomadas de fotografias, biópsia incisiva das LLO e esses pacientes foram incluídos no grupo de estudos. Após a remoção cirúrgica, o espécime foi fixado em formol neutro a 4% e encaminhado para processamento histológico de rotina para inclusão do espécime em blocos de parafina. A partir daí foram realizados cortes de cinco

micrômetros (μm) para montagem na lâmina e os preparados histológicos receberam a coloração de rotina em H&E.

De acordo com os critérios da OMS (2003) para diagnóstico das LLO (CDx-OMS-LLO), as características clínicas consideradas foram: 1- presença de lesões bilaterais, 2- presença de lesões brancas estriadas (reticular) e 3- presença de lesões erosivas, atróficas, bolhosas e papulares associados à presença de lesões brancas em qualquer outro local da MO. Ainda de acordo com os CDx-OMS-LLO, as características histopatológicas consideradas foram 1- presença de uma faixa bem definida de zona de infiltração celular limitada à porção subepitelial, composta predominantemente por linfócitos; 2- sinais de “degeneração liquefativa” nas células da camada basal; e 3- ausência de displasia epitelial (Quadro 3). O LPO foi considerado quando presentes pelo menos os dois primeiros critérios clínicos (lesões bilaterais, a maioria simétrica, e presença de redes entrelaçadas de linhas cinza-esbranquiçadas ligeiramente elevadas padrão reticular), em associação com a presença dos critérios histopatológicos. A RLO-AD foi considerada quando presentes as lesões associadas às restaurações em amálgama e o paciente não possuía nenhuma outra lesão em outros locais da mucosa oral, bem como a obediência aos critérios histopatológicos.

4.4 Coletas dos dados e das amostras dos pacientes provenientes dos bancos de dados das unidades relacionadas

4.4.1 – Coletas dos dados

Os procedimentos de coletas de materiais biológicos foram realizados nos voluntários dos grupos 1 e 2 após a obtenção da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICES A e B), no qual os mesmos foram informados dos objetivos da pesquisa e de todos os procedimentos relacionados à mesma, bem como dos riscos e benefícios, possíveis reações adversas e/ou constrangimentos ocasionados pelos procedimentos de coleta dos dados demográficos, coleta das amostras de saliva, e no caso dos pacientes dos grupos de estudo, da possibilidade de procedimento de biópsia, se houvesse indicação.

Todos os voluntários dos grupos 1 e 2 foram submetidos ao exame clínico da MO e aplicação de um questionário estruturado para obtenção dos dados sócio-demográficos, dados médicos e história da doença atual (APÊNDICES C e D).

4.4.2 – Coletas da saliva

4.4.2.1 Coleta da saliva para testes de hipossalivação dos pacientes afetados pelas LLO (grupo 1) e controles (grupo 2)

Os voluntários do grupo 1 (n=74) foram submetidos a duas coletas de amostras salivares, com finalidades distintas: a primeira, para a mensuração da hipossalivação e a segunda, para extração de DNA e avaliação dos polimorfismos.

Nos voluntários do grupo 2 (n=39) foi conduzida apenas a coleta de saliva para a mensuração da hipossalivação.

A coleta foi realizada em todos os pacientes até às 10 horas da manhã e seguiu da seguinte forma: o paciente foi orientado a não ingerir alimentos, beber ou fumar por um período mínimo de 30 minutos antes da coleta e expelir em um recipiente plástico a saliva total não estimulada produzida durante o período de cinco minutos. Ao término da coleta, a amostra foi mensurada em mililitros com uma pipeta volumétrica de precisão e a quantidade de saliva total foi dividida pelo tempo de coleta.

4.4.2.2 Coleta da saliva para obtenção das células da mucosa oral para extração de DNA dos pacientes afetados pelas LLO (grupo 1)

Para a coleta das células humanas provenientes da camada superficial da mucosa oral foi adotado um protocolo previamente proposto, no qual o voluntário foi orientado a realizar um bochecho com 5 mL solução de sacarose a 3% por 60 segundos e raspar as mucosas e a língua contra os dentes. O conteúdo resultante do bochecho foi transferido para um tubo de 15 mL, o qual continha o volume de 5 mL de uma solução 66% alcoólica composta por 17 mM Tris-HCl pH 8,5 mM NaCl e 7mM EDTA para evitar o crescimento bacteriano e após a coleta, o material foi estocado a 4°C.

O isolamento do DNA genômico foi realizado de acordo com as seguintes etapas: a cada tubo foi adicionada água destilada e deionizada autoclavada q.s.p. 15 mL. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado em solução aquosa, composta por 17 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl e 7 mM

EDTA. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em solução de lise composta por 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA, 0,2 µg de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubado a 50°C em movimento contínuo semicircular. Após 16 h de incubação, foram adicionados 500 µl de uma solução aquosa de 1 mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 min. a 12.000 g a 4°C. O precipitado de DNA foi lavado com etanol 70%, centrifugado (12.000 g por 5 min.), secado à temperatura ambiente durante 30 min. e ressuspenso em tampão Tris-EDTA (TE Buffer). A concentração e pureza das amostras foram determinadas por espectrofotometria a 260 e 280 nm (espectrofotômetro Genesys 2, Spectronic Inst., Rochester, NY, EUA) e relação de July (leitura de 260nm dividida pela leitura de 280nm). Quando acima de 1,2, era considerado um bom DNA bruto.

4.5 Análises das amostras

4.5.1 - Análises histopatológicas dos outros achados microscópicos

Após seleção dos casos de LPO e RLO-AD, que compuseram os subgrupos 1.1 e 1.2, respectivamente, por meio da utilização dos critérios adotados pela OMS, foram analisados outros achados microscópicos como: a hiperqueratose (hiperortoqueratose e hiperparaqueratose), acantose, atrofia epitelial, fenda subepitelial focal, projeções em dentes de serra, derrame pigmentar, exocitose, presença de folículos linfóides, presença de corpos de Civatte e infiltrado inflamatório perivascular profundo localizado na submucosa.

O diagnóstico de hiperqueratose foi estabelecido pela observação da presença de aumento da espessura da camada córnea, sendo esta considerada hiperortoqueratose quando da ausência de remanescentes nucleares ou celulares; e hiperparaqueratose, quando na presença destes remanescentes nucleares ou celulares. A acantose foi considerada como espessamento da camada espinhosa, associada ou não ao alongamento e confluência das papilas epiteliais. A atrofia epitelial foi considerada quando da redução da espessura do epitélio focal ou total. A fenda subepitelial focal foi considerada quando houvesse qualquer separação entre o epitélio e o tecido conjuntivo, que não se estendesse ao longo de todo o corte. As projeções em dente de serra foram consideradas quando da presença de formação de papilas epiteliais em formatos triangulares com vértice voltado para o tecido conjuntivo. O derrame pigmentar (ou pigmentação incontinente) foi considerado quando havia qualquer quantidade de melanina localizada na lâmina própria. A vacuolização da camada basal foi considerada quando da presença de degeneração hidrópica das células da camada basal. A presença de folículo linfóide foi considerada quando na presença de agregados linfóides observados no tecido conjuntivo.

A presença de corpos apoptóticos de Civatte foi considerada a partir da observação de queratinócitos necróticos localizados nas camadas espinhosa e córnea do epitélio, os quais apresentavam formato irregular, com ou sem núcleo e coloração citoplasmática eosinofílica. O infiltrado inflamatório perivascular profundo foi definido como a presença de células inflamatórias linfoplasmocitárias aglomeradas ao redor dos vasos do tecido conjuntivo profundo, ou seja,

localizados na submucosa. Todos estes achados, após serem analisados, receberam os seguintes valores: 0= ausente; 1= presente.

A exocitose epitelial e o infiltrado inflamatório subepitelial (IISE) localizado na lâmina própria foram avaliados subjetivamente com a concordância entre dois pesquisadores (CMBR e JJJ) de acordo com a intensidade, e foi considerado o aspecto mais proeminente no corte. Esses eventos foram classificados como: 0 = ausente, 1= leve (+), 2 = moderado (++), 3 = intenso (+++), e 4 = muito intenso (++++). O infiltrado inflamatório subepitelial também foi classificado como em 1= banda ou 2= disperso.

4.5.2- Análise da espessura do infiltrado inflamatório subepitelial em banda e da espessura epitelial

A análise morfométrica computadorizada foi realizada no Laboratório de Histologia da FOP-UNICAMP, para as tomadas das medidas de espessura de IISEB localizado na camada mucosa restrito à lâmina própria, e da espessura epitelial por meio da utilização de um sistema de análise de imagens composto por um microscópio Leica DMLP, uma câmera fotográfica Leica MPS 60 e uma placa de captura de imagens para transferência para uma CPU Leica DFC280. A mensuração em micrômetro (μm) foi realizada em aumento de 100x (Figura 2).



Figura 2 - Fotomicrografia com os traçados da espessura epitelial e da espessura do IISE em um fragmento de mucosa revestido por tecido epitelial estratificado pavimentoso. Nota-se tecido conjuntivo exibindo área de infiltrado inflamatório em banda que se estendia desde a lâmina própria até pouco acima do limite da submucosa (H&E, objetiva de 100x).

A espessura do infiltrado inflamatório subepitelial (IISE) foi definida como a área, rica em células inflamatórias que se estendia do ápice da papila conjuntiva até sua porção inferior na lâmina própria. Foi mensurada em três áreas de maior espessura, selecionadas subjetivamente, a partir das quais foi calculada a média de espessura do IISE.

A espessura epitelial foi medida de duas maneiras: na primeira, uma média de seis medidas, três maiores, representadas pela distância entre a superfície externa do epitélio até a ponta da crista epitelial, e três medidas menores, da distância entre a superfície do epitélio até a zona da membrana basal (ZMB) localizada entre duas projeções epiteliais. Essas medidas permitiram a verificação de qual LLO apresentava epitélio mais espesso ou mais delgado. Após a tomada

das medidas, todos os dados foram processados no programa Excel (Office 2007) para os cálculos das médias.

4.5.3 – Imuno-histoquímica

Com o objetivo de contagem das células presentes no IISE presente no LPO e na RLO-AD foram realizadas as colorações imuno-histoquímicas (IHQ) nos preparados histológicos com os anticorpos listados no quadro 5.

Para a realização das reações IHQ todos os blocos foram cortados na espessura de 3 µm e os fragmentos colocados sobre lâminas previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano (Sigma aldrich Chemical Company, EUA). Inicialmente os cortes foram desparafinizados com duas seqüências de xilol por 10 minutos cada em temperatura ambiente, hidratados em solução de concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 70% e 50%) e posteriormente foram lavados com água corrente e destilada. A atividade da peroxidase endógena foi inibida utilizando peróxido de hidrogênio a 10% em cinco incubações de cinco minutos cada, e posteriormente os cortes foram lavados com água corrente e destilada.

A recuperação antigênica foi realizada de acordo com os padrões descritos no quadro 5. Após resfriamento do líquido, os cortes foram lavados em água corrente e destilada, e colocados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 10mM (pH 7,0).

Quadro 5 – Células analisadas, anticorpos primários, clones, diluições, recuperação, tempo de incubação e fabricantes que foram utilizados no estudo imuno-histoquímico.

Células	Anticorpo primário	Clone	Diluição, recuperação e tempo de incubação	Fabricante
Linfócitos	CD-3	-	1:300, panela de pressão 3 min., overnight	Dako
	CD-8	C8/144B	1:100, panela de pressão 3 min., overnight	Dako
	CD-20	L26(1,2)	1:10000, panela de pressão 3 min., overnight	Dako
Plasmócitos	Plasma Cell	VS38c	1:400, panela a gás com ácido cítrico pH 6 por 3min.; overnight (16h na geladeira 4°C)	Dako
Mastócitos	Mast Cell CD-138	MY15	1:100, panela de pressão 3 min., overnight	Dako

Os cortes foram incubados com os anticorpos primários, de acordo com a sua especificação, e diluídos em albumina sérica bovina (BSA) a 1% e azida sódica (NaN₃) a 0,1% em PBS, em câmara úmida por 18 horas a 4°C. Após a incubação com os anticorpos primários, os cortes foram lavados em PBS (três trocas), e o anticorpo secundário conjugado à peroxidase foi adicionado (Strept AB Complex/HRP Duet, Dako, EUA, 1/500, específicos para a espécie animal em que foi produzido o anticorpo primário) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, os cortes foram novamente lavados em PBS (três trocas) e expostos ao sistema estreptavidina-biotina-peroxidase (Strept AB Complex/HRP Duet, Dako, 1:500) por mais 30 minutos a 37°C.

A revelação foi feita com 120 mg de substrato cromogênico 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma) misturado em 200 mL de PBS, 2 mL de peróxido de hidrogênio (20 volumes) e 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), e incubado em

câmara seca a 37°C durante cinco minutos. Terminada esta etapa, os cortes foram novamente lavados em água corrente e destilada e contra-coradas com Hematoxilina de Carrazi durante cinco minutos, desidratados com dois banhos em solução de etanol a 100%, diafanizados em xilol com duas trocas de 10 minutos cada, e as lâminas foram montadas em Bálsamo do Canadá. Preparados histológicos-controle foram utilizados em todas as reações.

As quantificações dos linfócitos T-CD3+, linfócitos T-CD8+, linfócitos B, plasmócitos e mastócitos, presentes no infiltrado inflamatório das 39 LLO clássicas, foram realizadas com microscópio de luz (Carl Zeiss), objetiva de 40x e ocular reticulada PK 8x (Reichert, Áustria) composta de 10 linhas paralelas e 100 pontos com extensão de 150µm e área de 22.500µm² (Figura 3).

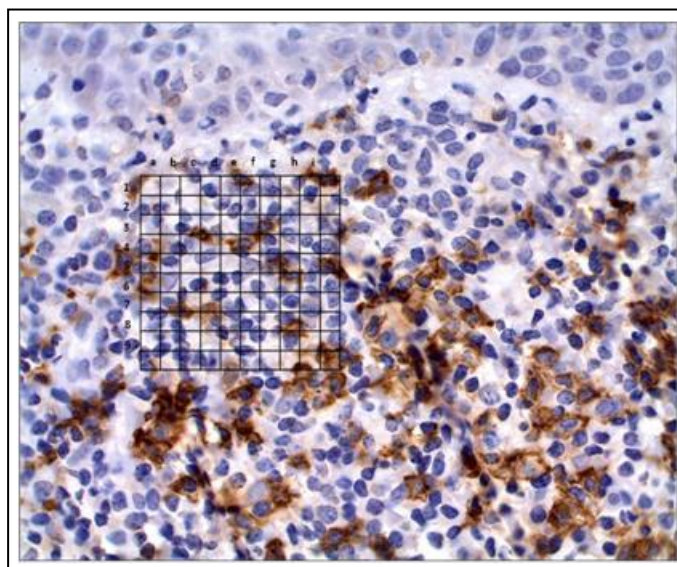


Figura 3 – Fotomicrografia esquemática do posicionamento da ocular micrométrica (modelo PK 8x, Reichert) na camada justaepitelial (lâmina própria) até a membrana basal (LPO, imuno-histoquímica CD3, 320x).

A contagem foi realizada no laboratório de Patologia Bucal da UNICAMP e obtida por meio da leitura de sete campos selecionados previamente e sequenciados e localizados na região subepitelial. A escolha da região foi determinada pela integridade estrutural do tecido e positividade mais evidente (Figura 4 a e b). As células positivas foram contadas, para cada um dos anticorpos, em todas as lâminas dos casos selecionados, e os resultados foram expressos em células positivas por área de um milímetro quadrado (1 mm^2).

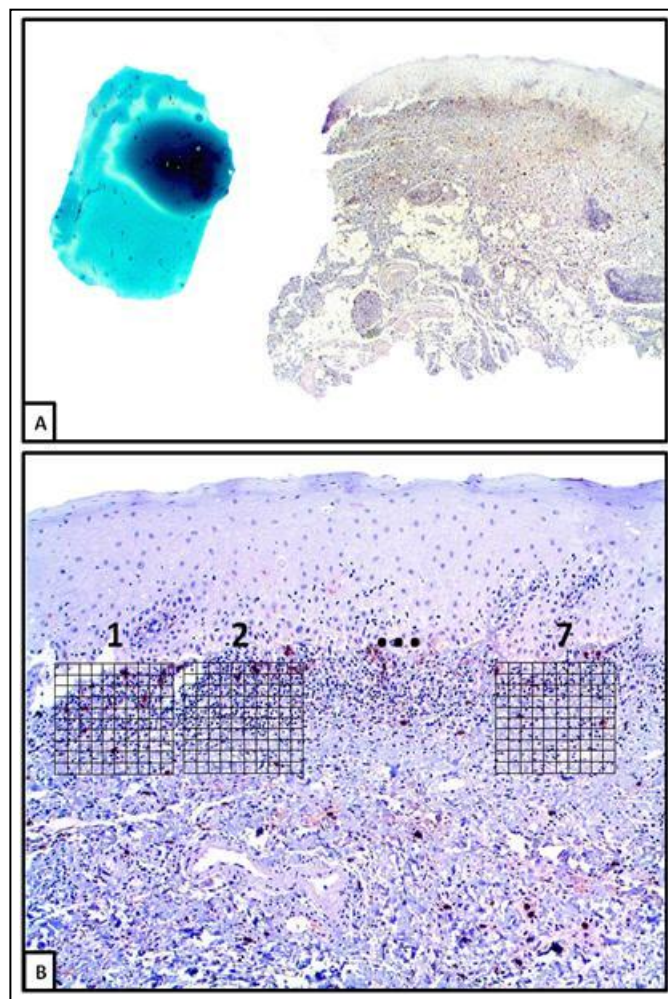


Figura 4 – Em A: Fotomicrografia esquemática da área selecionada para a análise, com um sinal indicativo do local da leitura. Em B: Fotomicrografia do posicionamento esquemático da gráticula proveniente da ocular e a sequência figurativa dos sete campos sequenciais selecionados (LPO, IHQ Plasma Cell; magnificação em A x25, em B x100).

Para a determinação do número médio das células marcadas positivamente/mm² foi utilizado o programa Excel (Office 2007) e, após o cálculo final da média de quantidade de células em um mm², as médias das quantidades das células imunomarcadas, em cada LLO, foram comparadas estatisticamente.

4.5.4 Análise da hipossalivação

Os valores de referência utilizados foram os seguintes: volume salivar de 1,0 a 3,0 mL/min. foi considerado fluxo normal; volume de 1,0 a 0,7/min. foi considerado fluxo baixo; e volume menor de 0,7 mL/min. foi considerado hipossalivação. Para a análise das variáveis de fluxo foram atribuídos os seguintes valores: fluxo de normal a baixo foi considerado sem hipossalivação e recebeu o valor 1; e aos pacientes com hipossalivação foi atribuído o valor 2.

4.5.5 Análises dos polimorfismos dos genes da resposta Th1 e Th2.

4.5.2.1 – Reação em cadeia da Polimerase (PCR) dos genes relacionados às respostas Th1 e Th2

As regiões de interesse dos genes IL1- β ^{+3953C/T(Taq I)}, TNF- α ^{-308G/A (Nco I)}, IL10^{-592A/C(Rsa I)} e IL 4^{-590C/T(Ava II)} foram amplificadas a partir de amostras de DNA genômico (grupo 3) e provenientes do material genético das células descamadas da MO (grupo 1) por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos (ou “*primers*”) foram conferidos quanto à sua especificidade, e comparados com todas as sequências já identificadas, presentes no “Gene Bank” (NCBI-National Center for Biotechnology Information- NIH, EUA- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). As sequências de oligonucleotídeos dos fragmentos dos genes a serem estudados e das enzimas de restrição utilizadas para a análise dos polimorfismos estão descritas no quadro 6.

As reações de amplificação por meio de PCR simples foram realizadas com uma mistura de reagentes e volume final de 30 µL, composta por 20 U/µL de *Taq polymerase* (Promega® Madison, WI, EUA), 200 µM dNTP, 0,5 µM de cada um dos oligonucleotídeos, e 1,5 mM MgCl⁺⁺ de tampão (Promega® Madison, WI, EUA). As amplificações começaram com um primeiro passo da desnaturação inicial de 5 minutos a 96°C; seguido de 35 ciclos, cada um consistindo de 30 segundos a 96°C, 35 segundos à temperatura de anelamento (*T anealing*) ideal do oligonucleotídeo padronizada por gradiente de temperaturas (Quadro 6) e 30 segundos a 72°C de extensão; e um passo de extensão final de 5 minutos a 72°C. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador (Perkin Elmer® Automate 2400 - Norwalk, CT).

Quadro 6 – Sequência dos oligonucleotídeos e indicativos da posição do SNP região amplificada.

Gene	SNP, <i>Primers</i> e Resíduo	<i>T anealing</i>	Referência
IL1-β	+3953C/T F: 5'-CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA-3' R: 5'-GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG-3' rs143634	65 °C	Cheng <i>et al.</i> ,2010
IL4	-590 CT F: 5'TAAACTTGGGAGAACATGGTC3' R: 5'TGGGAAAAGATAGAGTAATA3' rsrs2243250	55 °C	Bai <i>et al.</i> , 2007
IL10	-592A/C F: 5'GGTGAGCACTACCTGACTAGC3'; R: 5'CCTAGGTCACAGTGACGTGG3' rs1800872	59°C	Cheng <i>et al.</i> , 2010
TNF-α	-308 G/A F: 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3' R: 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' rs1800629	55 °C	Visentainer <i>et al.</i> , 2008; Xavier <i>et al.</i> , 2007

Legenda: SNP: *Single Nucleotide Polimorphism*; Fw: *forward*; R: *reverse*; rs: resíduo.

Após esta etapa, foram adicionados 2 µl de corante Azul de Bromofenol *Orange* ao volume do produto final obtido na reação de PCR e foi realizada a aplicação no gel de agarose a 2%, preparado com 2,0g de agarose pura e 100 mL de TrisBorato EDTA 1X (TBE - AmrescoTM Inc, Ohio, EUA) e 5 µl de Brometo de Etídio (Promega[®] Madison, WI, EUA). A corrida foi realizada em uma cuba eletroforética horizontal (Omniphor[®] Biosystems Comercial, Imp. e Exp. de equipamentos para Laboratórios Ltda.) contendo TBE 1% a 60 volts (V), com corrente de 80 mili-ampéres (mA) por 45 minutos (min.). Os fragmentos de DNA foram visualizados através de um transiluminador com luz Ultra-Violeta (UV) (Vilber Lourmat[®], France), no comprimento de onda de 302 nanômetros (nm) e as fotografias foram tomadas com o auxílio do sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat[®], France).

4.5.2.2 – Análise do polimorfismo por comprimento de fragmento de restrição (RFLP) dos genes relacionados às respostas Th1 e Th2

Para a identificação dos polimorfismos de único nucleotídeo foi utilizada a técnica de análise de polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP), técnica pela qual, os fragmentos amplificados são encubados para a digestão por enzimas que reconhecem os sítios de restrição formados pela presença da substituição de um par de bases na sequência do DNA, e posterior identificação dos alelos.

As condições fornecidas para a clivagem dos fragmentos (*amplicons*) foram realizadas conforme o descrito pelo fornecedor das enzimas de restrição, após o período de incubação de cada enzima (Quadro 7).

Quadro 7 – Enzimas de restrição utilizadas na RFLP e suas condições de clivagem.

GENE	Enzima e condições
IL1- β -3953C/T	Enzima: Taq I 6 μ L do produto da PCR, Buffer 4, BSA e H ₂ O Temperatura: 65°C <i>overnight</i>
IL4-590C/T	Enzima: AVAII 6 μ L do produto da PCR, Buffer 4 e H ₂ O Temperatura: 37°C <i>overnight</i>
TNF- α -308G/A	Enzima: NcoI 6 μ L do produto da PCR, Buffer 3 e H ₂ O Temperatura: 37°C <i>overnight</i>
IL10-592A/C	Enzima: Rsa I 4 μ L do produto da PCR, Buffer 4 e H ₂ O Temperatura: 37°C <i>overnight</i>

Foram adicionados 2 μ L de corante Azul de Bromofenol *Orange* ao volume do produto final obtido na reação de incubação e foi realizada a aplicação no gel de agarose a 3%. A corrida eletroforética foi realizada a 110 V, com corrente de 80 mA, durante 45 min. Os fragmentos de DNA clivados foram visualizados por meio de transiluminador com luz Ultra-Violeta (UV) (Vilber Lourmat®, France), no comprimento de onda de 302 nm e as fotografias foram tomadas com o auxílio do sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat®, France).

4.6 Aspectos éticos

Este projeto foi apresentado ao CEP da FOP-UNICAMP e foi aprovado sob o Protocolo: 011/2009 (entrada: 12/03/2009) (ANEXO). Todos os aspectos éticos especificamente determinados pelas diretrizes da Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, foram rigorosamente seguidos.

Os pacientes incluídos nesse estudo receberam as informações relacionadas aos objetivos da pesquisa, bem como sobre os métodos e procedimentos utilizados para o seu desenvolvimento. Os indivíduos foram devidamente esclarecidos quanto aos aspectos relacionados à pesquisa. Todos os voluntários consentiram previamente a sua inclusão no estudo, por meio de assinatura do TCLE (APÊNDICES A e B).

Para preservar a identidade do paciente, o formulário de coleta de dados não contemplou o nome ou o número do prontuário. Foi indicado um número de registro vinculado ao número do prontuário. A utilização desses últimos dados ocorreu nas situações em que houve a necessidade de checagem das informações para os exames laboratoriais.

4.7 Análises estatísticas

As informações obtidas foram utilizadas para a construção de banco e análise dos dados com o auxílio do programa SPSS versão 15.0. O nível de significância assumido foi de 5%. Para as análises descritivas, foram utilizadas as

tabelas de contingência. Para as análises estatísticas dos dados paramétricos com relação aos critérios clínicos, hipossalivação, histopatológicos, achados histológicos e achados imuno-histoquímicos, foi utilizado o teste exato de Fisher. Por fim, para as análises dos dados não paramétricos de mensuração do infiltrado inflamatório e espessura epitelial, foi utilizada a análise estatística pelo teste Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks.

A frequência alélica e genotípica foi determinada por contagem direta. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado com o cálculo das frequências esperadas de todos os genótipos e comparação com as frequências observadas. O teste de Chi-quadrado (X^2) foi utilizado para determinar o significado das diferenças entre esses valores. Foram considerados em equilíbrio valores de $p > 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados descritivos

Esse estudo compreendeu a análise de um total de 213 pacientes distribuídos nos grupos e subgrupos de estudos, como descrito no capítulo de material e métodos.

Um total de 74 voluntários compuseram o grupo 1. Desses, 52/74 (70,3%) eram pacientes do gênero feminino e 22/74 (29%) eram pacientes do gênero masculino e portanto, uma distribuição de acordo com o gênero de 3:1. A média de idade desse grupo foi de 53,3 anos (mínima: 28; máxima: 82; DP: 11,08). Após a análise clínico-patológica dos voluntários do grupo 1 de acordo com os critérios da OMS (2003) (CDx-LLO-OMS), foram selecionados 39 casos que serviram como “padrão diagnóstico” para compor os subgrupos 1.1, composto por 30 pacientes portadores de LPO; o subgrupo 1.2, composto por 9 pacientes portadores de RLO-AD; e o subgrupo 1.3, composto pelos 35 casos remanescentes que foram reavaliados após obtenção dos resultados das análises clínico-patológicas dos casos dos subgrupos 1.1 e 1.2.

De acordo com os dados da tabela 1, foi possível observar a ocorrência dos 30 casos de LPO (30/39; 77%) e 9 casos de RLO-AD (9/39; 23%). Dos trinta casos de LPO, dez ocorreram em pacientes do gênero masculino e vinte ocorreram em pacientes do gênero feminino. Dos nove casos de RLO-AD, foram observados dois casos em pacientes do gênero masculino e sete em pacientes do

gênero feminino. Após análise estatística, foi possível observar que as LLO afetaram mais pacientes do gênero feminino, numa proporção de 3:1. A média de idade do subgrupo 1.1, foi de 53,9 anos (mínima: 28; máxima: 82; DP: 10,82). A média de idade do subgrupo 1.2, foi de 50,4 anos (mínima: 34; máxima: 68; DP: 13,93).

Tabela 1 - Distribuição do gênero de acordo com a lesão.

Diagnóstico	Gênero		Total	Estatística
	Feminino	Masculino		
LPO	20	10	30	$X^2 = 2,26$ $p = 0,06$
RLO-AD	7	2	9	OR= 2,57
Total	27	12	39	IC= 0,739 - 8,839

Legenda: LPO= Líquen plano oral; RLO-AD= Reação liquenóide por amálgama dental;
 (*) – Nível de significância 5.0%;
 (1) – Valor de p utilizando o X^2 : Chi-quadrado;
 OR – Odds Ratio; IC – Intervalo de confiança.

Para compor o grupo-2, foram analisados os dados de 39 voluntários, pareados com os indivíduos dos subgrupos 1.1 e 1.2 em gênero e idade que variou de mais ou menos cinco anos, que eram saudáveis eleitos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão desse grupo. Para compor o grupo-3 foram selecionadas aleatoriamente cem amostras de DNA, provenientes do banco de controles caucasoides do Hemocentro da UNICAMP, sem distinção de gênero ou idade, que foram escolhidas de acordo com os critérios de inclusão e exclusão e que provenientes.

De acordo com os CDx-LLO-OMS clínicos foi possível observar que todas as lesões eram brancas e estriadas, associadas ou não à ulceração. Nos casos de LPO foram consideradas as lesões estriadas, brancas bilaterais e simétricas e sem causa aparente (Figura 5); e nos casos de RLO-AD, foram consideradas as lesões estriadas brancas, ulceradas ou não, em contato direto com restauração de amálgama (Figura 6). De acordo com os critérios histopatológicos dos CDx-LLO-OMS, foram observadas nos 39 casos analisados o infiltrado Inflamatório subepitelial em banda e a degeneração hidrópica da camada basal, assim como nenhum dos casos apresentou qualquer grau de displasia (Figuras 7 e 8).



Figura 5 - Fotografia clínica de um caso de LPO-c. Em A e B, lesões bilaterais de mucosa jugal; C e D lesões bilaterais em borda lateral de língua; em E lesões simétricas em dorso de língua; e em F lesões simétricas em vermelhão do lábio inferior.

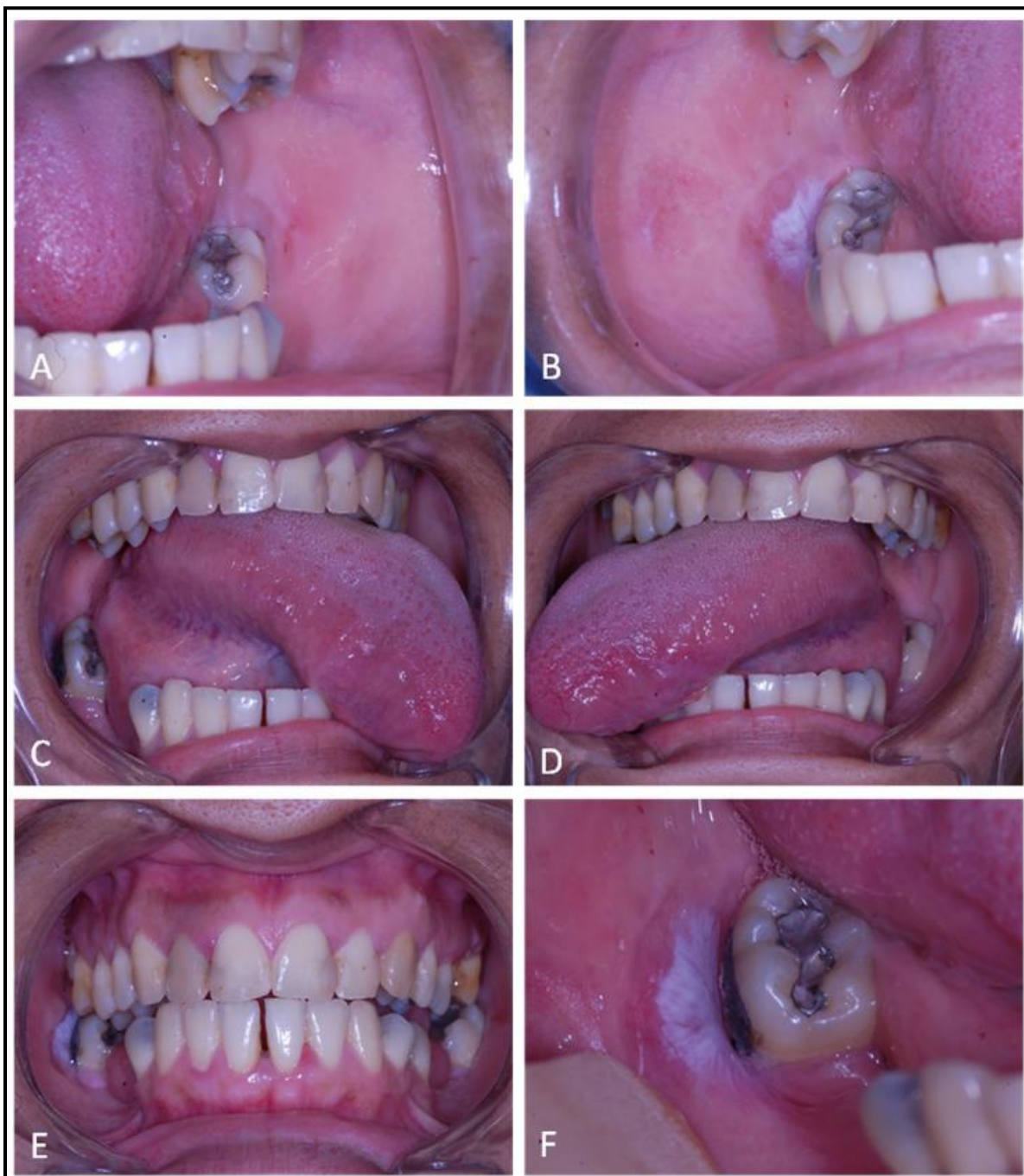


Figura 6 - Fotografia clínica de um caso de RLO-AD-c. Em A e B, ausência de lesões bilaterais de mucosa jugal; C e D ausência de lesões nas bordas laterais da língua; em E ausência de lesões simétricas em mucosa gengival; e em F lesão clássica em região de contato direto com o material restaurador de amálgama dental.

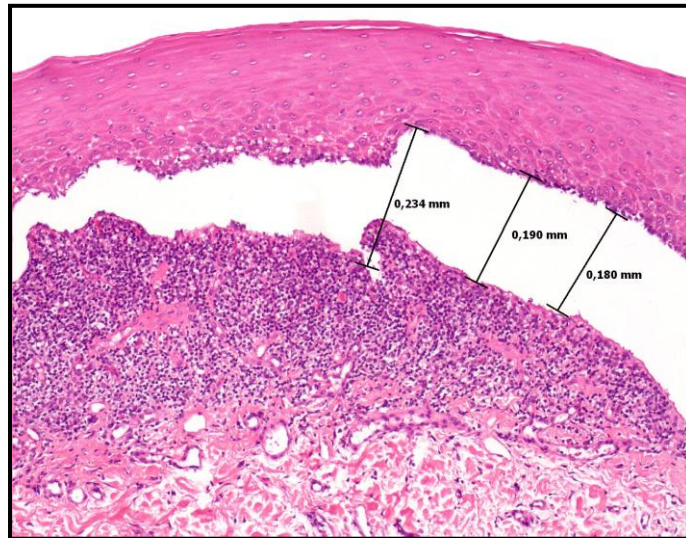


Figura 7 – Fotomicrografia de um caso de LPO composto por fragmento de mucosa revestida por tecido epitelial pavimentoso estratificado hiperparaqueratinizado. Além disso, é possível observar no tecido conjuntivo um infiltrado inflamatório intenso em banda justaepitelial e a presença de fenda subepitelial (fenda artefactual ou espaços de Max-Joseph), decorrente da degeneração liquefativa da camada basal. H&E, 50x.

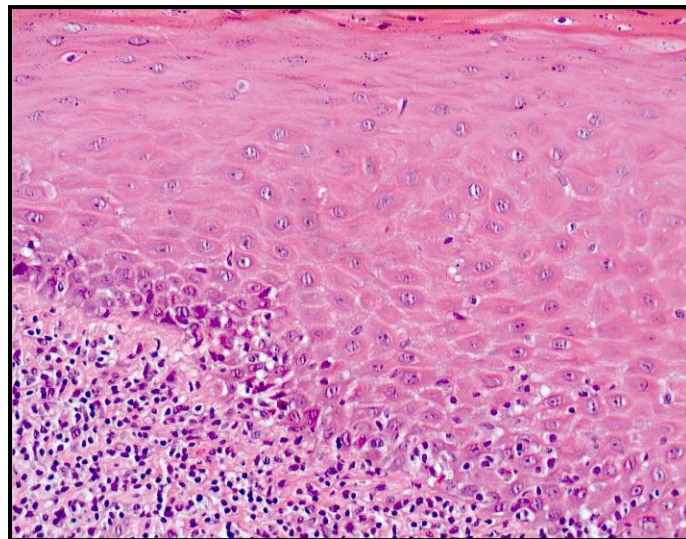


Figura 8 - Fotomicrografia de um caso de LPO composto por fragmento de mucosa revestida por tecido epitelial pavimentoso estratificado sem displasia. Neste corte é possível observar a degeneração hidrópica da camada basal e acantose, presença de ortoqueratina e proeminente exocitose. H&E, 200x.

Na análise do critério da “presença de lesões bilaterais” como critério diferenciador entre as LLO, foi possível observar que esse critério está fortemente associado ao LPO e quando da presença de lesões bilaterais, o diagnóstico final têm 10 vezes mais chances de ser LPO (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise do critério clínico da OMS “presença de lesões bilaterais”, estratificado pelo diagnóstico da lesão.

Critério Clínico: OMS Lesões Bilaterais	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO-c	RLO-AD-c				
Presente	5	3	11	10	1,853-53,97	p ⁽¹⁾ <0,004*
Ausente	25	6	28			
Total	30	9	39			

(*) – Nível de significância 5,0%.

(1) – Valor de p utilizando o Teste Exato de Fisher.

OR – Odds Ratio.

IC – Intervalo de confiança.

Sobre o critério da “presença de ulcerações” observado em 16 casos de LLO ulceradas. Desses, treze (n=13) pacientes tiveram diagnóstico de LPO e 3 tiveram diagnóstico de RLO-AD.

Nos critérios histopatológicos da OMS, verificou-se que as LLO possuem características histopatológicas semelhantes. Em nenhum dos casos de LPO ou RLO-AD foi observada a displasia epitelial, além de que o infiltrado inflamatório rico em plasmócitos em banda e a degeneração hidrópica da camada basal estava presente em 30 casos de LPO e 8 casos de RLO-AD.

5.2 Resultados das análises dos demais achados histopatológicos

Os demais achados histopatológicos foram analisados nos 39 casos selecionados de acordo com os CDx-LLO-OMS, e compreenderam os seguintes eventos: presença de hiperqueratose (hiperortoqueratose e hiperparaqueratose, simultaneamente ou não), acantose, atrofia epitelial, fenda subepitelial focal, projeção em dente de serra, derrame pigmentar, exocitose, presença de folículos linfóides, presença de corpos de Civatte e presença de infiltrado inflamatório perivascular profundo localizado nos vasos da submucosa (Figuras 9-13).

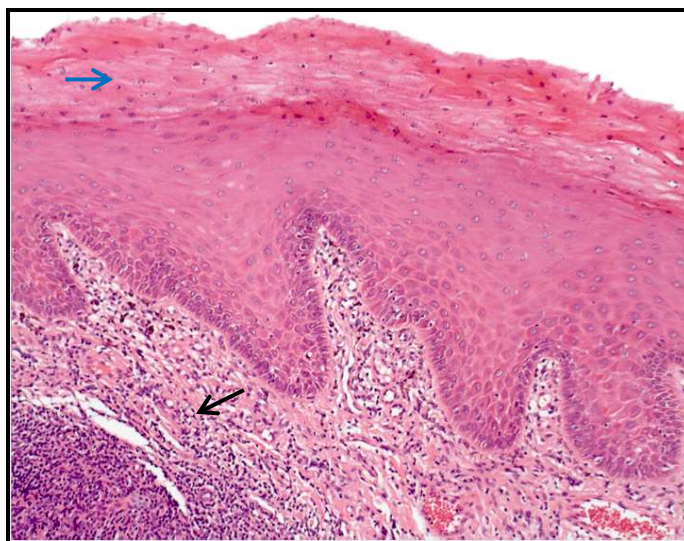


Figura 9 – Fotomicrografia de RLO-AD composta por fragmento de mucosa revestida por tecido epitelial pavimentoso estratificado hiperparaqueratinizado (seta azul). O tecido epitelial encontra-se acantótico e com projeções em dentes de serra. Além disso, é possível observar integridade da camada basal. No tecido conjuntivo um infiltrado inflamatório e a presença de agregados linfóides indicativos de formação de folículo linfoide (seta preta). (H&E, 200x).

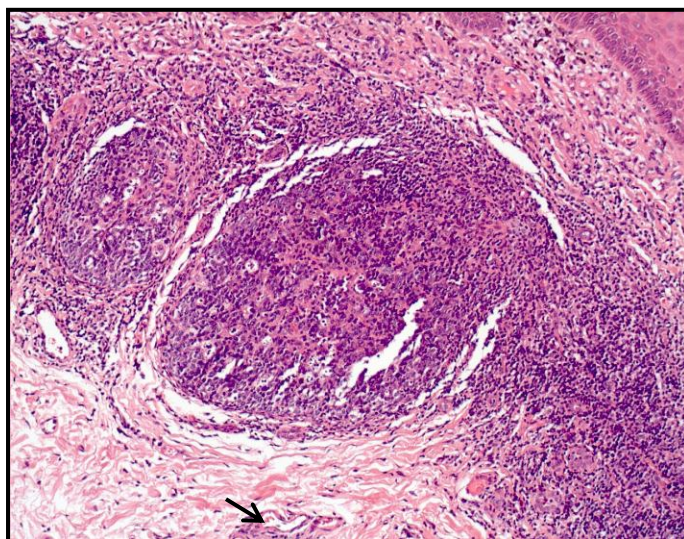


Figura 10 - Fotomicrografia em pormenor do folículo linfóide do caso de RLO-AD da figura 9. O infiltrado inflamatório perivascular profundo completava o quadro microscópico (seta). (H&E, 200x).

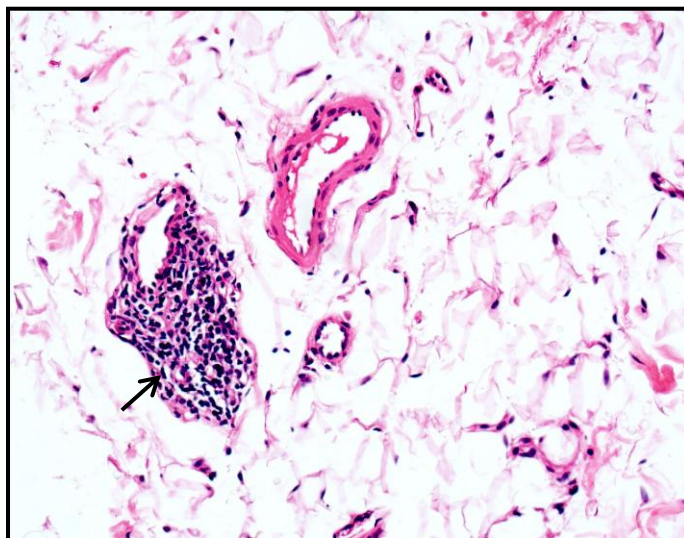


Figura 11 – Fotomicrografia em detalhe de um caso de RLO-AD composta por tecido conjuntivo profundo da submucosa com infiltrado inflamatório perivascular (seta). (H&E, 500x).

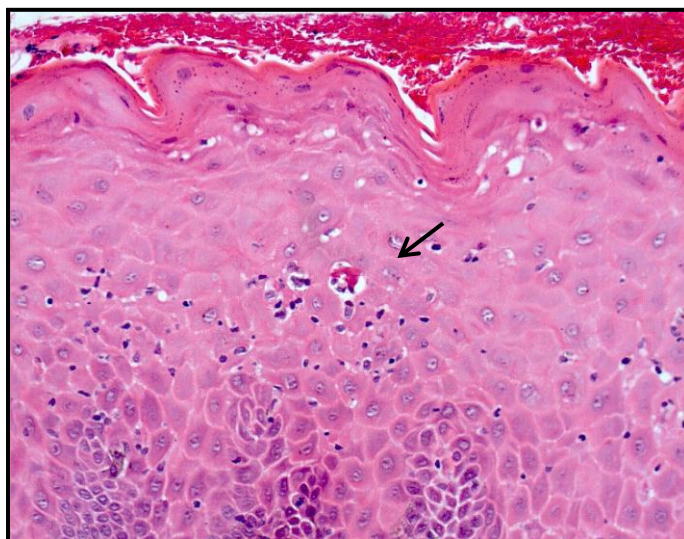


Figura 12 - Fotomicrografia de LPO composta por fragmento de mucosa revestido por tecido epitelial pavimentoso estratificado hiperparaqueratinizado. Neste corte é possível observar a presença de exocitose e um corpo apoptótico de Civatte (seta). (H&E, 200x).

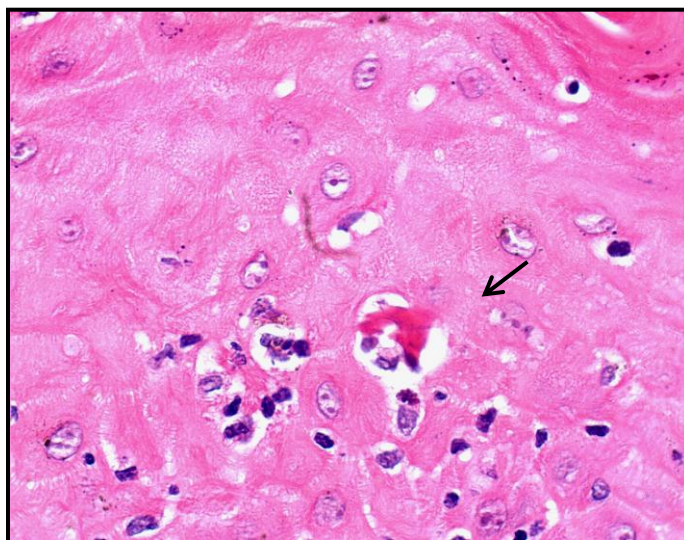


Figura 13 - Fotomicrografia em maior aumento do caso de LPO da figura 12, apresentando corpo apoptótico de Civatte (seta). (H&E, 500x).

Na análise da presença de acantose e atrofia, presentes simultaneamente ou não, foi possível observar 11/30 lesões de LPO apresentaram acantose e 12/30

lesões apresentaram atrofia; foi possível observar também que 5/9 casos de RLO-AD apresentaram acantose; e 4/9 apresentaram atrofia (tabela 2). Após a correlação clínico-patológica foi possível observar que a acantose associada à hiperorto ou hiper-paraqueratose foi freqüente nas LLO clinicamente mais espessas, ou seja, mais leucoplásicas. A exocitose foi observada nas LLO mais delgadas, e algumas vezes ulceradas e com sintomatologia dolorosa, porém esses dados não se constituíram como bons diferenciadores das duas LLO.

Os eventos analisados de fenda subepitelial, projeções em dentes de serra e o derrame pigmentar foram observados com frequências semelhantes em ambas as LLO. Pelos resultados expostos na tabela 3 foi possível observar que a presença dos folículos linfóides foi mais comum (com significância estatística) em RLO-AD que em LPO($p < 0,05$). Similarmente a esses dados, também foi possível diferenciar a lesão da RLO-AD do LPO pela presença de infiltrado perivascular profundo que apresentou maior incidência nos casos de RLO-AD ($p < 0,001$).

Tabela 3 - Presença de achados histopatológicos estratificados pelo diagnóstico da lesão.

	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-AD				
Hiperqueratose						
Presente	30	9	39			p ⁽¹⁾ <0,647*
Ausente	0	0	0			
Total	30	9	39			
Hiperortoqueratose e hiperparaqueratose	LPO	RLO-AD	Total	OR	IC (95%)	p-Valor
Presente	11	3	14	1,1	0,2291	p ⁽¹⁾
Presente	20	6	26		- 5,282	<0,999*
Total	31	9	40**		**Um caso de LPO apresentou hiperpara e hiperortoqueratose	
Acantose						
	LPO	RLO-AD	Total	OR	IC (95%)	p-Valor
Presente	11	4	15	0,723	0,1599	p ⁽¹⁾
Ausente	19	5	24		- 3,276	<0,481*
Total	30	9	39			
Atrofia epitelial						
	LPO	RLO-AD	Total	OR	IC (95%)	p-Valor
Presente	12	5	17	0,533	0,1185	p ⁽¹⁾
Ausente	18	4	22		- 2,4	<0,327*
Total	30	9	39			
Fenda subepitelial focal						
	LPO	RLO-AD	Total	OR	IC (95%)	p-Valor
Presente	21	6	27	1,167	0,237 -	p ⁽¹⁾
Ausente	9	3	12		5,725	<0,575*
Total	30	9	39			
Projeção em dente de serra						
	LPO	RLO-AD	Total	OR	IC (95%)	p-Valor
Presente	19	7	26	0,49	0,0868	p ⁽¹⁾
Ausente	11	2	13		- 2,806	<0,352*
Total	30	9	39			

Continuação da tabela 3:

Derrame pigmentar	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-AD				
Presente	19	6	25	0,86	0,1793 - 4,16	p ⁽¹⁾ <0,591*
Ausente	11	3	14			
Total	30	9	39			
Exocitose	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-AD				
Ausente	13	4	17	-	-	p ⁽²⁾ <0,6022
Presente leve	14	5	19			
Presente moderada	3	0	3			
Total	30	9	39			
Presença de folículo linfóide	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-AD				
Presente	3	4	7	0,13	0,0162 , 1,165	p ⁽¹⁾ <0,036
Ausente	27	5	32			
Total	30	9	39			
Infiltrado inflamatório perivascular profundo	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-AD				
Presente	3	7	10	0,31	0,0044 - 0,2283	p ⁽¹⁾ <0,0001
Ausente	27	2	29			
Total	30	9	39			
Corpo de Civatte	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-AD				
Presente	20	7	27	0,57	0,0999 - 3,272	p ⁽¹⁾ <0,424
Ausente	10	2	12			
Total	30	9	39			

(*) – Nível de significância 5,0%.

(1) – Valor de p utilizando o Teste Exato de Fisher.

(2) – Valor de p utilizando o Teste do X².

OR – Odds Ratio

IC – Intervalo de confiança.

5.3 Resultados das análises do infiltrado inflamatório subepitelial e da espessura epitelial

Na tabela 4 podem ser observadas as médias da espessura do infiltrado inflamatório subepitelial (IISE) localizado na lâmina própria, médias das áreas mais delgadas e médias das áreas mais espessas estratificadas pelo grupo de estudo de acordo com a presença de LPO ou RLO-AD-c.

A média da espessura do IISE para os 39 casos analisados foi 22,91 μ m (min.: 0,18; Max: 92,79; DP: 14,77). Similarmente aos resultados mostrados na tabela 4, foi possível observar que o IISE foi mais espesso nas lesões de RLO-AD (23,39 μ m) do que no LPO (18,98 μ m), entretanto após tratamento estatístico das médias morfométricas do IISE foi possível observar que essa medida não possibilitou diferenciar as LLO estudadas ($p>0,05$).

Na análise morfométrica da espessura epitelial, os casos de LPO apresentaram epitélio mais espesso, visto que as áreas mais espessas e as áreas mais delgadas apresentaram médias maiores. Por outro lado, os casos de RLO-AD apresentaram a espessura epitelial menor, visto que as áreas mais espessas e as áreas mais delgadas apresentaram médias menores. No entanto, as diferenças das médias de espessura epitelial do LPO e da RLO-AD não foram estatisticamente significantes ($p>0,05$).

Tabela 4 - Análises morfométricas das espessuras do infiltrado inflamatório, espessuras das áreas espessas e das áreas delgadas, estratificadas pelos grupos de estudos.

Espessura Analisada	Diagnóstico	N	Média do Rank (µm)	Sumário dos Ranks	p-Valor^(*)
Espessura do infiltrado inflamatório subepitelial em banda (µm)	LPO	30	18,98 ⁽¹⁾	569,50	p<0,309
	RLO-AD	9	23,39 ⁽¹⁾	210,50	
	Total	39			
Áreas espessas do epitélio (µm)	LPO	30	21,40 ⁽¹⁾	642,00	p<0,161
	RLO-AD	9	15,33 ⁽¹⁾	138,00	
	Total	39			
Áreas delgadas do epitélio (µm)	LPO	30	21,43 ⁽¹⁾	643,00	p<0,150
	RLO-AD	9	15,22 ⁽¹⁾	137,00	
	Total	39			

(*) – Nível de significância 5,0%.

(1) – As médias obtidas para cada variável foram submetidas à análise estatística pelo teste Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks.

5.4 Resultados das análises imuno-histoquímicas

Após a identificação das células imunomarcadas no IISE, a caracterização do infiltrado inflamatório foi realizada por meio da quantificação dos linfócitos T-CD3+ (Figura 15 a,b), T-CD8+ (Figura 16 a,b), Linfócitos B (Figura 17 a,b), plasmócitos (Figura 18 a,b) e mastócitos (Figura 19 a,b).

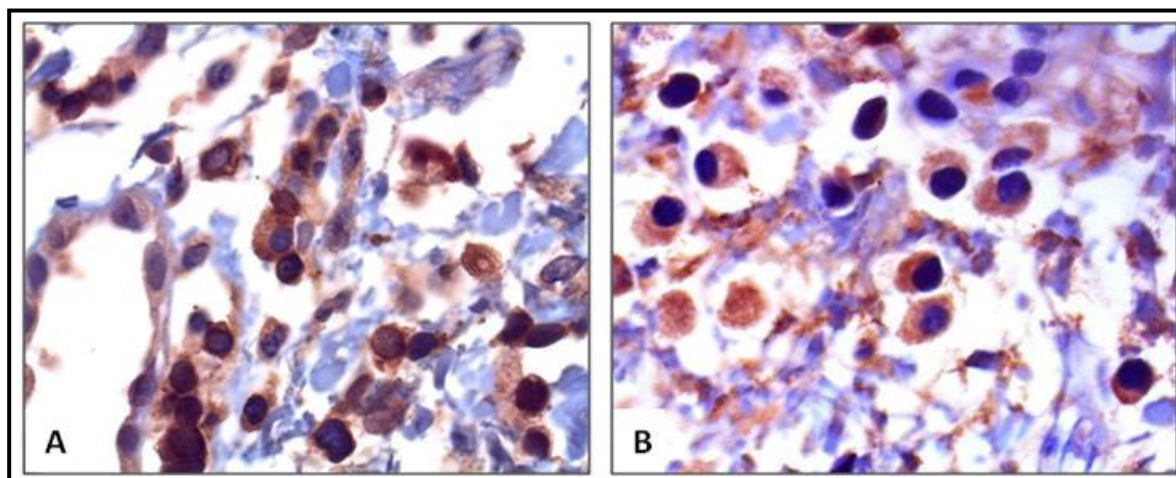


Figura 15 – Linfócitos T CD3+ localizados no IISE. Estas células apresentam aspecto ovóide e núcleo deslocado perifericamente, em A: na RLO-AD. B: LPO. (A e B: 1000x).

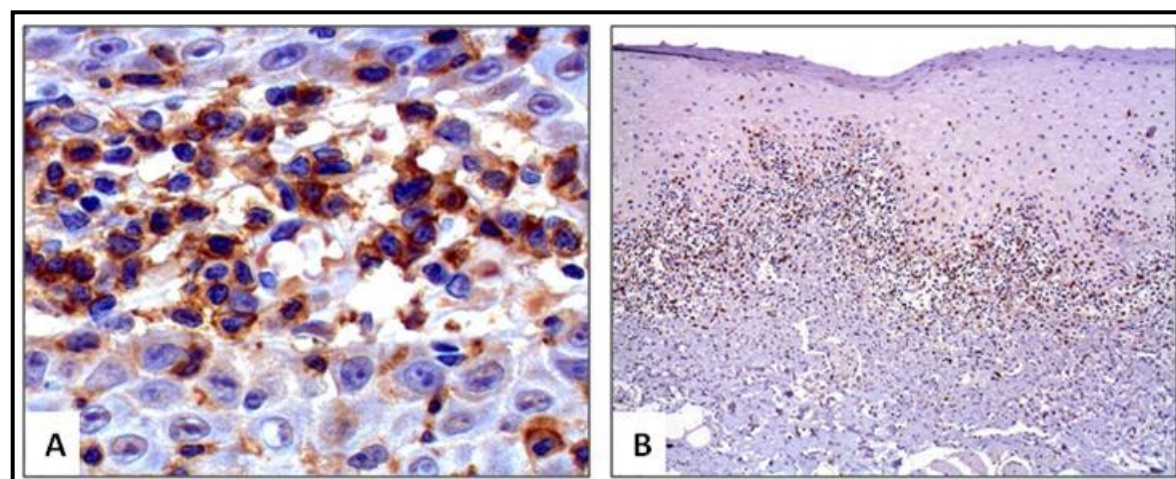


Figura 16 – Linfócitos T CD8+ localizados no IISE. Estas células apresentam aspecto circular. A: RL-AD-c. B: no LPO (A: 1000x, B: 100x).

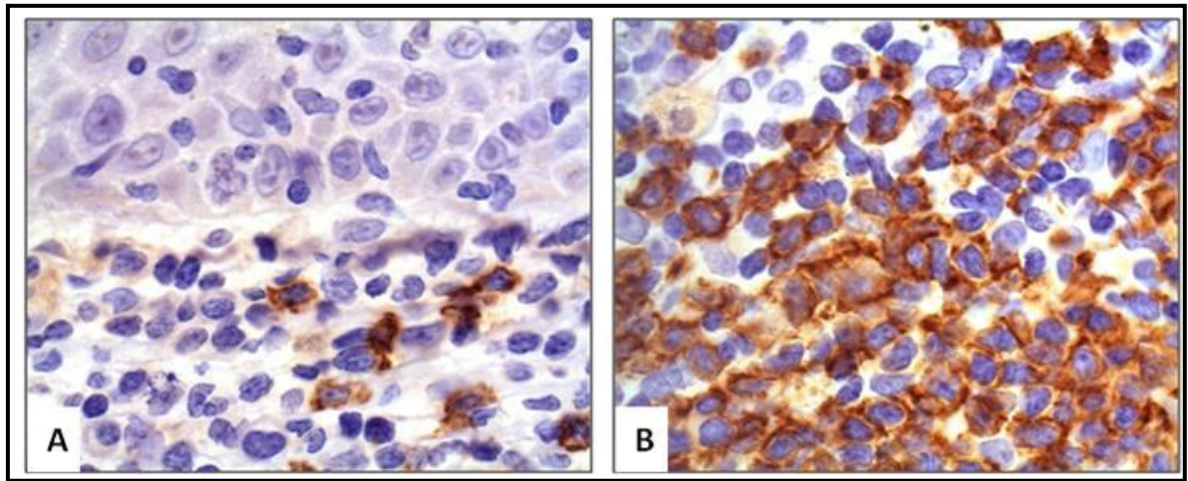


Figura 17 - Linfócitos CD20+ localizados no IISE. Estas células apresentam prolongamentos citoplasmáticos. A: na LPO e em B: no RLO-AD-c, porém em B nota-se maior marcação no tecido conjuntivo para as células indicando maior número linfócitos B no infiltrado inflamatório da RLO-AD (A e B: 1000x).

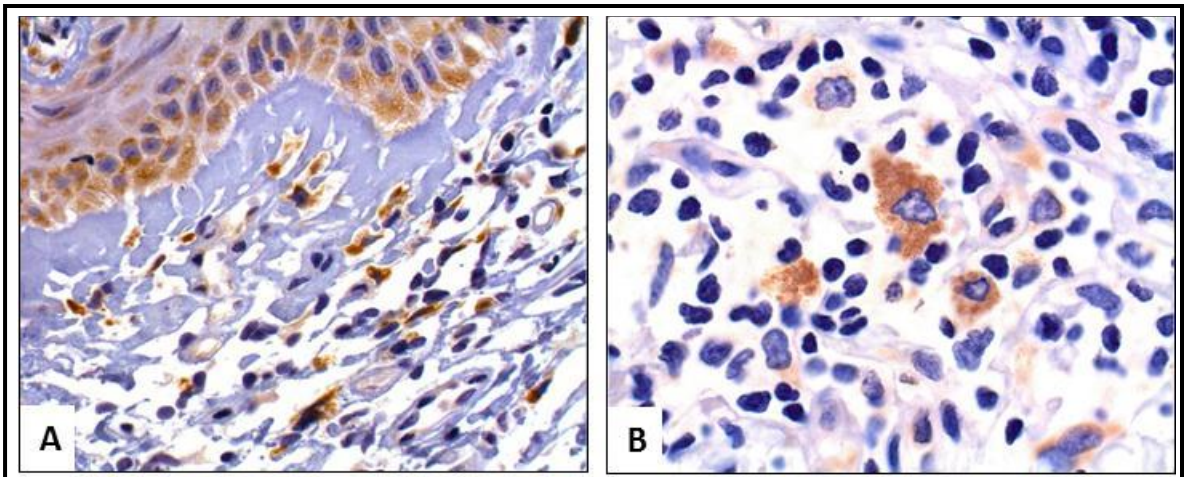


Figura 18 - Plasmócitos localizados no IISE. A: RLO-AD (500x). B: LPO (1000x).

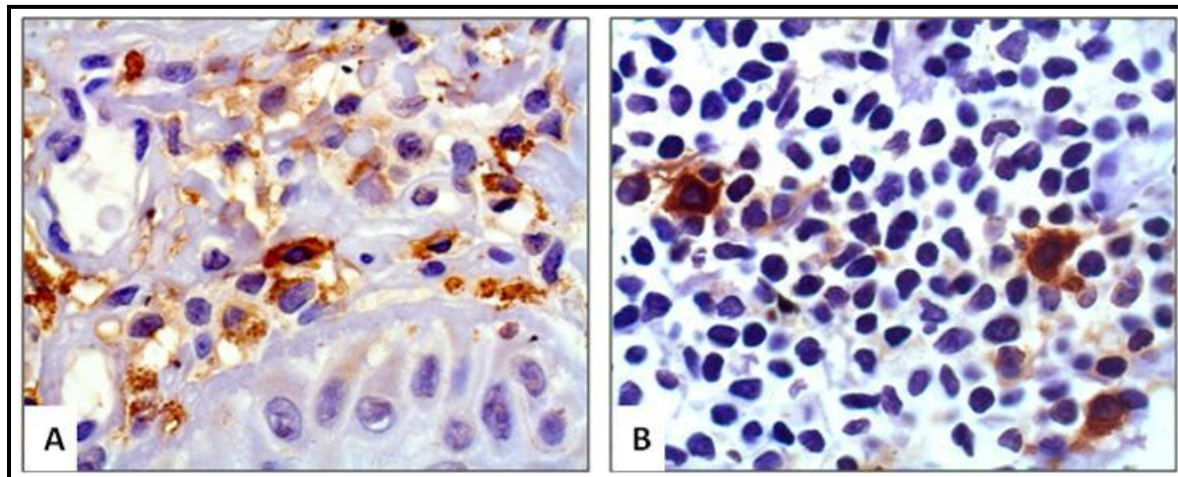


Figura 19 – Mastócitos localizados no IISE. Estas células apresentam prolongamentos citoplasmáticos. A: RLO-AD com citoplasma granuloso. B: no LPO citoplasma homogêneo (A e B: 1000x).

Após a análise morfométrica das células positivas imunomarcadas foi possível observar que as lesões de RLO-AD apresentaram uma maior quantidade de linfócitos B (LB), contados no infiltrado inflamatório subepitelial em 1mm^2 , do que o LPO-c, e, portanto, a quantificação dessas células pode ser uma boa ferramenta para diferenciar as duas LLO e também evidencia uma maior participação dessas células no infiltrado inflamatório da RLO-AD ($p < 0,05$). A quantidade de linfócitos T (T-CD3 e T-CD8), plasmócitos e mastócitos foi semelhante nas duas LLO ($p > 0,05$); portanto, após a análise quantitativa dessas células, não foi possível diferenciar o LPO da RLO-AD (tabela 5).

Tabela 5 - Resultados de acordo com as leituras morfométricas, estratificadas pelos marcadores imuno-histoquímicos.

Morfometria	Diagnóstico	N	Média (células/mm²)	Sumario dos Ranks	p-Valor^(*)
Linfócitos T- CD3+	LPO	30	19,18	575,50	p ⁽¹⁾ <0,414
	RLO-AD	9	22,72	204,50	
	Total	39			
Linfócitos T- CD8+	LPO	30	18,63	559,00	p ⁽¹⁾ <0,172
	RLO-AD	9	24,56	221,00	
	Total	39			
Linfócitos B	LPO	30	18,12	543,50	p ⁽¹⁾ <0,050
	RLO-AD	9	26,28	236,50	
	Total	39			
Plasmócitos	LPO	30	19,08	572,50	p ⁽¹⁾ <0,310
	RLO-AD	9	23,06	207,50	
	Total	39			
Mastócitos	LPO	30	20,28	608,50	p ⁽¹⁾ <0,775
	RLO-AD	9	19,06	171,50	
	Total	39			

(*) – Nível de significância 5,0%.

(1) – As médias obtidas para cada variável foram submetidas à análise estatística pelo teste Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks.

Na análise da distribuição dos resultados imuno-histoquímicos para o anticorpo CD20, foi possível observar que houve distribuição normal das células CD20+ nos casos de LLO, estratificada pelos tipo de lesão (Figura 20).

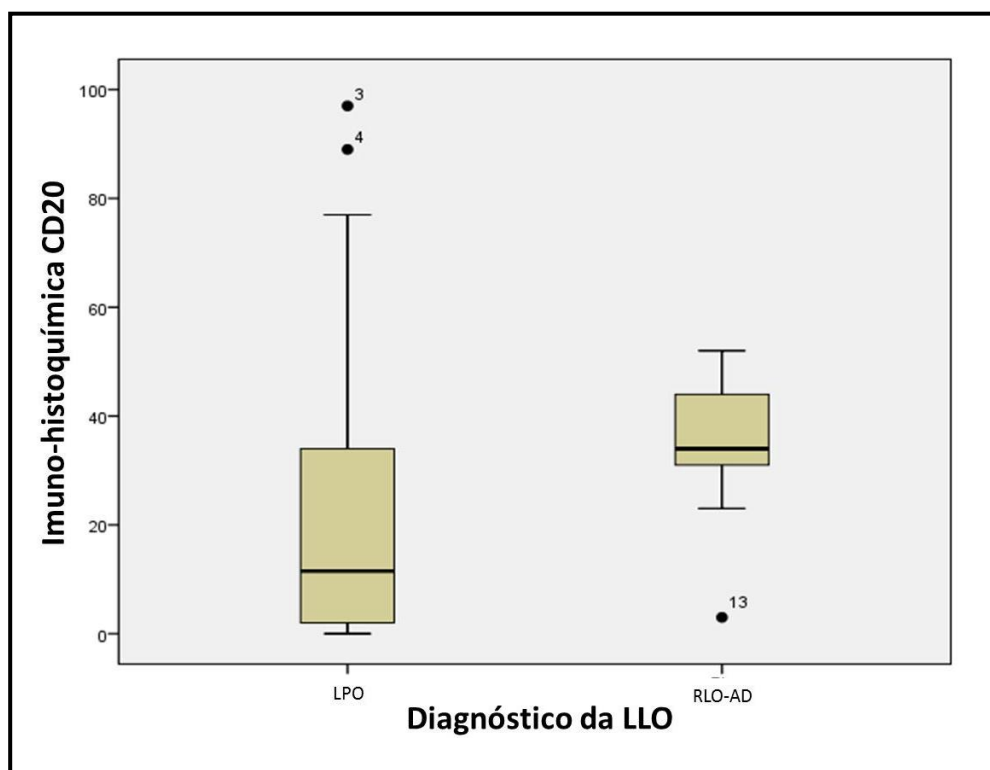


Figura 20 – Blox plot da a distribuição normal dos resultados da imuno-histoquímica do CD20 estratificada pela lesão.

5.5 Resultados da análise da hipossalivação

Após a seleção dos casos clássicos de LLO, foram selecionados 39 voluntários provenientes do grupo 2, para compor o grupo 2.2, os quais foram cuidadosamente pareados com os pacientes dos subgrupos 1.1 e 1.2 de acordo com gênero e idade, que variou em mais ou menos cinco anos.

Os resultados observados na tabela 6 evidenciaram que a hipossalivação foi fortemente associada à presença de LLO, visto que os portadores de LPO ou RLO-AD, apresentam mais chances de apresentar hipossalivação quando comparados com voluntários saudáveis.

Tabela 6 – Presença da hipossalivação, estratificado pelo grupo de estudos e grupo de controles para hipossalivação.

Hipossalivação	Diagnóstico		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	Com LLO	Sem doença				
Presente	34 (87,2%)	10 (25,7%)	44	19,72	6,046 – 64,32	p ⁽¹⁾ <0,001*
Ausente	5 (12,8%)	29 (74,3%)	34			
Total	39	39	78			

(*) – Nível de significância 5,0%.

(1) – Valor de p utilizando o Teste Exato de Fisher.

OR – Odds Ratio.

IC – Intervalo de confiança.

Na tabela 7 é possível observar que 34/39 (87,2%) dos pacientes portadores de LPO ou RLO-AD apresentaram hipossalivação. Contudo, quando os dados foram estratificados pelo diagnóstico da lesão, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Tabela 7 – Análise da hipossalivação estratificada pelo diagnóstico da lesão.

Presença de Hipossalivação	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-AD				
Presente	27	7	34	2,5	0,176 – 26,7	p ⁽¹⁾ < 0,64
Ausente	3	2	5			
Total	30	9	39			

(*) – Nível de significância 5,0%. (1) – Valor de p utilizando o Teste Exato de Fisher.

OR – Odds Ratio.

5.6 Frequência dos polimorfismos dos genes IL1- β , IL4, TNF- α e IL10 nos grupos 1 e 3 e sua correlação com a presença de LLO

5.6.1 Polimorfismo do gene IL1- β

Após a corrida eletroforética em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio (BE) a digestão da região de interesse do gene da IL1- β , o qual apresenta um sítio de restrição na sua região promotora na posição +3953, que foi clivado pela enzima Taq I, produziu dois fragmentos com 135pb e 114pb (alelo 1, +3953C) ou um único fragmento com 249pb (alelo 2, +3953T) (Figura 21).

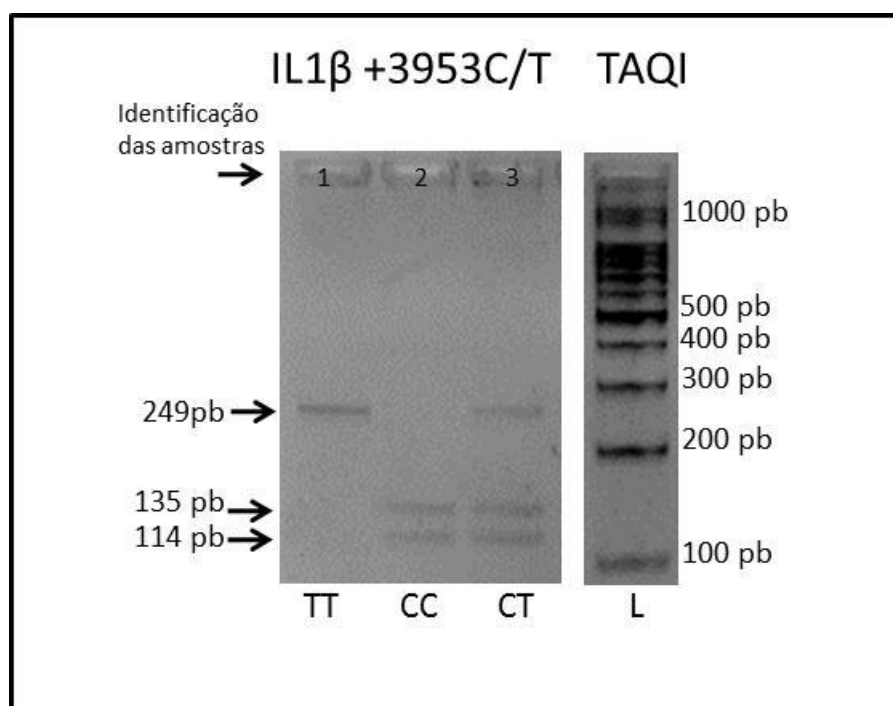


Figura 21 – Fotografia da digestão do gene IL1- β ^{+3953C/T}. Legenda: pb: pares de base, TT= homozigoto mutado, CC= homozigoto selvagem, CT=heterozigoto mutado, L= ladder.

A frequência genotípica e dos alelos do polimorfismo do gene IL1- β na posição +3953 dos 100 voluntários do grupo 3 estão demonstradas na tabela 10. Nossa população analisada apresentou frequência dos genótipos C/C, C/T e T/T de 62%, 31% e 7% para o polimorfismo IL1- β +3953, respectivamente. As frequências dos alelos +3953C e +3953T encontradas foram 0,775 e 0,225, respectivamente. Todas as frequências genotípicas dos genes IL1- β observadas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EH-W).

As frequências dos alelos e dos genótipos do gene IL1- β na posição +3953 dos pacientes do grupo de portadores de LPO ou RLO-AD podem ser visualizadas na tabela 11. O grupo 1 (portadores de LLO) apresentou frequência dos genótipos CC, CT e TT para o polimorfismo do gene IL1- β de 64,1% (25/39), 30,8% (12/39) e 5,1 (2/39) respectivamente, e as frequências dos alelos +3953C e +3953T encontradas foram 0,79 e 0,21 respectivamente. Não foram observadas diferenças na distribuição entre os genótipos observados e os genótipos esperados para os 3 diferentes polimorfismos do gene IL1- β , demonstrando que estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), como visto na Tabela 11. Esse resultado indicou que o grupo estudado é representativo da população permitindo de forma confiável a avaliação das frequências gênicas.

5.6.2 Polimorfismo do gene IL4

Após a incubação do gene da IL4, o qual apresenta um sítio de restrição na sua região promotora na posição -590, clivado pela enzima Avall, foi possível

observar a presença do alelo 1 (-590C), o qual produziu um fragmento de 254pb, e a presença do alelo 2 (-590T), o qual produziu dois fragmentos, um de 184pb e outro de 114pb (Figura 22).

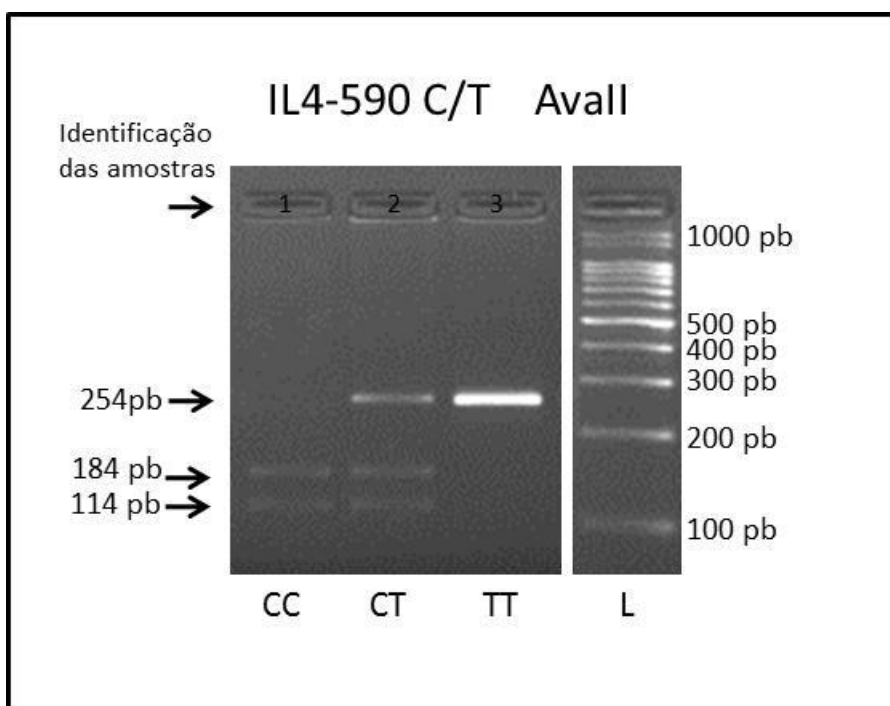


Figura 22 – Fotografia da digestão do gene IL4 -590 C/T. Legenda: pb: pares de base, TT= homozigoto mutado, CC= homozigoto selvagem, CT=heterozigoto mutado, L= ladder.

As frequências dos alelos e dos genótipos do gene IL4 na posição -590 dos 100 voluntários do grupo 3 estão demonstradas na tabela 10. Esse apresentou frequências dos genótipos CC, CT e TT para o polimorfismo do gene IL4 -590 de 1 (1%), 76 (76%) e 23 (23%), respectivamente. As frequências dos alelos -590C e -590T encontradas foram 0,39 e 0,61, respectivamente. As frequências alélicas e genotípicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinber (EHW).

Similarmente, as frequências dos alelos e dos genótipos do gene IL4 na posição -590 dos indivíduos do grupo de pacientes portadores de LLO podem ser visualizadas na tabela 11. O grupo estudado apresentou uma frequência dos genótipos CC, CT e TT para o polimorfismo do gene IL4 -590 de 15,4% (6/39), 64,1% (25/39) e 20,5% (8/39) respectivamente, e as frequências dos alelos -590C e -590T encontradas foram 0,4745 e 0,5235, respectivamente.

5.6.3 Polimorfismo do gene TNF- α

Os resultados da incubação do fragmento de 107 pares de base amplificado do gene TNF- α , o qual incorpora um sítio de restrição da enzima NcoI situado na posição -308 da sua região promotora, demonstraram dois alelos possíveis, o alelo 1 (TNF-308G) composto por dois fragmentos de 87bp e 20bp, e o alelo 2 (TNF-308A) composto por fragmento único de 107bp (Figura 23).

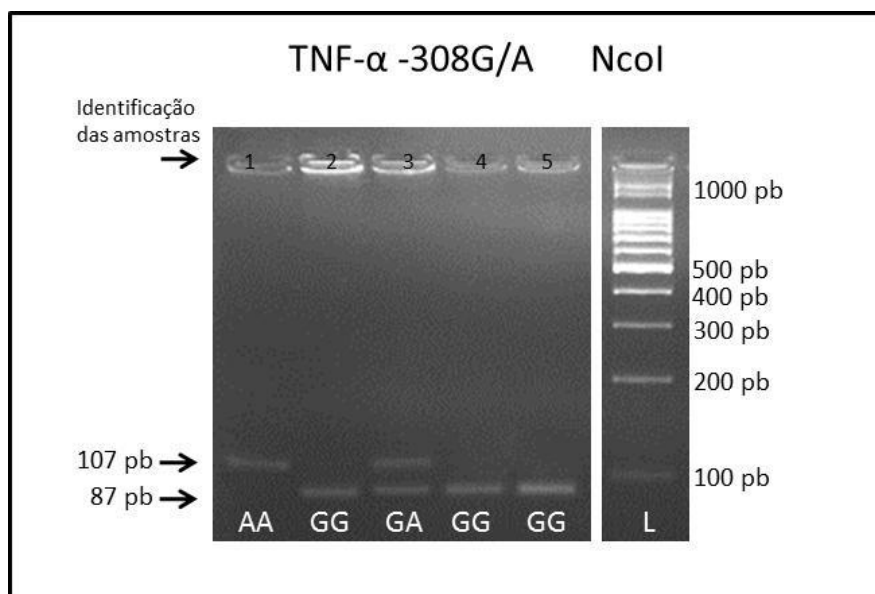


Figura 23 – Fotografia da digestão do gene TNF- α -308 G/A. Legenda: pb: pares de base, AA= homozigoto mutado, GG= homozigoto selvagem, AG=heterozigoto mutado, L= ladder.

A frequência dos genótipos do polimorfismo TNF-308 dos 100 controles do grupo 3 foi GG 66%, GA 27% e AA 7% e estão demonstradas na tabela 10. As frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos TNF-308G/A observadas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Similarmente, as frequências dos alelos e dos genótipos do gene TNF- α na posição -308 no grupo de pacientes portadores de LLO podem ser visualizadas na tabela 11. O grupo de pacientes com LLO apresentou frequência dos genótipos GG, GA e AA de 38,5% (15/39), 46,2% (18/39) e 15,2% (6/39) respectivamente, e as frequências dos alelos -308G e -308A encontradas foram 0,616 e 0,384.

5.6.4 Polimorfismo do gene IL10

Após a amplificação gênica da IL10 e incubação do fragmento, que incorpora um sítio de restrição da enzima RsaI situado na posição -592 da região promotora do gene IL10, na corrida eletroforética foi possível observar que a presença do alelo 1 (-592A) produziu dois fragmentos, um de 236pb e outro de 175pb, e a presença do alelo 2 (-592C) produziu um único fragmento de 412pb (Figura 24).

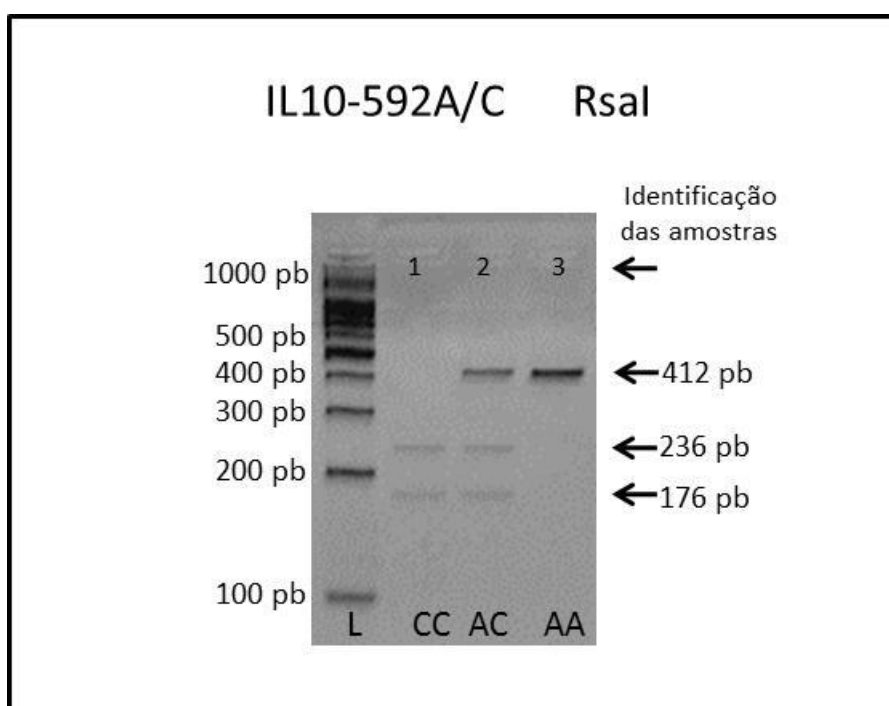


Figura 24 – Fotografia da digestão do gene IL10 -592 A/C. Legenda: pb: pares de base, CC= homozigoto mutado, AA= homozigoto selvagem, AC=heterozigoto mutado, L= ladder.

As frequências dos alelos e dos genótipos do gene IL10 na posição -592 dos 100 doadores estudados estão demonstradas na tabela 8. O grupo 3

apresentou frequência dos genótipos AA, AC e CC para o polimorfismo do gene IL10 -592 de 1 (1%) 76 (76%) 23 (23%) respectivamente, e as frequências dos alelos -590C e -590T encontradas foram 0,64 e 0,27. As frequências alélicas e genotípicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

As frequências dos alelos e dos genótipos do gene IL10 na posição -592 podem ser visualizadas na tabela 9. O grupo estudado apresentou uma frequência dos genótipos AA, AC e CC para o polimorfismo do gene IL10 -592 de 38 (38%), 52 (52%), 10 (10%) respectivamente, e as frequências dos alelos -592A e -592C encontradas foram 0,205 e 0,795, respectivamente.

Tabela 8 – Frequência genotípica dos polimorfismos gênicos IL1- β +3953C/T, -IL4 -590C/T, TNF- α -308G/A e IL10 -592A/C na população controle constituída por doadores voluntários de sangue da região de Campinas (sudeste do Estado de São Paulo) (GRUPO CONTROLE CAUCASÓIDE). Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg da frequência gênica usando teste Chi-quadrado: DF=1, se $p > 0,05$ está em EH-W.

Polimorfismos	Número observado (%)	Número esperado
Polimorfismo IL1-β +3953 C/T* N=100		
1.1 (CC)	62 (62,0%)	60,0625
1.2 (CT)	31 (31,0%)	34,8750
2.2 (TT)	07 (7,0%)	5,0625
Alelo 1 (C)	0,7750	$\chi^2=1,2345$
Alelo 2 (T)	0,2250	DF=1, $p > 0,05$
Polimorfismo IL4 -590 C/T N=100		
1.1 (CC)	1 (1%)	0,025
1.2 (CT)	76 (76%)	77,95
2.2 (TT)	23 (23%)	22,05
Alelo 1 (C)	0,39	$X^2 = 0.9722$
Alelo 2 (T)	0,61	DF= 1, $p > 0,05$
Polimorfismo TNF-α -308 G/A* N=100		
1.1 (GG)	66 (66,0%)	63,2025
1.2 (GA)	27 (27,0%)	32,5949
2.2 (AA)	07 (7,0%)	4,2024
Alelo 1 (G)	0,7950	$\chi^2=2,9464$
Alelo 2 (A)	0,2049	DF=1, $p > 0,05$
Polimorfismo IL10 -592 A/C N=100		
1.1 (AA)	38 (38%)	36,4
1.2 (AC)	52 (52%)	55,2
2.2 (CC)	10 (10%)	8,4
Alelo 1 (A)	0,64	$X^2 = 0,2691$
Alelo 2 (C)	0,27	DF= 1, $p > 0,05$

*Fonte: Carvalho, 2005. DF: Degree of Freedom. X^2 : Chi-quadrado.

Tabela 9 – Frequência genotípica dos polimorfismos gênicos IL1- β +3953 C/T, IL4 -590 C/T, TNF- α -308 G/A e IL10 -592 A/C nos pacientes portadores de LLO (n=39). Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg da frequência gênica usando teste Chi-quadrado: se $p < 0,05$ não está em EHW.

Genótipos	Número observado % (n/N)
Polimorfismo IL1-β +3953 C/T	
1.1 (CC)	64,1% (25/39)
1.2 (CT)	30,8% (12/39)
2.2 (TT)	5,1 (2/39)
Alelo 1 (C)	0,79
Alelo 2 (T)	0,21
Polimorfismo IL1-4 -590 C/T	
1.1 (CC)	15,4% (6/39)
1.2 (CT)	64,1% (25/39)
2.2 (TT)	20,5% (8/39)
Alelo 1 (C)	0,4745
Alelo 2 (T)	0,5235
Polimorfismo TNF-α -308 G/A	
1.1 (GG)	38,5% (15/39)
1.2 (GA)	46,2% (18/39)
2.2 (AA)	15,3% (6/39)
Alelo 1 (G)	0,616
Alelo 2 (A)	0,384
Polimorfismo IL10 -592 A/C	
1.1 (AA)	5,1% (2/39)
1.2 (AC)	30,8% (12/39)
2.2 (CC)	64,1% (25/39)
Alelo 1 (A)	0,205
Alelo 2 (C)	0,795

5.6.5 Frequências dos genótipos nos grupos analisados correlacionados com a presença de LLO

Os resultados descritivos das frequências dos diferentes genótipos estudados e a presença de lesão estão demonstrados na Tabela 10. Os pacientes foram classificados nos fenótipos preditores de baixa e alta produção de interleucinas, de acordo com seus genótipos, com base em dados da literatura.

Tabela 10 - Frequências de genótipos da população estudo estratificadas pela presença ou ausência de lesão.

Genótipo <i>Polimorfismo IL1-β+ 3953C/T</i>	Sem lesão	Com lesão Diagnóstico da lesão		Total
	Controles Caucasóides	LPO	RLO-AD	
CC	53	19	6	78
CT	40	10	2	52
TT	7	1	1	9
Total	100	30	9	139
Fenótipo				
CC – baixo produtor	53\	19	6	78
CT + TT – alto produtor	47	11	3	61

Genótipo <i>Polimorfismo IL4-590 C/T</i>	Sem lesão	Com lesão Diagnóstico da lesão		Total
	Controles Caucasóides	LPO	RLO-AD	
CC	1	6	0	7
CT	76	16	9	101
TT	23	8	0	31
Total	100	30	9	139
Fenótipo				
CC – baixo produtor	1	6	0	7
CT + TT – alto produtor	123	38	9	170

Continuação da Tabela 10:

Genótipo <i>Polimorfismo TNF-α -308 G/A</i>	Sem lesão	Com lesão Diagnóstico da lesão		Total
	Controles Caucasóides	LPO	RLO-AD	
GG	58	11	4	73
GA	30	13	5	48
AA	12	6	0	18
Total	100	30	9	139
Fenótipo				
GG – baixo produtor	58	11	4	73
GA + AA – alto produtor	42	19	5	66

Genótipo <i>Polimorfismo IL10 -592 A/C</i>	Sem lesão	Com lesão Diagnóstico da lesão		Total
	Controles Caucasóides	LPO	RLO-AD	
AA	39	1	1	41
AC	12	8	4	24
CC	49	21	4	74
Total	100	30	9	139
Fenótipo				
AA – baixo produtor	39	1	1	41
AC + CC – alto produtor	61	29	8	98

O genótipo IL1- β +3953TT associado com alta secreção de IL1- β foi encontrado um único caso expressando esse genótipo no grupo de pacientes portadores de LPO e um único caso no grupo de pacientes portadores de RLO-AD-c. Após serem agrupados os genótipos IL1- β +3953TT e IL1- β +3953 CT, por estarem associados com maior secreção de IL1- β , não foi observada presença significativa desses dois genótipos no grupo de pacientes que desenvolveu lesões liquenóides. Ou seja, de 39 pacientes analisados, 14 pacientes que expressaram os genótipos IL1- β +3953TT e IL1- β +3953CT apresentaram lesão liquenóide, seja ela LPO ou RLO-AD (X^2 =0,1721, DF= 2; p=0,9175; Tabela 11).

O genótipo IL4 -590TT associado com alta secreção de IL4 é similarmente muito raro na população da região de Campinas (sudoeste do Brasil) e em nosso grupo de pacientes foram encontrados oito casos expressando esse genótipo no grupo de pacientes portadores de LPO e nenhum caso no grupo de pacientes portadores de RLO-AD-c. Após serem agrupados os genótipos IL4 -590CT e IL4 -590TT, por estarem associados com maior secreção de IL4, foi observada presença significativa desses dois genótipos no grupo de pacientes que desenvolveu lesões liquenóides. Ou seja, de 39 pacientes analisados, 33 pacientes que expressaram os genótipos IL4 -590CT e IL4 -590TT apresentaram lesão liquenóide oral, seja ela LPO ou RLO-AD, embora a chance de possuir o gene mutado seja baixa (p= 0.002; OR= 0,05; IC=0.0011-0,4945; Tabela 11).

O genótipo TNF- α -308AA associado com alta secreção de TNF- α foi observado em 12 pacientes do grupo de controles, seis portadores de LPO e nenhum caso no grupo de portadores de RLO-AD. Após serem agrupados os

genótipos -308GA e -308AA, por estarem associados com maior secreção de TNF- α , foi possível observar presença significativa destes dois genótipos no grupo de pacientes que desenvolveu lesões liquenóides. Ou seja, de 39 pacientes analisados, 24 pacientes expressando os genótipos TNF- α -308GA e TNF- α -308AA apresentaram LLO, seja ela LPO ou RLO-AD, esses dados apontam ainda que aqueles pacientes com o gene mutado apresentam 3,1 mais chances de possuírem LLO ($p= 0,002909$; OR= 3,106; IC= 1,351, 7,221; Tabela 11).

O genótipo IL10 -592CC associado com alta secreção de IL10 foi encontrado em 49 pacientes do grupo controle; 21 casos expressando esse genótipo no grupo de pacientes portadores de LPO e quatro casos no grupo de pacientes portadores de RLO-AD. Após serem agrupados os genótipos IL10 -592AC e IL10 -592CC, por estarem associados com maior secreção de IL10, foi possível observar presença significativa desses dois genótipos no grupo de pacientes que desenvolveu LLO. Ou seja, de 39 pacientes analisados, 37 pacientes que expressaram os genótipos IL10 -592AC e IL10 -592CC apresentaram LLO, seja ela LPO ou RLO-AD. Esses resultados mostram ainda que pacientes com o gene mutado da IL10 na posição -592 têm 11,3 vezes mais chances de serem portadores de LLO ($p= 0,00003$; OR=11,34; IC= 2,625, 101,3; Tabela 11).

Tabela 11 - Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos gênicos IL1- β +3953 C/T, IL4 -590 C/T, TNF- α -308 G/A e IL10 -592 A/C população estudada comparando-se com indivíduos saudáveis (n=100) e estratificada pelo diagnóstico de LL (n=39).

Polimorfismo Genes	Genótipo	Fenótipo provável associado	População saudável N (%)	Indivíduos com LLO N (%)	Teste estatístico
IL1-β+3953 C/T	CC		62 (62,0)	25 (64,1)	$X^2=0,1721$
	CT		31 (31,0)	12 (30,7)	DF= 2
	TT		07 (7,0)	2 (5,2)	$p^{(2)}=0,9175$
	CC	Baixo produtor	62 (62,0)	25 (64,1)	$p^{(1)}= 0,4889$ OR=0,9137 IC= 0,3886-2,094
	CT + TT	Alto produtor	38 (38,0)	14 (35,9)	
IL4-590 C/T	CC		1(1,0)	6 (15,3)	$X^2= 12,15$
	CT		76 (76,0)	25 (64,1)	DF= 2
	TT		23 (23)	8 (20,6)	$p^{(2)}= 0,0022$
	CC	Baixo produtor	1 (1,0)	6 (15,3)	$p^{(1)}= 0,002$ OR= 0,05 IC=0,0011-0,4945
	CT + TT	Alto produtor	99 (99,0)	33 (84,7)	

Continuação da tabela 11:

TNF-α-308 G/A	GG		66 (66,0)	15 (38,4)	$\chi^2 = 8,94$
	GA		27 (27,0)	18 (46,3)	DF= 2
	AA		07 (7,0)	6 (15,3)	$p^{(2)} = 0,0114$
	GG	Baixo produtor	66 (66,0)	15 (38,4)	$p^{(1)} = 0,002909$ OR= 3,106 IC= 1,351-7,221
	GA + AA	Alto produtor	34 (34,0)	24 (61,6)	
IL10-592 A/C	AA		38 (38,0)	2 (5,2)	$\chi^2 = 45,9$
	AC		52 (52,0)	12 (30,7)	DF= 2
	CC		10 (10,0)	25 (64,1)	$p^{(2)} < 0,0001$
	AA	Baixo produtor	38 (38,0)	2 (5,2)	$p^{(1)} = 0,00003$ OR=11,34 IC= 2,625, 101,3
	AC + CC	Alto produtor	62 (62,0)	37 (94,8)	

(*) – Nível de significância 5,0% .

(1) – Valor de p utilizando o Teste Exato de Fisher.

(2) – Valor de p utilizando o Teste do χ^2 .

OR – Odds Ratio.

IC – Intervalo de confiança.

Na tabela 12, estão apresentados os resultados dos polimorfismos analisados dos genes IL1- β , comparados com o grupo controle e estratificados pelo tipo de lesão, não houve diferenças significantes como fatores de influência no desenvolvimento do LPO ($p > 0,05$). Os resultados dos polimorfismos analisados dos genes IL4, comparados com a população saudável e estratificados pelo tipo de lesão apresentaram diferenças significantes como fatores de influência no desenvolvimento do LPO ($p < 0,03$). Similarmente, os resultados dos polimorfismos

TNF- α e IL10 também foram associados à presença do LPO quando comparados com pacientes saudáveis (TNF- α : $p= 0,004$; OR= 3,35; IC=1,327-8,687 e IL10: $p= 0,00007$; OR=17,77; IC=2,674-744,7; Tabela 14).

Com relação à comparação entre os genótipos do grupo controle e aqueles encontrados em pacientes portadores da RLO-AD-c, não foi possível observar a presença de diferenças estatisticamente significantes entre os polimorfismos da IL1- β , TNF- α ou IL4. Por outro lado, com relação à presença do alelo mutado C do gene na IL10 na posição -592 foram observadas diferenças significantes quando comparados com a população saudável ($X^2= 9,387$; DF= 2; $p= 0,009154$). Quando agrupados os alelos AC e CC, os pacientes com RLO-AD apresentam 4,1 mais chance de possuir o alelo mutado, embora este achado não tenha sido estatisticamente significativo a diferença quando agrupados e comparados com o grupo de pacientes saudáveis ($p= 0,101$; OR= 4,903; IC= 0,6095-223,2; Tabela 12).

Tabela 12 - Frequência genotípica dos polimorfismos gênicos IL1- β +3953 C/T, IL4 -590 C/T, TNF- α -308 G/A e IL10 -592 A/C na população estudada comparando-se indivíduos saudáveis (n=100) e estratificadas pelo diagnóstico da lesão LPO (n=30) e RLO-AD (n=9).

Polimorfismo Genes	Genótipo	Fenótipo provável associado	População saudável N (%)	Indivíduos LPO N (%)	Teste estatístico	Indivíduos RLO-AD N (%)	Teste estatístico
IL1- β +3953 C/T	CC		62 (62,0)	19 (63,3)	$\chi^2 = 0,5506$ DF=2 $p^{(2)} = 0,7593$	6 (66,0)	$\chi^2 = 0,4291$
	CT		31 (31,0)	10 (33,3)		2 (22,0)	DF=2
	TT		07 (7,0)	1 (3,4)		1 (12,0)	$p^{(2)} = 0,8069$
	CC	Baixo produtor	62 (62,0)	19 (63,3)		6 (66,0)	
	CT + TT	Alto produtor	38 (38,0)	11 (36,7)	$p^{(1)} = 0,53$ OR= 0,944 IC=0,364-2,361	3 (34,0)	$p^{(1)} = 0,54$ OR= 0,815 IC=0,1249-4,1
IL4 -590 C/T	CC		1 (1,0)	6 (20,0)	$\chi^2 = 17,28$	0 (9,0)	$\chi^2 = 2,77$
	CT		76 (76,0)	16 (53,3)	DF= 2	9 (9,0)	DF= 2
	TT		23 (23)	8 (26,7)	$p^{(2)} = 0,0001$	0 (0,0)	$p^{(2)} = 0,2503$
	CC	Baixo produtor	1 (1,0)	6 (20,0)		0 (0,0)	
	CT + TT	Alto produtor	99 (99,0)	24 (80,0)	$p^{(1)} = 0,0005$ OR= 0,04 IC=0,0008-0.3678	9 (100)	$p^{(1)} = 0,91$ OR= - IC= -

Continuação da Tabela 12:

TNF-α -308 G/A	GG		66 (66,0)	11 (36,7)	$X^2 = 9,253$ DF= 2 $p^{(2)} = 0,009$	4 (44,0)	$X^2 = 3,521$ DF= 2 $p^{(2)} = 0,1720$
	GA		27 (27,0)	13 (43,3)		5 (56,0)	
	AA		07 (7,0)	6 (20,0)		0 (0,0)	
	GG	Baixo produtor	66 (66,0)	11 (36,7)	$p^{(1)} = 0,004$ OR= 3,35 IC=1,327-8,687	4 (44,0)	$p^{(1)} = 0,175$ OR= 2,426 IC=0,4831- 12,95
	GA + AA	Alto produtor	34 (34,0)	19 (63,3)		5 (56,0)	
IL10 -592 A/C	AA		38 (38,0)	1 (3,0)	$X^2 = 47,29$ DF= 2 $p^{(2)} = <0,000001$	1 (12,0)	$X^2 = 9,387$ DF= 2 $p^{(2)} = 0,009154$
	AC		52 (52,0)	8 (27,0)		4 (44,0)	
	CC		10 (10,0)	21 (70,0)		4 (44,0)	
	AA	Baixo produtor	38 (38,0)	1 (3,0)	$p^{(1)} = 0,00007$ OR=17,77 IC=2,674-744,7	1 (12,0)	$p^{(1)} = 0,101$ OR= 4,903 IC= 0,6095- 223,2
	AC + CC	Alto produtor	62 (62,0)	29 (97,0)		8 (88,0)	

(*) – Nível de significância 5,0%.

(1) – Valor de p utilizando o Teste Exato de Fisher.

(2) – Valor de p utilizando o Teste do X^2 .

OR – Odds Ratio.

IC – Intervalo de confiança.

Os resultados dos polimorfismos analisados dos genes IL1- β , TNF- α e IL10 estratificados pelo tipo de lesão não exibiram diferenças significantes que pudessem ser utilizados como fator de diferenciação entre as duas lesões. No entanto foram observadas diferenças significantes entre o LPO e a RLO-AD para o polimorfismo do gene da IL4 na posição -590 C/T, cujo alelo mutado estava fortemente associado à presença de LPO ($p < 0,03$) (Tabela 13).

Tabela 13 - Frequência genotípica dos polimorfismos gênicos IL1- β +3953 C/T, IL4 -590 C/T , TNF- α -308 G/A e IL10 -592 A/C na população estudada estratificadas pelo diagnóstico da lesão LPO (n=30) e RLO-AD (n=9). (OR – Odds Ratio, 95% intervalo de confiança, Fteste - Fisher Teste e χ^2 - Teste Chi-quadrado).

Polimorfismo Genes	Genótipo	Fenótipo provável associado	Indivíduos LPO N (%)	Indivíduos RLO-AD N (%)	Teste estatístico
IL1-β +3953 C/T	CC		19 (63,3)	6 (66,0)	$X^2 = 1,106$
	CT		10 (33,3)	2 (22,0)	DF= 2
	TT		1 (3,4)	1 (12,0)	$p^{(2)} = 0,5751$
	CC	Baixo produtor	19 (63,3)	6 (66,0)	$p^{(1)} = 0,59$ OR= 0,8636 IC=0,1167- 5,12
	CT + TT	Alto produtor	11(36,7)	3 (34,0)	
IL4 -590 C/T	CC		6 (20,0)	0 (9,0)	$X^2 = 6,552$
	CT		16 (53,3)	9 (9,0)	DF= 2
	TT		8 (26,7)	0 (0,0)	$p^{(2)} = 0,03778$
	CC	Baixo produtor	6 (20,0)	0 (0,0)	$p^{(1)} = 0,1820$ OR= - IC= -
	CT + TT	Alto produtor	24 (80,0)	9 (100)	

Continuação da Tabela 13:

TNF-α -308 G/A	GG		11 (36,7)	4 (44,0)	$X^2 = 2,133$
	GA		13 (43,3)	5 (56,0)	DF= 2
	AA		6 (20,0)	0 (0,0)	$p^{(2)} = 0,3442$
	GG	Baixo produtor	11 (36,7)	4 (44,0)	$p^{(1)} = 0,48$ OR= 0,7237 IC=0,1254- 4,504
	GA + AA	Alto produtor	19 (63,3)	5 (56,0)	
IL10 -592 A/C	AA		1 (3,0)	1 (12,0)	$X^2 = 2,233$
	AC		8 (27,0)	4 (44,0)	DF= 2
	CC		21 (70,0)	4 (44,0)	$p^{(2)} = 0,3274$
	AA	Baixo produtor	1 (3,0)	1 (12,0)	$p^{(1)} = 0,41$ OR=0,275 IC=0,0034- 24,34
	AC + CC	Alto produtor	29 (97,0)	8 (88,0)	

(*) – Nível de significância 5.0%

(1) – Valor de p utilizando o Teste Exato de Fisher

(2) – Valor de p utilizando o Teste do X^2

OR – Odds Ratio

IC – Intervalo de confiança

5.7 Reavaliações dos casos do subgrupo 1.3

Os 35 casos remanescentes foram excluídos da análise por não apresentarem critérios clínicos e/ou histopatológicos suficientes para serem considerados casos clássicos de LLO e após as análises adicionais dos 39 casos clássicos, esses foram reavaliados e de acordo com os achados clínicos, histopatológicos e de polimorfismos gênico.

Os 35 casos remanescentes foram alocados no subgrupo 1.3 e reavaliados após o estabelecimento do perfil de LPO ou RLO-RAM. Desses, 4/35 casos foram excluídos totalmente das análises por se tratarem de ulceração inespecífica, um LPO-escleroso e dois casos de diagnóstico final de LVP.

Os casos das duas pacientes que foram agrupadas no subgrupo 1.3, que inicialmente haviam sido diagnosticados como portadoras de LPO, chamaram atenção nesse trabalho, pois após cinco anos sem acompanhamento das lesões, foi possível observar alterações no padrão clínico e histopatológico das mesmas. As pacientes foram reavaliadas clinicamente e histopatologicamente e então foi possível observar que os dois casos se tratavam de leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP). Uma das pacientes encontra-se em acompanhamento periódico da lesão e outra já desenvolveu um carcinoma espinocelular de esôfago. Outros dois casos não foram analisados por se tratarem de: um caso com diagnóstico inicial de LPO ulcerado e que apresentou características histopatológicas compatíveis com ulceração inespecífica sem os padrões clínico-histopatológicos de lesão liquenóide e um caso de LPO-esclero-atrófico o qual não

possui os mesmos fatores etiopatogênicos do LPO-reticular e da RLO-RAM, portanto ao final da análise do subgrupo 1.3, foi possível reavaliar 31 casos de LLO.

Noutros treze casos (13/31) para os quais as amostras foram consideradas insuficientes foram analisados apenas no que diz respeito à presença de hipossalivação e presença de polimorfismos. Por fim, os 18 casos remanescentes foram submetidos às análises de hipossalivação, dezoito casos (18/31) passaram pelas análises clínicas e histopatológicas e presença de polimorfismos (tabela 14).

Então foi possível observar que a presença de hipossalivação foi observada em 26/31 (89,7%) casos de portadores de LLO. A presença do alelo mutado da IL4-590CT foi observada em 15 casos de LLO.

De posse desses perfis, foi possível reavaliar e prosseguir com o diagnóstico provável dos casos de LLO remanescentes. Foram analisados os seguintes eventos: presença de hipossalivação, demais achados histopatológicos e polimorfismos (Tabela 14).

Tabela 14. Resultados das reavaliações dos casos remanescentes após estabelecimento dos perfis do LPO e RLO-RAM.

ID do caso	Diagnóstico Inicial	Hipossalivação	Lesões estriadas bilaterais	Infiltrado perivascular profundo	Corpo de Civatte	Alelo mutado IL4	Provável Diagnóstico final
4	LPO	NA	0	NA	NA	NA	Ulceração inespecífica
32	LPO-escleroso	NA	0	NA	NA	NA	LPO-escleroso
LVP1	LPO	NA	0	NA	NA	NA	LVP
LVP2	LPO	NA	0	NA	NA	NA	LVP
7	LPO	1	1	NA	NA	1	LPO
19	RLO	0	0	NA	NA	1	RLO
20	LPO	1	1	NA	NA	1	LPO
30	RLO	1	1	NA	NA	1	LPO
33	RLO	1	0	NA	NA	0	RLO
34	LPO	0	1	NA	NA	1	LPO
37	LPO	1	1	NA	NA	0	LPO

Continuação da tabela 14:

42	LPO	1	1	NA	NA	0	LPO
43	RLO	1	0	NA	NA	1	RLO
56	LPO	1	1	NA	NA	1	LPO
60	LPO	1	1	NA	NA	1	LPO
62	LPO	1	1	NA	NA	1	LPO
68	LPO	1	1	NA	NA	1	LPO
2	LPO	1	1	0	0	1	LPO
3	LPO	1	1	0	0	1	LPO
6	LPO	1	1	0	0	1	LPO
18	LPO	1	1	0	0	1	LPO
22	LPO	1	1	0	0	1	LPO
36	LPO	1	1	0	1	0	LPO
39	RLO	1	0	0	1	0	RLO

Continuação da tabela 14:

45	LPO	0	1	0	0	1	LPO
49	LPO	1	1	0	0	1	LPO
50	LPO	1	1	1	0	1	LPO
52	LPO	1	1	0	1	1	LPO
54	LPO	1	1	0	1	1	LPO
55	LPO	1	1	0	0	0	LPO
57	RLO	1	0	1	1	0	RLO
58	LPO	1	0	1	1	0	LPO
59	LPO	1	1	0	0	1	LPO
63	LPO	1	0	0	0	1	LPO
69	LPO	1	0	0	0	0	RLO

Legenda: NA= caso não avaliado

LVP= Leucoplasia verrucosa proliferativa / LPO= Líquen Plano Oral / RLO= Reação liquenóide

0= ausente

1= presente

6 DISCUSSÃO

As doenças imunologicamente mediadas (DAI) com manifestação oral, como as lesões liquenóides orais (LLO), representam entidades de particular interesse à Estomatologia/Patologia Bucal. As DAI que se manifestam na pele e mucosas, tradicionalmente se manifestam com padrões clínico-patológicos reconhecidos como lesões liquenóides (Pinkus, 1973; Sontheimer, 2009). Sabe-se que essas lesões, como o líquen plano oral (LPO) (Al-Hashimi *et al.*, 2007) e a reação liquenóide oral associada ao amálgama dental (RLO-AD) (Finne *et al.*, 1982; Lind *et al.*, 1986; Östman; Anneroth & Skoglund, 1996; Steffen & Dupree, 2004; Aguirre-Urizar, 2008; Cobos-Fuentes *et al.*, 2009; Müller, 2011), podem apresentar características clínicas e histopatológicas muito semelhantes (DeRossi & Ciarrocca, 2005). Portanto podem ser agrupadas em estudo único, que permita compreensão mais adequada das suas etiopatogenias de modo a possibilitar o manejo clínico mais adequado.

Os portadores dessas DAI que sem manifestam com LLO podem apresentar a sintomatologia da boca seca (BS) (Atkinson & Wu, 1994; Scully, 2003). Os sinais clínicos da BS, em pacientes portadores de DAI são em geral, decorrentes de hipofunção salivar, possivelmente relacionada à descarga de interleucinas, que podem afetar a produção de saliva das glândulas salivares menores, como ocorre, por exemplo, na síndrome de Sjögren e na DECHc (Bron, 1994; Gratwohl *et al.*, 1995; Al-Hashimi *et al.*, 2007; DeRossi & Ciarrocca, 2005;

Aiko *et al.*, 2010). No entanto, os dados referentes à sintomatologia de BS e sua relação com as DAI com manifestações de LLO são controversos (Colquhoun & Ferguson, 2004; Aliko *et al.*, 2010), visto que as causas da BS são multifatoriais. Como exemplo podem ser citados fatores psicogênicos, estresse, ansiedade (Holmstrup; Schiotz; Westengaard, 1990; Eisen, 2002; Osailan *et al.*, 2011), dentre outros, como fatores relacionados à senilidade (Ben-Aryeh *et al.*, 1985; Nederfors, 2000; Nayak *et al.*, 2004), e em mulheres decorrente de fatores associados à disfunção hormonal e/ou uso de medicamentos específicos (Nederfors, 2000; Schein *et al.*, 1999). Por esses motivos, no presente estudo foi analisado o fluxo salivar nos portadores de LLO e comparado à produção de saliva de controles saudáveis, com a finalidade de avaliar a hipossalivação de acordo com os critérios pré-estabelecidos por Krasse (1986). A hipossalivação apresentou uma elevada frequência nos pacientes portadores de LLO, quando comparada com a frequência da hipossalivação em pacientes controles saudáveis. Portanto, a presença da LLO, seja ela o LPO ou a RLO-AD, apresenta 19.72 vezes para a hipossalivação do que pessoas livres de doença. Esse fenômeno foi, portanto freqüente em portadores de LPO e RLO-AD, do que em pacientes saudáveis.

Vale ressaltar ainda que os pacientes eleitos para este estudo não faziam uso de medicamentos que pudessem ser associados aos fenômenos de BS e/ou alterações bucais, como os fármacos descritos em estudos prévios (Scully *et al.*, 1998; Scully & Bagán, 2004; Torgerson *et al.*, 2007). Portanto, no presente estudo pode-se perceber que essa associação entre a hipossalivação nos portadores de

LLO provavelmente pode ser decorrente das suas condições bucais inatas associadas aos fatores psicossomáticos.

Resultados de um estudo prévio mostraram que pacientes com artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e esclerose sistêmica têm maior predisposição de doença mucosa oral do que a população saudável (Aliko *et al.*, 2010). Portanto, além dos sintomas de BS, os portadores de DAI, podem apresentar clinicamente LLO, as quais são lesões brancas estriadas que podem estar ou não associadas a outras sintomatologias. Apesar de todos os voluntários portadores de LLO que participaram do estudo em questão terem apresentado lesões brancas estriadas, os mesmos não eram portadores de nenhuma DAI. Portanto, as suas lesões liquenóides não foram associadas à presença de DAI.

As LLO possuem incidência importante em indivíduos de 53 anos, com uma maior predileção por pacientes do gênero feminino numa proporção 2:1 (Xue *et al.*, 2005; Ingafou *et al.*, 2006). Nos resultados obtidos desse estudo foi observado que dos 39 casos analisados, 27 (69%) eram pacientes do gênero feminino e 12 (31%) eram pacientes do gênero masculino, portanto observou-se prevalência maior em pacientes do gênero feminino na proporção 3:1, comparada com a prevalência em pacientes do gênero masculino, esses resultados corroboram com os relatos da literatura (Xue *et al.*, 2005; Ingafou *et al.*, 2006). Além dos dados de incidência em gêneros diferentes, foi observado que a média de idade dos 39 pacientes analisados foi de 53,13 anos (mínima: 28; máxima: 82; DP: 11,08), e esses dados foram concordantes com a literatura consultada visto que foi

observada uma maior incidência de LLO em pacientes do gênero feminino e com idade média de 53 anos.

Após estratificação pelo diagnóstico das LLO, os dados do estudo foram corroborantes com aqueles descritos na literatura consultada (Xue *et al.*, 2005; Ingafou *et al.*, 2006), visto que foi observada uma maior incidência de LPO. Foram observados 30 casos de LPO, desses 10 em pacientes do gênero masculino e 20 em pacientes do gênero feminino, ou seja, uma proporção de 2:1. Foram observados 9 casos de RLO-AD, distribuídos da seguinte forma: 2 casos ocorreram em pacientes do gênero masculino e 7 ocorreram em pacientes do gênero feminino. Foi possível observar que as LLO afetaram mais pacientes do gênero feminino, com médias de idade de 53,9 anos, para os portadores de LPO, e 50,4 anos a média de idade dos portadores de RLO-AD-c, similar aos dados descritos na literatura (Axéll; Rundquist, 1987; Kovac-Kovacic; Skaleric, 2000; Espinoza *et al.*, 2003; Al-Hashimi *et al.*, 2007).

O líquen plano (LP) é uma doença auto-imune crônica, mucocutânea que afeta a mucosa oral, pele, mucosas genitais, unhas e o couro cabeludo (Sugerman *et al.*, 2002). Relatos sobre a presença e prevalência de LP com manifestações orais, reconhecidas como LPO, foram descritas como lesões orais estriadas brancas e acizentadas (Samman; 1956; Warin *et al.*, 1958; van der Meij & van der Waal, 2003; Ismail *et al.*, 2007). Essas lesões são semelhantes às aquelas encontradas em portadores de lesões justapostas às restaurações de amálgama (Finne *et al.*, 1982; Lind *et al.*, 1986; Östman *et al.*, 1996; Steffen & Dupree, 2004;

Aguirre-Urizar, 2008; Cobos-Fuentes *et al.*, 2009; Müller, 2011). Portanto, os pacientes eleitos para compor o grupo de portadores de LLO apresentaram lesões brancas e estriadas, com aspecto liquenóide, semelhante às descrições prévias dessas lesões.

Sabe-se que a prevalência do LPO é descrita com valores que variam de 0,1 a 11% a depender da população estudada (Axéll & Rundquist, 1987; Kleinman *et al.*, 1991; Scully *et al.*, 1998; Kovac-Kovacic & Skaleric, 2000; Espinoza *et al.*, 2003; Bornstein *et al.*, 2006; Lodi *et al.*, 2005; Rosa, 2007; Al-Hashimi *et al.*, 2007; McCartan; Healy, 2008; Souza & Rosa, 2008). Embora seja observada aparente falta de concordância entre os dados epidemiológicos nesses estudos de prevalência, todos concordam que o LPO é mais prevalente do que as RLO, as quais apresentam incidência na ordem de 1% (Franklin & Jones, 2006), em especial, as RLO-AD (Scully *et al.* 1998; Lodi *et al.*, 2005; Al-Hashimi *et al.*, 2007). No presente estudo, foi observada uma prevalência de 16,8% (n=30/178) de pacientes portadores de LPO e uma incidência de 5% (n=9/178) de casos de RLO-AD, dados esses discordantes da literatura consultada. Por outro lado, foi possível observar maior frequência do LPO do que a RLO-AD e sendo assim, esses dados corroboram com a literatura com relação à maior incidência do LPO (Bornstein *et al.*, 2006; Franklin & Jones, 2006; McCartan & Healy, 2008).

O diagnóstico do LPO, assim como o da RLO, é baseado em suas aparências clínicas e posteriormente confirmado por uma biópsia e análises histopatológicas (Edwards & Kelsch, 2002; Eisen *et al.*, 2005). No entanto, diagnóstico diferencial clínico do LPO reticular deve ser feito com as RLO não

associadas a fatores locais, e vice-versa, e com as lesões potencialmente malignizáveis (LPM) da cavidade oral, as quais clinicamente podem apresentar-se como estrias ou placas branco-acizentadas. De fato, as RLO podem ser confundidas com LPM em estágios iniciais, porque estas podem apresentar-se como lesões com padrão clínico liquenóide e no exame histopatológico não apresentam atipias epiteliais. No entanto, durante a sua evolução, podem apresentar mudança nos aspectos clínicos e histopatológicos e, posteriormente, serem diagnosticadas como uma LPM (Van der Meij; Mast; Van der Waal, 2007). No presente estudo, dentre os pacientes participantes dessa pesquisa, foram observados dois casos de lesões que foram previamente diagnosticadas histologicamente como “compatíveis com LPO”. No entanto, após cinco anos, os pacientes retornaram e suas lesões orais foram diagnosticadas como LVP, que é atualmente considerada uma lesão com alto poder de transformação maligna (Eisen *et al.*, 2005; Gouvêa *et al.*, 2010). Em um desses casos, houve a transformação maligna das lesões de orofaringe e atualmente a paciente encontra-se em tratamento de um carcinoma espinocelular (CEC) nesta região.

Esse fato demonstra a constante preocupação em se fazer o acompanhamento destas lesões que não obedecem aos critérios estritos clínico-patológicos para o LPO ou RLO-AD, que são lesões benignas (Lind *et al.*, 1986; Thornhill *et al.*, 2006; Müller, 2011). Portanto, é ratificada a necessidade de acompanhamento rigoroso das lesões com características clínicas liquenóide, e mais ainda, atenção para aquelas com alterações displásicas nos achados histológicos (Lind *et al.*, 1986; Lanfranchi-Tiziera; Aguas; Sano, 2003; Epstein *et*

al., 2003; Al-Hashimi *et al.*, 2007; Warnakulasuriya; Johnson; van der Waal, 2007; van der Waal, 2009; Viridi *et al.*, 2010; Müller, 2011).

Outros hábitos como o tabagismo, podem ter implicações prognósticas sobre o desenvolvimento de lesões potencialmente malignizáveis e malignas da cavidade oral e devem ser levados em consideração (WHO, 1978; De Jong *et al.*, 1984; Ismail *et al.*, 2007; Souza; Rosa, 2008; Cortés-Ramírez, 2010). Entretanto, nas duas pacientes que desenvolveram lesões displásicas, com diagnóstico de LVP, não havia associação com fatores predisponentes ao CEC oral.

Há relatos na literatura sobre transformação maligna das LLO e, em especial, do LPO em CEC oral (Ismail *et al.*, 2007; Souza; Rosa, 2008; Cortés-Ramírez, 2010), embora esse tema ainda seja extremamente controverso. Após a análise histopatológica, não foi observada transformação maligna nos casos clássicos de LLO selecionados no presente estudo, pelo seguimento e nenhum dos casos apresentou alterações epiteliais displásicas.

Os critérios de diagnóstico clínico das RLO-AD incluem, principalmente, a presença do fator causal aparente justaposto ou relacionado ao aparecimento das lesões estriadas (Muller, 2011). Quando da remoção do fator causal a resolução da lesão clínica pode ocorrer (DeRossi & Greenberg, 1998; Ostman *et al.*, 1996; Dunschen *et al.*, 2003; Issa *et al.*, 2005; Thornhill *et al.*, 2006). Clinicamente, as RLO-AD são semelhantes ao LPO. No entanto, durante o exame físico intra-oral é possível visualizar a estreita relação entre uma restauração de amálgama e, a lesão estriada, localizada justaposta ao material restaurador de prata (Aggarwal *et*

al., 2010). Em geral, essas lesões não apresentam o aspecto simétrico encontrado no LPO (Müller, 2011). Os casos de RLO-AD selecionados para compor o grupo 1.2 foram cuidadosamente analisados e foi observada a presença da lesão liquenóide em íntima relação com uma restauração de amálgama de prata.

Contudo, sabe-se que, atualmente, não há nenhum método de confiança para distinguir o LPO das RLO. Portanto, muitos estudos e revisões têm apontado características clínico-patológicas na tentativa de diferenciar essas duas lesões, em virtude de possuírem prognósticos completamente diferentes (Lanfranchi-Tiziera *et al.*, 2003; Al-Hashimi *et al.*, 2007; Van der Meij *et al.*, 2007; do Prado *et al.*, 2009). Como padrão ouro de diagnóstico das LLO, foram sugeridos os critérios de diagnóstico das LLO da Organização Mundial de Saúde (CDx-LLO-OMS) (van der Meij & van der Waal, 2003; Al-Hashimi *et al.*, 2007), os quais foram adotados para a seleção dos casos clássicos do presente estudo. Portanto, com base nesses critérios, dos 74 pacientes portadores de LLO convocados, foram selecionados apenas 39 casos de LLO, que seriam lesões consideradas como “padrão” para as análises realizadas.

Clinicamente, o LPO e a RLO-AD são muito semelhantes e possuem, como características marcantes, a presença de lesões bancas com estriações, que podem ser ulceradas e/ou em placa. De acordo com os critérios da OMS (Van der Meiji *et al.*, 2003; Thornhill *et al.*, 2006; Al-Hashimi *et al.*, 2007) essas características clínicas podem auxiliar no diagnóstico das LLO. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que, relativo aos critérios clínicos da OMS, os 39 casos selecionados e avaliados apresentaram um padrão reticular e

estriado. As lesões brancas liquenóides bilaterais simétricas e localizadas em mucosa jugal, foram observadas nos casos de LPO, as lesões assimétricas e justapostas a uma restauração de amálgama foram observadas nos casos de RLO-AD. Portanto, a presença de indicativos clínicos como lesões bilaterais na mucosa jugal, pode ser critério clínico adequado para a diferenciação entre o LPO e a RLO-AD, além disso, a presença de lesão justaposta a um material restaurador, pode ser considerada forte característica das RLO-AD esses dados foram semelhantes àqueles descritos na literatura (Thornhill *et al.*, 2006).

A presença de ulcerações também é um critério clínico adotado pela OMS (Van der Meiji *et al.*, 2003; Thornhill *et al.*, 2006; Al-Hashimi *et al.*, 2007), esse evento foi analisado e relacionadas com as LLO do presente estudo e foi possível observar que as ulcerações estavam presentes em 16 casos de LLO. Desses, 13 tiveram diagnóstico de LPO e 3 tiveram diagnóstico de RLO-AD.

Os critérios histopatológicos da OMS contemplam a presença de infiltrado inflamatório subepitelial em banda (IISEB), degeneração hidrópica da camada basal e ausência de displasia epitelial (Van der Meiji *et al.*, 2003; Thornhill *et al.*, 2006; Al-Hashimi *et al.*, 2007). Os dados da presença do IISEB foram observados em 38 casos, assim como a degeneração hidrópica da camada basal e, por fim, nenhum dos casos apresentava qualquer nível de displasia. Portanto, foi possível observar por meio das análises descritivas que os critérios histológicos foram muito semelhantes entre as duas lesões, seja LPO ou RLO-AD, como descrito por van der Meij; van der Waal (2003) e Thornhill *et al.* (2006).

Os demais achados histológicos analisados foram: hiperqueratose (hiperortoqueratose e hiperparaqueratose), acantose, atrofia epitelial, fenda subepitelial focal, projeção em dente de serra, derrame pigmentar, exocitose e presença de folículo linfóide, infiltrado inflamatório perivascular profundo e presença de corpo de Civatte. Todos esses eventos celulares estavam presentes nos casos de LPO e RLO-AD-c, conforme previamente descritos (Kramer *et al.*, 1978; McCartan; McCreary, 1997; Scully, 1999; Eisenberg, 2000).

Além dos achados clínicos, existem características histológicas fortemente associadas às LLO. Algumas características histológicas são determinantes e outras são discriminantes entre as lesões do LPO e das RLO-AD (Thornhill *et al.*, 2006). De acordo com os resultados dos pesquisadores, as características determinantes para as duas LLO são: hiper orto ou paraqueratose, degeneração liquefativa da camada basal, e a presença de linfócitos e histiócitos no infiltrado inflamatório subepitelial em banda (IISEB). Os resultados do presente estudo mostraram que as LLO analisadas apresentavam hiperorto/paraqueratose e presença de linfócitos em abundância no IISEB em igual proporção. Com base na literatura consultada, as características mais significantes para as RLO-AD são: 1) a presença de infiltrado inflamatório localizado superficialmente ou profundo em algumas ou todas as áreas, 2) infiltrado inflamatório perivascular, 3) plasmócitos no infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo, 4) neutrófilos no infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo. No LPO essas características estão ausentes. No presente estudo, a presença de folículos linfóides e o infiltrado

inflamatório perivascular profundo foram características fortemente associadas à RLO-AD-c, semelhante aos dados descritos na literatura (Thornhill *et al.*, 2006).

Os dados da literatura mostram que no LPO o epitélio é mais espesso do que nas RLO (Scully, 1999; Eisenberg, 2000), similarmente, aos resultados da análise da espessura epitelial do presente estudo que mostraram que as lesões de LPO apresentaram epitélio mais espesso do que as lesões de RLO-AD. No entanto, após análise estatística, não foi possível diferenciar as lesões de LPO ou RLO-AD por meio da espessura epitelial. Os dados da correlação clínica e histopatológica revelaram que as presenças da hiperorto ou - paraqueratoses estavam associadas às LLO clinicamente mais espessas, ou seja, mais leucoplásicas. A presença de exocitose foi associada às lesões atróficas, ulceradas e com sintomatologia dolorosa, comumente presente em pacientes com LLO semelhante ao relatado na literatura consultada (Ismail *et al.*, 2007).

A presença do infiltrado profundo é uma característica fortemente associada ao diagnóstico de RLO (Thornhill *et al.*, 2006). Os resultados do presente estudo relativos à espessura do IISE demonstraram que essa média do IISE nos 39 casos analisados foi de 22,91µm (min: 0,18; máx: 92,79; DP: 14,77). Após estratificar pelo diagnóstico da LLO, foi possível observar que a média da espessura do infiltrado inflamatório subepitelial foi maior nas lesões das RLO-AD (23,39 µm) do que no LPO (18,98 µm). Não foi observada diferença estatisticamente significativa na espessura do infiltrado inflamatório entre os dois grupos. Os resultados do presente estudo são semelhantes àqueles encontrados na literatura consultada,

portanto, quanto mais profundo o infiltrado inflamatório subepitelial, mais provável que o diagnóstico final seja de RLO (Thornhill *et al.*, 2006).

O LPO é uma doença mucocutânea com padrão autoimune mediada por linfócitos T (LT) e as RLO-AD são reações de hipersensibilidade mediadas por LB e LT. Linfócitos B e T atuam na patogênese de muitas doenças autoimunes (DAI), dentre elas o LPO e a RLO-AD. Os linfócitos B são células responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias (CI), como por exemplo, a IL-10. Essa CI atua nas células B dos centros germinativos aumentando a expressão do gene bcl-2, prevenindo deste modo a apoptose de células B auto-reativas, o que poderia facilitar das manifestações autoimunes (Moore *et al.*, 2001, Carvalho, 2005). Os resultados do presente estudo mostram que os linfócitos B imunomarcados foram mais numerosos em lesões de RLO-AD, quando comparados às do LPO. Portanto, esse dado constituiu um bom marcador para diferenciar as duas LLO. Além disso, foi possível relacionar esse dado da imuno-histoquímica com a presença do alelo mutado da IL-10, visto que essa mutação estava presente em portadores de LLO.

Plasmócitos estão presentes no infiltrado inflamatório das lesões do LPO clinicamente ulceradas ou não, ou com a presença da co-infecção por *Candida albicans*, visto que estas situações estão associadas ao recrutamento dos plasmócitos e neutrófilos, encontrados no exame histopatológico de lesões do LPO (Thornhill *et al.*, 2006). Os dados do presente estudo foram consistentes no que diz respeito à presença do infiltrado inflamatório com plasmócitos em ambas as LLO,

presente nas lesões ulceradas, porém não co-infectadas por *Candida albicans*. Entretanto, as duas LLO apresentaram quantidades semelhantes dessas células, e esse fato não possibilitou a diferenciação entre as duas lesões.

Foi descrita a presença de maior número de mastócitos no LPO, em comparação à mucosa oral normal (Jontell *et al.*, 1986). Essas células ficam dispostas, principalmente, no tecido conjuntivo profundo (Zhao *et al.*, 1998). Os dados de estudos prévios, relativos a análises quantitativas dessas células, não evidenciaram diferenças quantitativas nas contagens de mastócitos presentes no infiltrado inflamatório do LPO e das RLO (Jahanshahi & Aminzadeh, 2010). Similarmente, os resultados quantitativos do presente estudo mostraram quantidades semelhantes dessas células no infiltrado inflamatório subepitelial das duas LLO analisadas. Portanto a contagem de mastócitos não deve ser utilizada para a diferenciação destas duas LLO.

Os polimorfismos dos genes, nos pacientes analisados, foram classificados nos fenótipos preditores de baixa e alta produção de interleucinas, de acordo com seus genótipos, com base em dados da literatura (Pociot *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1992; Fishman *et al.*, 1998; Hurme & Santtila, 1998; Smith & Humphries, 2009). Em resumo, os resultados dos polimorfismos analisados dos genes IL1- β , TNF- α e IL10, foram estratificados pelo tipo de lesão, e não exibiram diferenças significantes de forma que permitisse seu uso como fator de diferenciação entre as duas lesões. No entanto foram observadas diferenças estatisticamente significantes no polimorfismo do gene da IL-4 na posição -590 C/T. O alelo -590T

estava fortemente associado ao LPO quando comparada com a frequência do alelo mutado em pacientes portadores de RLO-AD. Portanto esse polimorfismo pode se constituir um perfil frequente em pacientes portadores de LPO.

O genótipo IL1- β +3953TT é raro e associado à alta secreção de IL1- β (Carvalho, 2001). Além disso, é um polimorfismo que foi associado a diferentes doenças, como por exemplo, as DAI, infecciosas, ou outras doenças com o componente inflamatório relevante (Kornman *et al.*, 1997; Gore *et al.*, 1998). No presente estudo foi observada a ocorrência de um único caso no subgrupo 1.1, de um único caso no subgrupo 1.2 e de um único caso no grupo 3. Esses dados são concordantes com a literatura no que diz respeito à raridade da ocorrência do gene polimórfico (Carvalho, 2001). Também a presença desse polimorfismo, não foi observada com frequência nos portadores de LLO do presente estudo.

Similarmente, genótipo polimórfico da IL4 está associado com alta secreção de interleucina-4 (Bai *et al.*, 2010). Essa citocina regula as reações imunes mediadas pela IgE e pelas células como mastócitos e eosinófilos, que atuam como fator de crescimento e diferenciação das células Th2 (Friedman; Weiner 1994; Hancock *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.* 2010). A superexpressão da IL4 foi avaliada nos queratinócitos e em células provenientes do infiltrado inflamatório de pacientes com LPO, e observou-se aumento na produção desta IL4 (Yamamoto; Osaki, 1995). Por outro lado, a presença dos polimorfismos do gene IL4 parecem ter uma influência protetora sobre os sintomas referidos pelos portadores de LPO, uma vez que estavam associados às formas mais brandas da doença (Bai *et al.*,

2008). No presente estudo os resultados são concordantes com aqueles descritos por Yamamoto & Osaki, pois foi observada a presença significativa dos genótipos mutados da IL4 no grupo de portadores de LLO com padrão estriado (provenientes de uma amostra da população brasileira), que podem estar associados à presença de mastócitos identificados no IISE e corados pela IHQ.

O TNF- α é um mediador primário da resposta inflamatória que atua na patogênese das DAI, pois é associado ao recrutamento e diferenciação dos LT e LB, presença de centros germinativos ricos em LB, recrutamento e diferenciação de L-Th2 e monócitos (Makhatadze, 1998; Hoffstedt *et al.*, 2000). Carrozzo e *et al.*, (2004) relataram que o aumento na frequência do polimorfismo -308G/A parece contribuir para o desenvolvimento de LPO, por conta do aumento da síntese da citocina TNF- α . Similarmente, pacientes brasileiros com líquen plano oral apresentaram uma frequência significativamente maior de polimorfismo do TNF- α -308 (G/A), quando comparada com indivíduos sem a doença (Xavier *et al.*, 2007). Os resultados observados nesse estudo mostraram que o genótipo TNF- α -308AA mutado foi observado em portadores de LLO.

Nos humanos, a interleucina-10 (IL10) é produzida nos linfócitos B (LB), L-Th2 e nos monócitos. Assim como a IL4, a IL10 atua no recrutamento e na maturação de linfócitos-TCD8 (linfócitos Th2), maturação de mastócitos e exercem influências positivas sobre os mecanismos de apoptose de queratinócitos (Moore *et al.*, 2001). A IL10 também está, em alguns casos, referida como potente supressora do sistema imunológico dos seres humanos, que poderia representar

fator protetor ou anti-inflamatório (Sivula *et al.*, 2009). Entretanto, a IL10 também é relacionada a efeitos estimulatórios do sistema imunológico (Reitamo *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 2001; Nolan *et al.*, 2004; Carvalho, 2005). Há relatos que associam a presença do polimorfismo no gene IL10 a portadores de doenças inflamatórias, como o LPO (Xavier *et al.*, 2007). No presente estudo, foi observada presença significativa dos dois genótipos mutados da IL10 no grupo de pacientes que desenvolveu LLO. Ou seja, de 39 pacientes com LLO analisados, 37 pacientes expressando os genótipos IL10 -592AC e IL10 -592CC. Portanto, pacientes com o gene mutado da IL10 na posição -592A têm 11,3 vezes mais chances de serem portadores de LLO e, este é genótipo frequente em pacientes com portadores de LLO.

7 CONCLUSÕES

Por meio da metodologia empregada e diante dos resultados obtidos, foi possível observar que:

- Foi possível distinguir as duas LLO histopatologicamente por meio da presença de folículos linfóides e infiltrado perivascular profundo, visto que essas características histopatológicas foram mais frequentes nas RLO-AD;
- Não foi possível distinguir as duas LLO por meio da espessura epitelial nem da espessura do infiltrado inflamatório em banda subepitelial;
- Por meio da contagem de linfócitos B em uma área de 1mm^2 foi possível diferenciar as duas LLO, visto que a RLO-AD apresentou maiores quantidades dessas células;
- Os portadores de LLO apresentaram mais hipossalivação quando comparados com pacientes controles saudáveis;
- Os achados desse estudo indicam uma correlação entre a presença de polimorfismos com fenótipos altamente secretores de citocinas inflamatórias TNF- α , IL4 e IL10, associadas às respostas Th1/2 com a presença de LLO, quando comparada com o grupo controle de pacientes saudáveis.

REFERÊNCIAS*

Abbas KA, Pober JS. Effectors mechanisms of immune responses. In: Abbas KA, Pober JS, editors. Cellular and molecular immunology. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 2000. Vol.1, p. 553.

Aggarwal V, Jain A, Kabi D. Oral lichenoid reaction associated with tin component of amalgam restorations: a case report. Am J Dermatopathol. 2010; 32(1): 46-8.

Aguirre Urizar JM. Letter to the editor: oral lichenoid disease. A new classification proposal. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2008; 13(4): E224.

Aidar M, Line SRP. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. Braz Dent J. 2007; 18(2): 148-152.

Aliko A, Alushi A, Tafaj A, Lela F. Oral mucosa involvement in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis. Int Dent J. 2010; 60(5): 353-8.

Al-Hashimi I, Schifter M, Lockhart PB, Wray D, Brennan M, Migliorati CA *et al*. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007; 103: S25.e1-12.

Aquino SN. Avaliação de novos polimorfismos nos genes TGFB3, MSX1, MYH9 e JAG2 em pacientes com fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas. Dissertação. Sibeles Nascimento Aquino, Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Andreasen JO. Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1968; 25(1): 31-42.

Arend WP. The mode of action of cytokine inhibitors. J Rheumatol Suppl. 2002; 65: 16-21.

Arora M. Therapy of chronic graft-versus-host disease. Best Pract Res Clin Haematol. 2008; 21(2): 271-9.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Arvidson NG, Gudbjörnsson B, Elfman L, Rydén AC, Tötterman TH, Hällgren R. Circadian rhythm of serum interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1994; 53(8): 521-4.

Atkinson JC, Wu AJ. Salivary gland dysfunction: causes, symptoms, treatment. *J Am Dent Assoc*. 1994; 125(4): 409-16.

Axéll T, Rundquist L. Oral lichen planus--a demographic study. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1987;15(1): 52-6.

Axelrod E, Lee K, Fong M, Ostro S, Shin R. Evidence-Based Care Model Community Dentistry 300Y; 2006. Disponível em: [http://www.utoronto.ca/dentistry/newsresources/evidence_based/orallichen.pdf]. Acesso em outubro, 2011.

Bai J, Lin M, Zeng X, Zhang Y, Wang Z, Shen J *et al*. Association of polymorphisms in the human IFN-gamma and IL4 gene with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese cohort. *J Interferon Cytokine Res*. 2008; 28(6): 351-8.

Barrett AJ, Le Blanc K. Prophylaxis of acute GVHD: manipulate the graft or the environment? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008; 21(2): 165-76.

Bascones-Ilundain C, Gonzalez-Moles MA, Esparza-Gómez G, Gil-Montoya JA, Bascones-Martínez A. Importance of apoptotic mechanisms in inflammatory infiltrate of oral lichen planus lesions. *Anticancer Res*. 2006; 26(1A): 357-62.

Ben-Aryeh H, Miron D, Berdicevsky I, Szargel R, Gutman D. Xerostomia in the elderly: prevalence, diagnosis, complications and treatment. *Gerodontology*. 1985; 4(2): 77-82.

Bensen JT, Langefeld CD, Hawkins GA, Green LE, Mychaleckyj JC, Brewer CS *et al*. Nucleotide variation, haplotype structure, and association with end-stage renal disease of the human interleukin-1 gene cluster. *Genom*. 2003; 82(2): 194-217.

Bergdahl M, Bergdahl J. Low unstimulated salivary flow and subjective oral dryness: association with medication, anxiety, depression, and stress. *J Dent Res*. 2000; 79(9): 1652-8.

Boisnic S, Frances C, Branchet MC, Szpirglas H, Le Charpentier Y. Immunohistochemical study of oral lesions of lichen planus: diagnostic and pathophysiologic aspects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990; 70(4): 462-5.

Bornstein MM, Lüönd-Valeskeviciute I, Altermatt HJ, Stauffer E, Buser D. Oral mucosal lesions diagnosed in a stomatology service. An examination of clinico-pathological findings from the year 2003. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2006;116(5):468-75.

Bron D. Graft-versus-host disease. *Curr Opin Oncol.* 1994; 6(4): 358-64.

Brown RS, Bottomley WK, Puente E, Lavigne GJ. A retrospective evaluation of 193 patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 1993; 22(2): 69-72.

Bufalino A. Análise da suplementação vitamínica e de polimorfismos em genes da via metabólica do ácido fólico em mães de indivíduos com fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas. Dissertação. Andreia Bufalino, Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Büyük AY, Kavala M. Oral metronidazole treatment of lichen planus. *J Am Acad Dermatol.* 2000; 43(2 Pt 1): 260-2.

Carbone M, Arduino PG, Carrozzo M, Caiazzo G, Broccoletti R, Conrotto D *et al.* Topical clobetasol in the treatment of atrophic-erosive oral lichen planus: a randomized controlled trial to compare two preparations with different concentrations. *J Oral Pathol Med.* 2009; 38(2): 227-33.

Carrozzo M, Ubaldi de Capei M, Dametto E, Fasano ME, Arduino P *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma polymorphisms contribute to susceptibility to oral lichen planus. *J Invest Dermatol.* 2004; 122(1):87-94.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975; 72(9): 3666-70.

Carvalho, MA. Efeito de polimorfismos do gene da interleucina-1(IL1), IL6,IL10 e fator de necrose tumoral na ocorrência de reação transfusional febril não hemolítica / Marcelo Addas Carvalho. Campinas, SP: [s.n.]. 2005.

Chainani-Wu N, Silverman S Jr, Lozada-Nur F, Mayer P, Watson JJ. Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *J Am Dent Assoc.* 2001; 132(7): 901-9.

Chen ML, Huang CM, Tsai CH, Tsai FJ. Interleukin-1beta gene polymorphisms in Taiwanese patients with gout. *Rheumatol Int.* 2005; 25(3): 179-82.

Cheng HH, Chang CS, Wang HJ, Wang WC. Interleukin-1beta and -10 polymorphisms influence erosive reflux esophagitis and gastritis in Taiwanese patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 25(8): 1443-51.

Cobos-Fuentes MJ, Martínez-Sahuquillo-Márquez A, Gallardo-Castillo I, Armas-Padrón JR, Moreno-Fernández A, Bullón-Fernández P. Oral lichenoid lesions related to contact with dental materials: a literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009; 14(10): e514-20.

Colquhoun AN, Ferguson MM. An association between oral lichen planus and a persistently dry mouth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 98(1): 60-8.

Cortés-Ramírez DA, Rodríguez-Tojo MJ, Gainza-Cirauqui ML, Martínez-Conde R, Aguirre-Urizar JM. Overexpression of cyclooxygenase-2 as a biomarker in different subtypes of the oral lichenoid disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 110(6): 738-43.

De Jong WF, Albrecht M, Bánóczy J, van der Waal I. Epithelial dysplasia in oral lichen planus. A preliminary report of a Dutch-Hungarian study of 100 cases. *Int J Oral Surg*. 1984; 13(3): 221-5.

De Rossi SS, Greenberg MS. Intraoral contact allergy: a literature review and case reports. *J Am Dent Assoc*. 1998; 129(10): 1435-41.

DeRossi SS, Ciarrocca KN. Lichen planus, lichenoid drug reactions, and lichenoid mucositis. *Dent Clin North Am*. 2005; 49(1): 77-89.

Dickinson AM, Holler E. Polymorphisms of cytokine and innate immunity genes and GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008; 21(2): 149-64.

Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997; 8(4):253-65.

Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996; 15; 87(6): 2095-147.

Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000; 118(2): 503-8.

Do Prado RF, Marocchio LS, Felipini RC. Oral lichen planus versus oral lichenoid reaction: difficulties in the diagnosis. *Indian J Dent Res*. 2009; 20(3): 361-4.

Dunsche A, Frank MP, Lüttges J, Açil Y, Brasch J, Christophers E *et al.* Lichenoid reactions of murine mucosa associated with amalgam. *Br J Dermatol.* 2003; 148(4): 741-8.

Dutra WO, Moreira PR, Souza PE, Gollob KJ, Gomez RS. Implications of cytokine gene polymorphisms on the orchestration of the immune response: lessons learned from oral diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20(3): 223-32

Eisen D, Carrozzo M, Bagan Sebastian JV, Thongprasom K. Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis.* 2005; 11(6): 338-49.

Eisen D. Hydroxychloroquine sulfate (Plaquenil) improves oral lichen planus: An open trial. *J Am Acad Dermatol.* 1993; 28(4): 609-12.

Eisen D. The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol.* 2002; 46(2): 207-14.

Eisenberg E. Oral lichen planus: a benign lesion. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58(11): 1278-85.

Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Lichenoid dysplasia: a distinct histopathologic entity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; 60(3): 308-15.

Elad S, Levitt M, M Y S. Chronic graft-versus-host-disease involving the oral mucosa: clinical presentation and treatment. *Refuat Hapeh Vehashinayim.* 2008; 25(4): 19-27, 72.

El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA *et al.* Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature.* 2000; 404(6776): 398-402. Erratum in: *Nature* 2001; 412(6842): 99.

Epstein JB, Wan LS, Gorsky M, Zhang L. Oral lichen planus: progress in understanding its malignant potential and the implications for clinical management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96(1): 32-7.

Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijzers V, Westendorp RG, Huizinga TW: Interleukin 10 secretion in relation to human IL10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:9465.

Espinoza I, Rojas R, Aranda W, Gamonal J. Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32(10): 571-5.

Edwards PC, Kelsch R. Oral lichen planus: clinical presentation and management. J Can Dent Assoc. 2002; 68(8): 494-9.

Fernández-González F, Vázquez-Álvarez R, Reboiras-López D, Gándara-Vila P, García-García A, Gándara-Rey JM. Histopathological findings in oral lichen planus and their correlation with the clinical manifestations. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011; 16(5): e641-6.

Finne K, Göransson K, Winckler L. Oral lichen planus and contact allergy to mercury. Int J Oral Surg. 1982; 11(4): 236-9.

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S *et al*. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL6) gene on IL6 transcription and plasma IL6 levels, and association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. J Clin Invest. 1998; 102:1369.

Fox PC, van der Ven PF, Sonies BC, Weiffenbach JM, Baum BJ. Xerostomia: evaluation of a symptom with increasing significance. J Am Dent Assoc. 1985; 110(4): 519-25.

Franklin CD Jones AV. A survey of oral and maxillofacial pathology specimens submitted by general dental practitioners over a 30-year period. Br Dent J. 2006; 200(8): 447-50.

Friedman A, Weiner HL. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(14): 6688-92.

Fujita H, Kobayashi T, Tai H, Nagata M, Hoshina H, Nishizawa R, Takagi R, Yoshie H. Assessment of 14 functional gene polymorphisms in Japanese patients with oral lichen planus: a pilot case-control study. Int J Oral Maxillofac Surg. 2009; 38(9): 978-83.

Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukin-1beta+3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. J Clin Periodontol. 1998; 25(10): 781-5.

Gouvêa AF, Vargas PA, Coletta RD, Jorge J, Lopes MA. Clinicopathological features and immunohistochemical expression of p53, Ki-67, Mcm-2 and Mcm-5 in proliferative verrucous leukoplakia. J Oral Pathol Med. 2010; 39(6):447-52.

Gratwohl A, Hermans J, Apperley J, Arcese W, Bacigalupo A, Bandini G, di Bartolomeo P *et al*. Acute graft-versus-host disease: grade and outcome in

patients with chronic myelogenous leukemia. Working Party Chronic Leukemia of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 1995 15; 86(2): 813-8.

Guimarães AL, de Sá AR, Victoria JM, de Fátima Correia-Silva J, Gomez MV, Gomez RS. Interleukin-1beta and serotonin transporter gene polymorphisms in burning mouth syndrome patients. *J Pain*. 2006; 7(9): 654-8.

Hamilton JA, Whitty GA, Royston AK, Cebon J, Layton JE. Interleukin-4 suppresses granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor levels in stimulated human monocytes. *Immunology*. 1992; 76(4): 566-71.

Hancock WW, Khoury SJ, Carpenter CB, Sayegh MH. Differential effects of oral versus intrathymic administration of polymorphic major histocompatibility complex class II peptides on mononuclear and endothelial cell activation and cytokine expression during a delayed-type hypersensitivity response. *Am J Pathol*. 1994; 144(6): 1149-58.

Hoffstedt J, Eriksson P, Hellström L, Rössner S, Rydén M, Arner P. Excessive fat accumulation is associated with the TNF alpha-308 G/A promoter polymorphism in women but not in men. *Diabetologia*. 2000; 43(1): 117-20.

Holmstrup P, Schiøtz AW, Westergaard J. Effect of dental plaque control on gingival lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990; 69(5): 585-90.

Ingafo M, Leao JC, Porter SR, Scully C. Oral lichen planus: a retrospective study of 690 British patients. *Oral Dis*. 2006; 12(5): 463-8.

Issa Y, Duxbury AJ, Macfarlane TV, Brunton PA. Oral lichenoid lesions related to dental restorative materials. *Br Dent J*. 2005; 198(6): 361-6.

Ismail SB, Kumar SK, Zain RB. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J Oral Sci*. 2007; 49(2): 89-106.

Jahanshahi G, Aminzadeh A. A histochemical and immunohistochemical study of mast cells in differentiating oral lichen planus from oral lichenoid reactions. *Quintessence Int*. 2010; 41(3): 221-7.

Jin P, Panelli MC, Marincola FM, Wang E. Cytokine polymorphism and its possible impact on cancer. *Immunol Res*. 2004; 30(2): 181-90.

Jontell M, Hansson HA, Nygren H. Mast cell in oral lichen planus. J Oral Pathol, Copenhagen. 1986; 15(5): 273-275.

Jose M; Raghu AR; Rao NN. Evaluation of mast cells in oral lichen planus and oral lichenoid reaction. Indian J Dent Res. 2001; 12:175-9.

Khan A, Farah CS, Savage NW, Walsh LJ, Harbrow DJ, Sugerman PB. Th1 cytokines in oral lichen planus. J Oral Pathol Med. 2003; 32(2): 77-83.

Keen LJ. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. Transpl Immunol. 2002; 10(2-3): 143-6.

Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. J Clin Periodontol. 1997; 24(1): 72-7.

Köse O, Lalli A, Kutulola AO, Odell EW, Waseem A. Changes in the expression of stem cell markers in oral lichen planus and hyperkeratotic lesions. J Oral Sci. 2007; 49(2): 133-9.

Kovac-Kovacic M, Skaleric U. The prevalence of oral mucosal lesions in a population in Ljubljana, Slovenia. J Oral Pathol Med. 2000; 29(7): 331-5.

Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1978; 46(4): 518-39.

Krasse B. Risco de cárie - Um guia prático para avaliação e controle. 2. ed. São Paulo: Quintessence. Books, 1988. 113p.

Krutchkoff DJ, Cutler L, Laskowski S. Oral lichen planus: the evidence regarding potential malignant transformation. J Oral Pathol. 1978; 7(1): 1-7.

Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Lichenoid dysplasia: a distinct histopathologic entity. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1985; 60(3): 308-15.

Lanfranchi-Tizeira HE, Aguas SC, Sano SM. Malignant transformation of atypical oral lichen planus: a review of 32 cases. Med Oral. 2003; 8(1): 2-9.

Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Sorrell J, Duff GW, Kornman KS. Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. J Periodontal Res. 2000; 35(2): 102-7.

Lazarus M, Hajeer AH, Turner D, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE, *et al.* Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1997; 24(12): 2314-7.

Liles WC, Van Voorhis WC. Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *J Infect Dis.* 1995; 172(6): 1573-80.

Lind PO, Hurlen B, Lyberg T, Aas E. Amalgam-related oral lichenoid reaction. *Scand J Dent Res.* 1986; 94: 448-51.

Liu W, Dan H, Wang Z, Jiang L, Zhou Y, Zhao M *et al.* IFN-gamma and IL4 in saliva of patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese population. *Inflammation.* 2009; 32(3): 176-81.

Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 100(1): 40-51.

Lozada-Nur F, Miranda C. Oral lichen planus: topical and systemic therapy. *Semin Cutan Med Surg.* 1997; 16(4): 295-300.

Lupton GP, Goette DK. Lichen planus with plasma cell infiltrate. *Arch Dermatol.* 1981; 117(2): 124-5.

Macario-Barrel; Balguerie; Joly. Treatment of erosive oral lichen planus with thalidomide. *Ann Dermatol Venereol.* 2003; 130(12 Pt 1): 1109-12

Makhatadze NJ. Tumour necrosis factor locus: genetic organization and biological implications. *Hum Immunol.* 1998; 59: 571-9.

Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E *et al.* Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science.* 1994; 264(5162): 1152-6.

Márton K. Oral symptoms of immunologic disorders. Part I. Systemic autoimmune diseases. *Fogorv Sz.* 2003; 96(1): 9-15.

Matthews RW, Scully C. Griseofulvin in the treatment of oral lichen planus: adverse drug reactions, but little beneficial effect. *Ann Dent.* 1992; 51(2): 10-1.

Mattila R, Alanen K, Syrjänen S. Immunohistochemical study on topoisomerase IIalpha, Ki-67 and cytokeratin-19 in oral lichen planus lesions. *Arch Dermatol Res*. 2007; 298(8): 381-8.

McCartan BE, Lamey PJ. Expression of CD1 and HLA-DR by Langerhans cells (LC) in oral lichenoid drug eruptions (LDE) and idiopathic oral lichen planus (LP). *J Oral Pathol Med*. 1997; 26(4): 176-80.

McCartan BE, McCreary CE. Oral lichenoid drug eruptions. *Oral Dis*. 1997; 3(2): 58-63.

Medronho R, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL (eds.). *Epidemiologia*. 2ª Edição. São Paulo: Atheneu. 2009.

Mega H, Jiang WW, Takagi M. Immunohistochemical study of oral lichen planus associated with hepatitis C virus infection, oral lichenoid contact sensitivity reaction and idiopathic oral lichen planus. *Oral Dis*. 2001; 7(5): 296-305.

Moore KW, Malefyt RW, Coffman RL, O'garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19:683-765.

Müller S. Oral manifestations of dermatologic disease: a focus on lichenoid lesions. *Head Neck Pathol*. 2011; 5(1): 36-40.

Navas-Alfaro SE, Fonseca EC, Guzmán-Silva MA, Rochael MC. Análise histopatológica comparativa entre líquen plano oral e cutâneo. *J Bras Patol Med Lab*. 2003; 39(4): 351-60.

Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 694: 72-7.

Nyak L, Wolff A, Fedele S, Martin-Granizo R, Reichart PA, Lo Russo L *et al*. The Burden of Xerostomia in Independent Community-dwelling Older Adults: Results from the Saliwell Project. *Oral Biosci Med* 4/2004, S. 283-289. Disponível em: [<http://obm.quintessenz.de/index.php?doc=html&abstractID=9854>]. Acessado em: Setembro, 2011.

Nederfors T. Xerostomia and hyposalivation. *Adv Dent Res*. 2000; 14: 48-56.

Nelson DL. SNPs, linkage disequilibrium, human genetic variation and Native American culture. *Trends Genet*. 2001; 17(1): 15-6.

Slavkin HC. The human genome, implications for oral health and diseases, and dental education. *J Dent Educ*. 2001; 65(5): 463-79.

Nielsen R. Population genetic analysis of ascertained SNP data. *Hum Genomics*. 2004; 1(3): 218-24.

Nolan KF, Strong V, Soler D, Fairchild PJ, Cobbold SP, Croxton R *et al*. IL10-conditioned dendritic cells, decommissioned for recruitment of adaptive immunity, elicit innate inflammatory gene products in response to danger signals. *J Immunol*. 2004; 172(4): 2201-9.

Olivier V, Lacour JP, Mousnier A, Garraffo R, Monteil RA, Ortonne JP. Treatment of chronic erosive oral lichen planus with low concentrations of topical tacrolimus: an open prospective study. *Arch Dermatol*. 2002; 138(10): 1335-8.

Osailan S, Pramanik R, Shirodaria S, Challacombe SJ, Proctor GB. Investigating the relationship between hyposalivation and mucosal wetness. *Oral Dis*. 2011; 17(1): 109-14.

Ostman PO, Anneroth G, Skoglund A. Amalgam-associated oral lichenoid reactions. Clinical and histologic changes after removal of amalgam fillings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996; 81(4): 459-65.

Peçanha LM, Snapper CM, Lees A, Yamaguchi H, Mond JJ. IL10 inhibits T cell-independent but not T cell-dependent responses *in vitro*. *J Immunol*. 1993; 150(8 Pt 1): 3215-23.

Pawelczyk-Madalińska M, Sadlak-Nowicka J, Miernik-Kunc W. Clinical image of oral mucous membrane in rheumatoid arthritis patients. *Przegl Lek*. 2006; 63(5): 253-6.

Pezelj-Ribaric S, Prso IB, Abram M, Glazar I, Brumini G, Simunovic-Soskic M. Salivary levels of tumor necrosis factor-alpha in oral lichen planus. *Mediators Inflamm*. 2004; 13(2): 131-3.

Pinkus H. Lichenoid tissue reactions. A speculative review of the clinical spectrum of epidermal basal cell damage with special reference to erythema dyschromicum perstans. *Arch Dermatol*. 1973; 107(6): 840-6.

Pociot F, Mølviig J, Wogensén L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL1 beta) gene correlates with IL1 beta secretion *in vitro*. *Eur J Clin Invest*. 1992; 22(6): 396-402.

Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. *In vitro* production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet*. 1999; 26: 1-3.

Pujol T, Coma M, Pujol M, Postigo P. Prevalence of xerostomia in the general population. *Aten Primaria*. 1998; 21(4): 225-8.

Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Ledo I, Uitto J. Interleukin 10 up-regulates elastin gene expression in vivo and in vitro at the transcriptional level. *Biochem J*. 1994; 302 (Pt 2): 331-3.

Remick DG. Cytokines and cytokine receptors: Principles of action. In: Kronfol Z, editor. *Cytokines and mental health*. Boston: Kluwer Academic. 2003; 1-14.

Rhodus NL, Cheng B, Myers S, Bowles W, Ho V, Ondrey F. A comparison of the pro-inflammatory, NF-kappaB-dependent cytokines: TNF-alpha, IL1-alpha, IL6, and IL8 in different oral fluids from oral lichen planus patients. *Clin Immunol*. 2005; 114(3): 278-83.

Rhodus NL, Cheng B, Bowles W, Myers S, Miller L, Ondrey F. Proinflammatory cytokine levels in saliva before and after treatment of (erosive) oral lichen planus with dexamethasone. *Oral Dis*. 2006; 12(2): 112-6.

Rhodus NL, Cheng B, Ondrey F. Th1/Th2 cytokine ratio in tissue transudates from patients with oral lichen planus. *Mediators Inflamm*. 2007; 2007:19854.

Ribeiro BF, Albuquerque ACL, Barroso KMA, Carvalho SHG, Soares MSM. Marcadores Biológicos e Etiopatogenia do Líquen plano bucal. *Odontol Clín Cient*. 2009; 9(1): 19-23.

Roustan G, Hospital M, Villegas C, Sanchez Yus E, Robledo A. Lichen planus with predominant plasma cell infiltrate. *Am J Dermatopathol*. 1994; 16(3): 311-4.

Sahebamee M, Arbabi-Kalati F. Management of oral lichen planus. *Arch Iranian Med*. 2005; 8(4): 252-6.

Sakamoto K, Oka M, Yoshino S, Hazama S, Abe T, Okayama N *et al*. Relation between cytokine promoter gene polymorphism and toxicity of 5-fluorouracil plus cisplatin chemotherapy. *Oncol Rep*. 2006; 16(2): 381-7.

Samman PD. A note on the natural history of lichen planus. *Br J Dermatol*. 1956; 68(5): 175-81.

Santtila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of the IL1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL1beta production in vitro. *Scand J Immunol*. 1998; 47(3): 195-8.

Schein OD, Hochberg MC, Muñoz B, Tielsch JM, Bandeen-Roche K, Provost T *et al.* Dry eye and dry mouth in the elderly: a population-based assessment. *Arch Intern Med.* 1999; 159(12): 1359-63.

Scully C, Beyli M, Ferreiro MC, Ficarra G, Gill Y, Griffiths M *et al.* Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(1):86-122.

Scully C. Drug effects on salivary glands: dry mouth. *Oral Dis.* 2003 Jul;9(4):165-76.

Scully C, Bagan JV. Adverse drug reactions in the orofacial region. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004 Jul 1;15(4):221-39.

Schena D, Fantuzzi F, Girolomoni G. Contact allergy in chronic eczematous lip dermatitis. *Eur J Dermatol.* 2008 Nov-Dec;18(6):688-92.

Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR, Rea TH, Modlin RL. Immunosuppressive roles for IL10 and IL4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J Immunol.* 1993 Jun 15;150(12):5501-10.

Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada-Nur F. A prospective follow-up study of 570 patients with oral lichen planus: persistence, remission, and malignant association. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985 Jul;60(1):30-4.

Sivula J, Turpeinen H, Volin L, Partanen J. Association of IL10 and IL10Rbeta gene polymorphisms with graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling donor. *BMC Immunol.* 2009 May 4;10:24.

Smith AJ, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Feb;20(1):43-59.

Soares AB, Faria PR, Magna LA, Correa ME, de Sousa CA, Almeida OP *et al.* Chronic GVHD in minor salivary glands and oral mucosa: histopathological and immunohistochemical evaluation of 25 patients. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(6):368-73.

Sonis ST. The biologic role for nuclear factor-kappaB in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13(5): 380-9.

Sontheimer RD. Lichenoid tissue reaction/interface dermatitis: clinical and histological perspectives. *J Invest Dermatol*. 2009;129(5):1088-99.

Souza FACG, Rosa LEB. Líquen plano bucal: considerações clínicas e histopatológicas. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2008; 74(2):284-92.

Steffen C, Dupree ML. Louis-Frédéric Wickham and the Wickham's striae of lichen planus. *Skinmed*. 2004; 3(5):287-9.

Stoopler ET, Sollecito TP, DeRossi SS. Topical Tacrolimus for the Treatment of Oral Lichen Planus. *The Internet Journal of Dermatology*. 2003; 2(1). Disponível em: [<http://www.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-dermatology/volume-2-number-1/topical-tacrolimus-for-the-treatment-of-oral-lichen-planus.html>]. Acesso em: Fevereiro, 2011.

Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A *et al*. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(4): 350-65.

Tagore A, Gonsalkorale WM, Pravica V, Hajeer AH, McMahon R, Whorwell PJ *et al*. Interleukin-10 (IL10) genotypes in inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens*. 1999; 54(4): 386-90.

Takahashi H, Furukawa T, Hashimoto S, Suzuki N, Kuroha T, Yamazaki F *et al*. Contribution of TNF- α and IL10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2000; 26: 1317–23.

Takashiba S, Naruishi K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol*. 2000; 40: 94-106.

Tao XA, Li CY, Rhodus NL, Xia J, Yang XP, Cheng B. Simultaneous detection of IFN- γ and IL4 in lesional tissues and whole unstimulated saliva from patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2008; 37(2): 83-7.

Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, Duff GW. Polymorphism in human IL1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet*. 1993; 91(4): 403-4.

te Velde AA, Huijbens RJ, Heije K, de Vries JE, Figdor CG. Interleukin-4 (IL4) inhibits secretion of IL1 β , tumor necrosis factor α , and IL-6 by human monocytes. *Blood*. 1990; 76(7): 1392-7.

Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson Genética Médica. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Thornhill MH, Sankar V, Xu XJ, Barrett AW, High AS, Odell EW, Speight PM *et al.* The role of histopathological characteristics in distinguishing amalgam-associated oral lichenoid reactions and oral lichen planus. J Oral Pathol Med. 2006; 35(4): 233-40.

Torgerson RR, Davis MDP, Bruce AJ, Farmer SA, Rogers III S. Contact allergy in oral disease. Journal of the American Academy of Dermatology. 2007; 57(2), 315-21.

Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. J Clin Periodontol. 2003; 30(5): 438-42.

Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. Eur J Immunogenet. 1997; 24(1): 1-8.

van der Meij EH, van der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. J Oral Pathol Med. 2003; 32(9): 507-12.

van der Meij EH, Mast H, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective five-year follow-up study of 192 patients. Oral Oncol. 2007; 43(8): 742-8.

van der Waal I. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions; a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2009; 14(7): E310-4.

Vilcek J. The cytokines: an overview. In: Thompson MT, editor. The cytokines handbook. 4 ed. Amsterdam: Elsevier; 2003. V.1. p. 3.

Villar, CC. Análise comparativa das características microscópicas da lesão líquenóide na GVHD crônica e no líquen plano de boca / Cristina Cunha Villar. Piracicaba, SP: [s.n.]. 2001.

Vincent SD, Fotos PG, Baker KA, Williams TP. Oral lichen planus: the clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1990; 70:165-71.

Virdi MS, Reader AS, Gupta A, Aggarwal KK. Lichen Planus Or Lichenoid Dysplasia : Is It Premalignant!. The Internet Journal of Head and Neck Surgery. 2010; 4(2). Disponível em: [<http://www.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-head-and-neck-surgery/volume-4-number-2/lichen-planus-or-lichenoid-dysplasia-is-it-premalignant.html>]. Acessado em outubro, 2011.

Visentainer JEL, Sell AM, Franceschi DA, Lieber SR, Souza CA. Importância de polimorfismos de genes reguladores de citocinas em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008; 44(4): 739-48.

Warin RP, Crabb HS, Darling AI. Lichen planus of the mouth. Br Med J. 1958; 1(5077): 983-4.

Warnakulasuriya; Johnson; van der Waal. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. J Oral Pathol Med. 2007; 36(10): 575-80.

Wickham L. Sur un signe pathognomonique du lichen du Wilson (lichen plan). Ann Dermatol Syphiligr (Paris). 1895; 6: 517-520.

WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1978;46:518-39.

Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AIF, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNFa) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. Hum Mol Genet 1992; 1: 353.

Wilson AG, Symons JA, Mcdowell TL, Mcdevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci. 1997; 94: 3195-99.

Wilson E. Clinical Illustrations of Cutaneous Disease. Br Med J. 1871; 1(545): 608-9.

Woo SB, Lee SJ, Schubert MM. Graft-vs.-host disease. Crit Rev Oral Biol Med. 1997; 8(2): 201-16.

Xavier GM, de Sá AR, Guimarães AL, da Silva TA, Gomez RS. Investigation of functional gene polymorphisms interleukin-1beta, interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor in individuals with oral lichen planus. J Oral Pathol Med. 2007; 36(8): 476-81.

Xue JL, Fan MW, Wang SZ, Chen XM, Li Y, Wang L. A clinical study of 674 patients with oral lichen planus in China. *J Oral Pathol Med*. 2005; 34(8): 467-72.

Yamamoto T, Osaki T. Characteristic cytokines generated by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Invest Dermatol*. 1995; 104(5): 784-8.

Zhang Y, Lin M, Zhang S, Wang Z, Jiang L, Shen J *et al*. NF-kappaB-dependent cytokines in saliva and serum from patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese population. *Cytokine*. 2008; 41(2): 144-9.

Zhao ZZ, Savage NW, Pujic Z, Walsh LJ. Immunohistochemical localization of mast cells and mast cell-nerve interactions in oral lichen planus. *Oral Dis*. 1997; 3(2): 71-6.

Zhao ZZ, Savage NW, Walsh LJ. Associations between mast cells and laminin in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 1998; 27(4): 163-7.

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

FOP-UNICAMP: Av. Limeira, 901 – Areião, Piracicaba, SP – Brasil, CEP: 13414-903 / Fone: 19-21065317/21065266UFPE:
Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235 - Cidade Universitária. Recife, PE – Brasil, CEP: 50.670-901/ Fone: 81-
21268817



Termo De Consentimento Livre e Esclarecido GRUPOS 1 (LPO), 2 (RL) e 3 (DECH) – Grupos de Estudo

O Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa intitulada “Caracterização e comparação do polimorfismo de genes e citocinas das respostas Th1 e Th2 nas doenças imunologicamente mediadas com manifestação bucal: Líquen plano oral (LPO), reação liquenóide (RL) e doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)” que será realizada por Camila Maria Beder Ribeiro, aluna do curso de Doutorado em Estomatopatologia da UNICAMP, a qual também recolherá o seu consentimento, realizará um questionário e colherá os dados necessários para a realização da pesquisa. Este trabalho está sob a orientação dos professores Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, do departamento de Patologia da FOP UNICAMP, e Prof. Dr. Jair Carneiro Leão, do departamento de Estomatologia da UFPE.

Justificativa e objetivos: Através desse estudo e de estudos futuros decorrentes deste, poderemos ajudar a desenvolver novos tratamentos para o Líquen Plano Oral (LPO), Reação Liquenóide (RL) e a Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH), visando minimizar a propensão de aparecimento desta doença. Este estudo visa correlacionar com o LPO as diferenças entre os genes (que contém a informação genética dos indivíduos) e citocinas (proteínas envolvidas na inflamação que são produzidas pelas células de defesa do organismo humano, ou seja, os linfócitos Th1 e Th2) que facilitam a inflamação do corpo humano.

Informações: Procedimentos: O Sr. (a) passará por um exame clínico da boca para confirmar a presença do LPO e a sua boca será fotografada. Será realizado um questionário para obtenção dos relativos ao seu nome, endereço e história clínica da doença. Nesta pesquisa, indivíduos novos e alguns antigos, proveniente do banco de dados das instituições relacionadas, deverão ser submetidos à biópsia da lesão, que é um exame complementar necessário para a visualização das características histológicas da lesão com o objetivo diagnóstico. O Sr. (a) passará por anestesia local, incisão com lâmina de bisturi, remoção de uma amostra de tecido e sutura da região. O Sr.(a) receberá informações e orientações pós-operatórias e receberá uma prescrição de analgésicos em caso de desconforto relativos ao procedimento cirúrgico. Serão coletadas duas amostras de saliva, na primeira, o Sr.(a) deverá expelir a toda a saliva por um período de 5 minutos em um recipiente plástico; a segunda coleta da saliva será por meio de bochecho com uma solução açucarada com o objetivo de estimular a produção da saliva e o paciente o Sr. (a) deverá raspar a língua contra as bochecha, para que as células superficiais se destaquem da mucosa da boca, e deverá depositar o conteúdo em um segundo recipiente plástico. Uma amostra de sangue será coletada com um tubo de coleta com agulha estéril. Esta pesquisa não é um ensaio clínico, portanto, não há grupo placebo. Não há métodos alternativos existentes. Atenção da informação desejada nesta pesquisa.

Desconfortos, riscos previsíveis e benefícios esperados:

O paciente submetido à pesquisa poderá correr o risco de desconfortos durante o exame clínico, riscos de reações adversas relacionados ao procedimento de biópsia, tais como: alergia ao anestésico, complicações hemorrágicas, complicações pós-operatórias, riscos de hematomas e desconfortos durante a coleta de sangue, e sofrer constrangimentos durante a anamnese ou durante o procedimento de coleta dos dados sócio-demográficos, porém a pesquisadora tentará minimizá-los. Os participantes receberão atendimento especializado para o LPO, RL e DECH e as condições de saúde serão avaliadas e o Sr. (a) será orientado (a) de acordo com a necessidade de tratamento individual e encaminhado para as devidas clínicas especializadas. Nesta pesquisa não há benefícios diretos aos voluntários participantes. **Forma de acompanhamento e assistência:** Os pesquisadores estarão à disposição para quaisquer esclarecimentos adicionais pessoalmente, por fone ou e-mail (modo de contato abaixo).

Garantias: Garantia de esclarecimentos: Os pesquisadores esclarecerão os voluntários quanto a todos os aspectos da pesquisa, antes, durante e após a mesma. Liberdade de recusa à participação ou de retirar o seu consentimento: O Sr. (a) pode escolher não participar de nossa pesquisa, ou desistir da participação, se achar necessário, em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalização e sem prejuízo, inclusive do seu atendimento clínico. **Sigilo:** Seus dados pessoais serão mantidos em sigilo. **Ressarcimento e indenização:** Não há gastos previstos pela participação na pesquisa e, portanto, não há previsão de ressarcimento, com exceção dos indivíduos que serão convocados, que serão ressarcidos pelos gastos referentes ao seu deslocamento. Não há riscos previsíveis pela participação na pesquisa e, portanto, não há previsão de indenização. Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para contato com os pesquisadores: Camila M. B. Ribeiro e Prof. Jacks Jorge: Av. Limeira, 901, Areião, Piracicaba-SP, Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, Fones: 19 2106-5317/5266 – camilaribeiro@fop.unicamp.br – jacks@fop.unicamp.br / Prof. Jair Carneiro Leão: Av Prof. Moraes Rêgo nº 1235, Cidade Universitária, 1º andar. Fone: 81-21268817 – jleao@ufpe.br

Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como voluntário de pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FOP: Av Limeira 901, FOP-Unicamp, CEP 13414-903, Piracicaba – SP. Fone/Fax 19-21065349, e-mail cep@fop.unicamp.br e webpage: www.fop.unicamp.br/cep

Eu _____, R.G. _____,
CPF _____, concordo em participar da pesquisa intitulada “Caracterização e
comparação do polimorfismo de genes e citocinas das respostas Th1 e Th2 nas doenças imunologicamente mediadas com

manifestação bucal: líquen plano oral (LPO), reação liquenóide (RL) e doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)"

Nome e Assinatura

Data / /

APÊNDICE 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



FOP-UNICAMP: Av. Limeira, 901 – Areião, Piracicaba, SP – Brasil, CEP: 13414-903 / Fone: 19-21065317/21065266
UFPE: Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235 - Cidade Universitária. Recife, PE – Brasil, CEP: 50.670-901 / Fone: 81-21268817

Termo De Consentimento Livre e Esclarecido GRUPOS 4 (GC-LPO), 5 (GC-RL) e 6 (CG-DECH) – Grupos Controles

O Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa intitulada “Caracterização e comparação do polimorfismo de genes e citocinas das respostas Th1 e Th2 nas doenças imunologicamente mediadas com manifestação bucal: líquen plano oral (LPO), reação liquenóide (RL) e doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)” que será realizada por Camila Maria Beder Ribeiro, aluna do curso de Doutorado em Estomatopatologia da UNICAMP, o qual também recolherá o seu consentimento, realizará um questionário e colherá os dados necessários para a realização da pesquisa. Este trabalho está sob a orientação dos professores Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, do departamento de Patologia da FOP UNICAMP, e Prof. Dr. Jair Carneiro Leão, do departamento de Estomatologia da UFPE.

Justificativa e objetivos: Através desse estudo e de estudos futuros decorrentes deste, poderemos ajudar a desenvolver novos tratamentos para o Líquen Plano Oral (LPO), Reação Liquenóide (RL) e a Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH), visando minimizar a propensão de aparecimento desta doença. Este estudo visa correlacionar com o LPO as diferenças entre os genes (que contém a informação genética dos indivíduo) e citocinas (proteínas envolvidas na inflamação que são produzidas pelas células de defesa do organismo humano, ou seja, os linfócitos Th1 e Th2) que facilitam a inflamação do corpo humano.

Informações: Procedimentos: O Sr. (a) passará por um exame clínico da boca para confirmar a presença do LPO e a sua boca será fotografada. Será realizado um questionário para obtenção dos relativos ao seu nome, endereço e história clínica da doença. Serão coletadas duas amostras de saliva, na primeira, o Sr.(a) deverá expelir a toda a saliva por um período de 5 minutos em um recipiente plástico; a segunda coleta da saliva será por meio de bochecho com uma solução açucarada com o objetivo de estimular a produção da saliva e o paciente o Sr. (a) deverá raspar a língua contra as bochechas, para que as células superficiais se destaquem da mucosa da boca, e deverá depositar o conteúdo em um segundo recipiente plástico. Uma amostra de sangue será coletada com um tubo de coleta com agulha estéril. Esta pesquisa não é um ensaio clínico, portanto, não há grupo placebo. Não há métodos alternativos existentes para obtenção da informação desejada nesta pesquisa. **Desconfortos, riscos previsíveis e benefícios esperados:** O paciente submetido à pesquisa poderá correr o risco durante o exame clínico, riscos de reações adversas relacionados ao procedimento de biópsia, tais como: alergia ao anestésico, complicações hemorrágicas, complicações pós-operatórias, riscos de hematomas e desconfortos durante a coleta de sangue, e sofrer constrangimentos durante a anamnese ou durante o procedimento de coleta dos dados sócio-demográficos, porém a pesquisadora tentará minimizá-los. Os participantes receberão atendimento especializado para o LPO e as condições de saúde serão avaliadas e o Sr. (a) será orientado (a) de acordo com a necessidade de tratamento individual e encaminhado para as devidas clínicas especializadas. Nesta pesquisa não há benefícios diretos aos voluntários participantes. **Forma de acompanhamento e assistência:** Os pesquisadores estarão à disposição para quaisquer esclarecimentos adicionais pessoalmente, por fone ou e-mail (modo de contato abaixo).

Garantias: Garantia de esclarecimentos: Os pesquisadores esclarecerão os voluntários quanto a todos os aspectos da pesquisa, antes, durante e após a mesma. Liberdade de recusa à participação ou de retirar o seu consentimento: O Sr. (a) pode escolher não participar de nossa pesquisa, ou desistir da participação, se achar necessário, em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalização e sem prejuízo, inclusive do seu atendimento clínico. **Sigilo:** Seus dados pessoais serão mantidos em sigilo. **Ressarcimento e indenização:** Não há gastos previstos pela participação na pesquisa e, portanto, não há previsão de ressarcimento, com exceção dos indivíduos que serão convocados, que serão ressarcidos pelos gastos referentes ao seu deslocamento. Não há riscos previsíveis pela participação na pesquisa e, portanto, não há previsão de indenização. Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para contato com os pesquisadores: Camila M. B. Ribeiro e Prof. Jacks Jorge: Av. Limeira, 901, Areião, Piracicaba-SP, Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, Fones: 19 2106-5317/5266 – camilaribeiro@fop.unicamp.br – jacks@fop.unicamp.br / Prof. Jair Carneiro Leão: Av Prof. Moraes Rêgo nº 1235, Cidade Universitária, 1º andar. Fone: 81-21268817 – jleao@ufpe.br

Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como voluntário de pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FOP: Av Limeira 901, FOP-Unicamp, CEP 13414-903, Piracicaba – SP. Fone/Fax 19-21065349, e-mail cep@fop.unicamp.br e webpage: www.fop.unicamp.br/cep

Eu _____, R.G. _____,
CPF _____, concordo em participar da pesquisa intitulada “Caracterização e comparação do polimorfismo de genes e citocinas das respostas Th1 e Th2 nas doenças imunologicamente mediadas com manifestação bucal: líquen plano oral (LPO), reação liquenóide (RL) e doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)”

Nome e Assinatura

Data / /

APÊNDICE 3

QUESTIONÁRIOS DA PESQUISA



QUESTIONÁRIO DA PESQUISA PARA OS GRUPOS 1 (LPO, RLO-RAM e DECHc) – Grupos de Estudo

“Caracterização e comparação do polimorfismo de genes e citocinas das respostas Th1 e Th2 nas doenças imunologicamente mediadas com manifestação bucal: líquen plano oral (LPO), reação liquenóide (RL) e doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)”

Sigla do Hosp. Paciente No. Data: / / Grupo

Iniciais do Paciente:

Endereço:

Telefone para contato: (Falar com:)

Cor da pele:

☐ Leucoderma ☐ Melanoderma ☐ Feoderma

História da doença atual (queixa principal e duração):

Uso de medicamentos de rotina? Quais?

Fuma? S ☐ N ☐ Quanto? Tipo?

Bebe? S ☐ N ☐ Quanto? Tipo?

Outros hábitos orais? S ☐ N ☐ Tipo?

Fluxo salivar: mL/min

Hipossalivação S ☐ N ☐

Análise clínica OMS Exame da cavidade Oral

Lesão : S ☐ N ☐

Descrever as lesões visíveis e localização detalhada

Lesões estriadas S ☐ N ☐

Lesões bilaterais S ☐ N ☐

Lesões ulceradas S ☐ N ☐

Análise Histopatológica

HE: Descrição da lâmina:

Infiltrado linfocitário em banda S ☐ N ☐

Degeneração hidrópica da camada basal S ☐ N ☐

Displasia S ☐ N ☐

Resultado final: _____ (1- LPO; 2 – RLO-RAM)

Análises Imunoistoquímica

Anticorpos: Médias

CD-3
CD-8
CD-20
Plasma Cell
Mast Cell

1: + ; 2: ++; 3: +++; 4: ++++

Análise do DNA da saliva – PCR Quantitativa

Resultado da PCR Th1: _____ Resultado da PCR Th2: _____

Gene	Resultados
IL1 β ,	
TNF- α	
IL-4	
IL-10	

APÊNDICE 4

QUESTIONÁRIOS DA PESQUISA



QUESTIONÁRIO DA PESQUISA PARA GRUPOS 2 e 3 (Controles para hipossalivação e controles caucasóides)–

“Caracterização e comparação do polimorfismo de genes e citocinas das respostas Th1 e Th2 nas doenças imunologicamente mediadas com manifestação bucal: líquen plano oral (LPO), reação liquenóide (RL) e doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)”

Sigla do Hosp. Paciente No. Data: / / Grupo

Iniciais do Paciente:

Endereço:

Telefone para contato: (Falar com:)

Cor da pele:

☐ Leucoderma ☐ Melanoderma ☐ Feoderma

História da doença atual (queixa principal e duração):

Uso de medicamentos de rotina? Quais?

Fuma? S ☐ N ☐ Quanto? Tipo?

Bebe? S ☐ N ☐ Quanto? Tipo?

Outros hábitos orais? S ☐ N ☐

Exame da cavidade Oral

Lesão : S ☐ N ☐

Fluxo salivar: mL/min

Hipossalivação S ☐ N ☐

APENAS PARA OS CONTROLES CAUCASÓIDES: ^

Análise do DNA da saliva – PCR Quantitativa

Resultado da PCR Th1: Resultado da PCR Th2:

Gene	Resultados
IL1 β ,	
TNF- α	
IL-4	
IL-10	

ANEXO – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA FOP-UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - Certificado	http://www.fop.unicamp.br/cep/sistema/certificado.php?Protocolo=011...	
	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO		
O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Caracterização e comparação do polimorfismo de genes e citocinas das respostas Th1 e Th2 nas doenças imunologicamente mediadas com manifestação bucal: líquen plano oral (LPO), reação liquenóide (RL) e doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (cDECH)", protocolo nº 011/2009, dos pesquisadores Camila Maria Beder Ribeiro, Jacks Jorge Junior, Jair Carneiro Leão e Maria Elvira Pizzigatti Correa, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 14/04/2009. The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Characterization and comparison of the genes and cytokines polymorphisms of Th1 and Th2 responses in immunologically mediated diseases with oral manifestations: oral lichen planus (LPO), reaction lichenoid (RL) and chronic graft versus host disease (cGVHD)", register number 011/2009, of Camila Maria Beder Ribeiro, Jacks Jorge Junior, Jair Carneiro Leão and Maria Elvira Pizzigatti Correa, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at .		
 Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas Secretário CEP/FOP/UNICAMP	 Prof. Dr. Jacks Jorge Junior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP	
Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.		
1 de 1	27/04/2009 15:47	

