



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Trabalho de conclusão de curso

Título: Caracterização histológica e imunoistoquímica do infiltrado inflamatório e comparação com dosagem de citocinas das respostas Th1 e Th2 nas doenças imunologicamente mediadas com manifestação bucal: líquen plano oral (LPO) e reação liquenóide (RL).

Aluno: Douglas Cardoso de Siqueira

Orientador: Jacks Jorge Junior

Ano de conclusão do curso: 2011

A handwritten signature in black ink, appearing to be "J.J. Jr.", written in a cursive style.

Assinatura do orientador

Douglas Cardoso de Siqueira

Caracterização histológica e imunoistoquímica do infiltrado inflamatório e comparação com dosagem de citocinas das respostas Th1 e Th2 nas doenças imunologicamente mediadas com manifestação bucal: líquen plano oral (LPO) e reação liquenóide (RL).

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp, para obtenção do diploma de Cirurgião-dentista.

Orientador: Professor Dr. Jacks Jorge Jr.

Piracicaba 2011

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Si75c Siqueira, Douglas Cardoso de, 1987-
Caracterização histológica e imunoistoquímica do infiltrado inflamatório e comparação com dosagem de citocinas das respostas Th1 e Th2 nas doenças imunologicamente mediadas com manifestação bucal: líquen plano oral (LPO) e reação liquenóide (RL) / Douglas Cardoso de Siqueira. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Jacks Jorge Júnior.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Erupções liquenóides. I. Jorge Júnior, Jacks,
1962- II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Dedico esse trabalho a meus familiares, os quais sempre estiveram sempre perto durante a minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meus pais e avós, pois sou o que sou e estou aonde cheguei, por terem acreditado em mim e me apoiado em tudo que quis fazer.

A meus irmãos, aos quais amo muito.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, todos os professores e amigos que lá fiz e vou levar para o resto da vida.

Em especial aos professores da área de Estomatologia, que me acolheram e me deram a oportunidade de crescer como pessoa e profissional. Ao Professor Marcio Ajudarte Lopes pelos conselhos e ensinamentos, e ao professor Jacks Jorge Junior por me orientar e ter paciência perante minhas dúvidas.

Aos funcionários da faculdade, em especial aos da clínica de graduação que estavam sempre dispostos a ajudar.

Ao meu Anjinho da guarda, estive e espero que esteja presente por toda minha vida.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi a realização da caracterização histológica e imunoistoquímica do infiltrado inflamatório das respostas Th1 e Th2 nas doenças imunologicamente mediadas com manifestação bucal: líquen plano oral (LPO) e reação liquenóide oral associada à restauração de amálgama (RLO-RAM). Pacientes foram distribuídos em 2 grupos, sendo 1 grupo de casos (grupo 1) composto por pacientes portadores de lesões liquenóides (LL) (n=39), e 1 grupo controle (grupo 2) (n=39) composto por pacientes não portadores de LL. Foram coletadas amostras de saliva para a mensuração do fluxo salivar para comparação entre os grupos 1 e 2. A análise histopatológica imuno-histoquímica foi realizada para os anticorpos que caracterizam resposta inflamatória (CD3, CD8, CD20). Os dados foram comparados através de tabelas de contingência e teste de exato de Fisher no caso de variáveis categóricas, e através de média, desvio-padrão, mediana e do teste Mann-Whitney. Foram analisados 39 casos de LL, destes 30 casos foram de LPO, sendo esses 10 em pacientes do sexo masculino e 20 em pacientes do gênero feminino. Para a RLO-RAM, foram observados 9 casos distribuídos da seguinte forma: 2 casos ocorreram em pacientes do sexo masculino e 7 ocorreram em pacientes do sexo feminino. Observou-se ainda que as LL sejam elas LPO ou RLO-RAM afetaram mais pacientes do sexo feminino. A média de idade dos grupos 1 e 2 foi de 53,13 anos. Os pacientes portadores de LL têm maior índice de hipossalivação do que indivíduos saudáveis. De acordo com os critérios da OMS, foi possível observar que as lesões estriadas estavam presentes em todos os casos de LL; o critério de lesões bilaterais foi estatisticamente mais presente em lesões de LPO. Com relação aos critérios de ulceração não foram observadas diferenças estatísticas entre o LPO e RLO-RAM. De acordo com os critérios histopatológicos da OMS não foram observadas diferenças estatísticas entre as duas lesões com relação à presença do infiltrado inflamatório em banda. Os demais aspectos histopatológicos analisados, apenas a presença de infiltrado inflamatório profundo foi significativamente mais presente em lesões de RLO-RAM. Os resultados imunoistoquímicos mostraram que a contagem de células entre o CD3 e o CD8 não foram observadas diferenças estatisticamente

significantes, contudo foi possível observar que CD20 constituiu um bom marcador para diferenciar LPO da RLO-RAM ($p < 0,05$). Por meio da metodologia empregada foi possível observar que LL são mais prevalentes em pacientes do gênero feminino e idades em torno de 53 anos. A hipossalivação é um sinal presente em pacientes portadores de LL, e de acordo com os critérios clínico da OMS para LL, apenas a presença de lesões bilaterais constituiu um bom diferenciador entre o LPO e a RLO-RAM. De acordo com os critérios histopatológicos da OMS não foi possível diferenciar as duas entidades patológicas. A presença de infiltrado inflamatório profundo foi mais prevalente em lesões de RLO-RAM e por fim, a imunistoquímica para o anticorpo CD20 pode ser um bom marcador na diferenciação destas duas LL.

Palavras-chave: Líquen Plano Oral. Erupções liquenóides/induzida quimicamente. Imunistoquímica.

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the performance of histology and immunohistochemistry of the inflammatory infiltrate of the Th1 and Th2 responses in immune-mediated diseases with oral manifestation, oral lichen planus (OLP) and oral lichenoid reaction associated with amalgam restoration (OFR-RAM). Patients were divided into two groups, one group of cases (group 1) consisting of patients with lichenoid lesions (LL) (n = 39), and a control group (group 2) (n = 39) composed of patients without LL. Saliva samples were collected for the measurement of salivary flow for comparison between groups 1 and 2. Histopathology Immunohistochemistry was performed to characterize the antibodies that the inflammatory response (CD3, CD8, CD20). Data were compared using contingency tables and Fisher's exact test in case of categorical variables and as mean, standard deviation, median and Mann-Whitney test. We analyzed 39 cases of LL, 30 of these were cases of OLP, and these 10 patients were male and 20 female patients. For OFR-RAM, 9 cases were observed distributed as follows: two cases occurred in males and 7 occurred in female patients. We also observed that the LL whether LPO OFR-RAM or more affected females. The average age of groups 1 and 2 was 53.13 years. Patients with LL index hyposalivation are more than healthy individuals. According to the WHO criteria, we observed that striatal lesions were present in all cases of LL, the criterion of bilateral lesions was statistically more frequent in lesions of OLP. With regard to the criteria of ulceration were not statistical differences between the LPO and ROS-RAM. According to the WHO histopathological criteria were not significant differences between the two lesions with respect to the presence of inflammatory infiltrate in the band. The other histopathological aspects analyzed, only the presence of deep inflammatory infiltrate was present in significantly more lesions OFR-RAM. The immunohistochemical results showed that the cell count between the CD3 and CD8 were not statistically significant differences, however it was observed that CD20 was a good marker to differentiate between the BLF-RAM LPO ($p < 0.05$). Through the methodology it was observed that LL are more prevalent in female patients and aged around 53 years. The hyposalivation is a signal

present in patients with LL, and according to the WHO clinical criteria for LL, only the presence of bilateral lesions was a good differentiator between the LPO and ROS-RAM. According to the WHO histopathological criteria was not possible to differentiate the two pathologies. The presence of inflammatory infiltrate was more prevalent in deeper lesions OFR-RAM and finally, the immunohistochemistry for CD20 antibody may be a good marker to differentiate these two LL.

Keywords: Oral Lichen Planus. Lichenoid Eruptions / chemically induced. Immunohistochemistry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
3 PROPOSIÇÃO	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

As doenças imunologicamente mediadas compõem um grupo amplo e 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; Alanen; Syrjänen, 2007).

A presença de lesões bucais associadas a essas condições é freqüente e em muitas situações pode ser a primeira manifestação da doença, sendo parte importante do quadro clínico, e não raro apresentando controle complexo. Dentro deste grupo, encontram-se lesões como a reação liquenóide oral relacionada ao amálgama (RLO-RAM) além de outras de curso clínico mais complexo e que acometem mais estruturas, como as diversas formas de líquen plano oral (LPO), o penfigóide benigno das mucosas, o pênfigo vulgar e a doença do enxerto contra hospedeiro crônica (cDECH). Todas estas representam entidades de particular interesse à Estomatologia/Patologia Bucal.

Por outro lado, as doenças como o LPO, a RLO e a cDECH, apresentam sintomatologias clínicas muito semelhantes e podem ser agrupadas em um estudo único, além de haver uma necessidade de compreensão mais adequada das suas etiopatogenias de modo a possibilitar um manejo clínico mais adequado (DeRossi; Ciarrocca, 2005).

Apesar de possuírem mecanismos patogênicos distintos, estas lesões orais apresentam-se clinicamente semelhantes, como estrias brancas e liquenóides que se estendem ao longo das mucosas orais. Tais mecanismos parecem estar relacionados à ocorrência de eventos mediados por alterações da resposta imune por isso 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 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 ao desenvolvimento de alvos terapêuticos e tratamentos alvos-específicos que visem potencializar

resultados (controle da doença) e minimizar os efeitos observados na terapêutica atual (Scully et al., 1998).

Embora a resposta imunológica pareça ser similar, muitos autores têm objetivado estabelecer uma caracterização histopatológica e imunoistoquímica do infiltrado inflamatório e dos eventos celulares a fim de relacioná-los com as manifestações clínicas destas doenças (McCartan; Lamey, 1997; Mega; Jiang; Takagi, 2001; Soares et al., 2005; Bascones-Ilundain et al., 2006; Köse et al., 2007).

Portanto, esse projeto objetiva analisar as características clínico-patológicas das LLs, o que poderá possibilitar uma melhor compreensão dos mecanismos patogênicos destas lesões. Ainda, a avaliação genética de dois grupos da população brasileira poderá ser importante a fim de possibilitar uma comparação com outras populações e a determinação de um possível padrão universal que poderá vir a ser considerado como eventual foco para tratamentos mais efetivos e específicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doenças imunologicamente mediadas

2.1.1 Características gerais

As doenças imunologicamente mediadas (Quadro 1) compõem um grupo amplo e 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; Alanen; Syrjänen, 2007).

Quadro 1. Lista das doenças imunologicamente mediadas.

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

A presença de lesões orais associadas a essas condições é freqüente e em muitas situações pode ser a primeira manifestação da doença, sendo parte importante do quadro clínico, e não raro apresentando controle complexo. Dentro deste grupo de afecções, encontram-se a RLO-RAM, entre outras lesões de curso clínico mais complexo e que acometem mais estruturas da cavidade oral, como por exemplo, as diversas formas de LPO, o penfigóide benigno das mucosas, o pênfigo vulgar e a cDECH. A prevalência destas entidades patológicas é altamente variável e algumas são raras. O LPO possui uma prevalência importante em indivíduos de meia-idade, com uma maior

predileção pelo sexo feminino numa proporção 2:1 (Xue et al., 2005; Ingafou et al., 2006) e podendo atingir uma média de até 4% na população (Scully et al., 1998). Sendo assim, há a necessidade de compreensão mais adequada da sua etiopatogenia de modo a possibilitar um manejo clínico mais adequado (DeRossi; Ciarrocca, 2005). Estudos sobre prevalência da RLO-RAM mostram que este tipo de afecção pode acometer cerca de 1% da população que possui fatores predisponentes a esta condição (Franklin; Jones, 2006).

2.1.2 Critérios clínicos e histopatológicos do LPO e RLO-RAM

Pelo fato dessas condições patológicas terem mecanismos patogênicos distintos, porém a resposta imunológica parece ser similar, muitos autores têm objetivado estabelecer uma caracterização histopatológica e imunoistoquímica do infiltrado inflamatório e dos eventos celulares a fim de relacioná-los com as manifestações clínicas dos diferentes tipos de LPO e doenças mediadas imunologicamente com manifestações liquenóides, como a RLO-RAM e as lesões liquenóides da cDECH (McCartan; Lamey, 1997; Mega; Jiang; Takagi, 2001; Soares *et al.*, 2005; Bascones-Ilundain *et al.*, 2006; Köse *et al.*, 2007).

Para tanto, em 2003 Van der Meiji e colaboradores estabeleceram critérios clínicos e histopatológicos (Quadro 2) para o diagnóstico de lesões liquenóides e estes critérios foram adotados pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Portanto, clinicamente, o LPO e a RLO-RAM devem apresentar os critérios histopatológicos estabelecidos e modificados pela OMS (Figuras 1, 2, 3 e 4).

Quadro 2 - Proposta para critérios de diagnóstico da Organização Mundial da Saúde (OMS) para Líquen plano oral (LPO, ou *Oral Lichen Planus* - OLP) e Reação liquenóide oral (RLO, ou *Oral Lichenoid Lesions* - OLL) modificados por Van der Meiji *et al.*, 2003.

*Critérios clínicos**

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).

Critérios histopatológicos⁺

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 liquefeita” nas células da camada basal.

Ausência de displasia epitelial.

Diagnóstico final para LPO e RLO.

Para chegar a um diagnóstico final, os critérios clínicos e histopatológicos deverão ser incluídos.

O diagnóstico do LPO requer uma observação dos critérios clínicos e histopatológicos.

O termo RLO 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.



Figura 1 - Correlação clínico-patológica do LPO e da RLO-RAM de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS. Fotografia clínica de um caso clássico de LPO. Em A e B, lesões bilaterais de mucosa jugal; C e D lesões bilaterais em borda lateral de língua; em E lesões simétricas em vermelhão do lábio inferior; e em F lesões simétricas em dorso de língua.

Fonte: dados da pesquisa

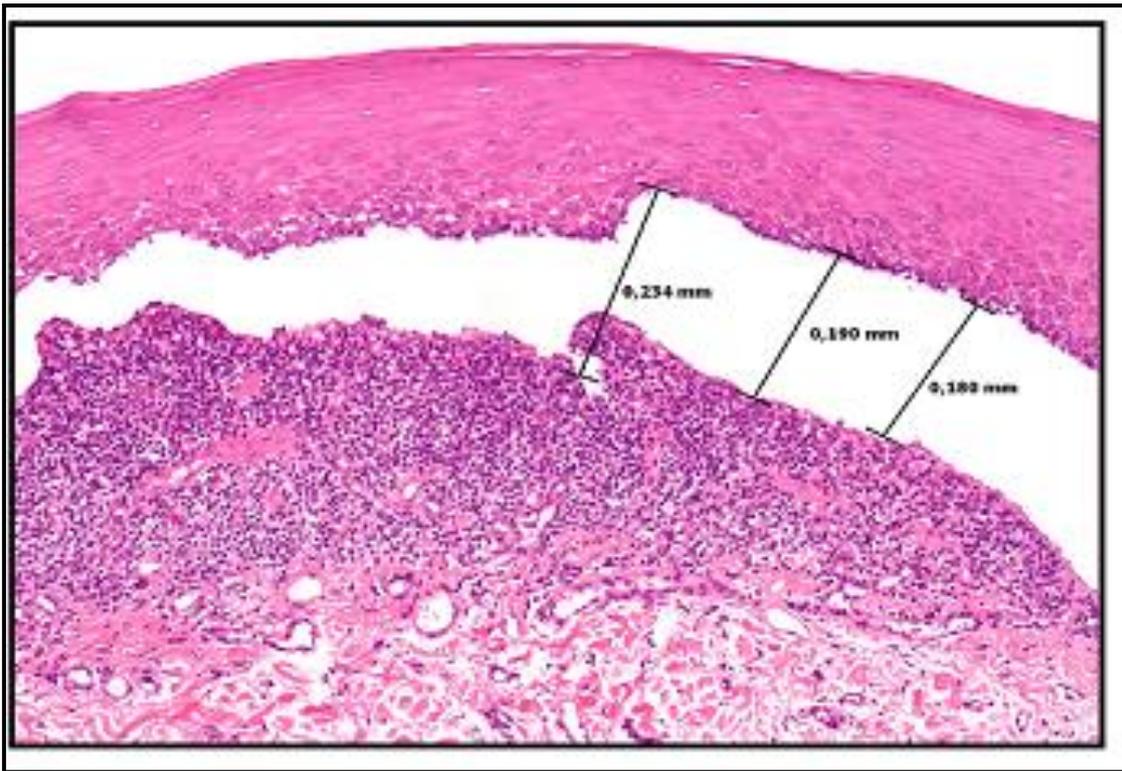


Figura 2 – Fotomicroscopia de um caso de LPO mostrando fragmento de mucosa revestido por tecido epitelial pavimentoso estratificado hiperparaqueratinizado.

Fonte: dados da pesquisa

O tecido epitelial encontra-se atrófico. Além disso, é possível observar no tecido conjuntivo um infiltrado inflamatório intenso em banda justaepitelial e a presença de fenda epitelial, decorrente da degeneração liquefeita da camada basal.

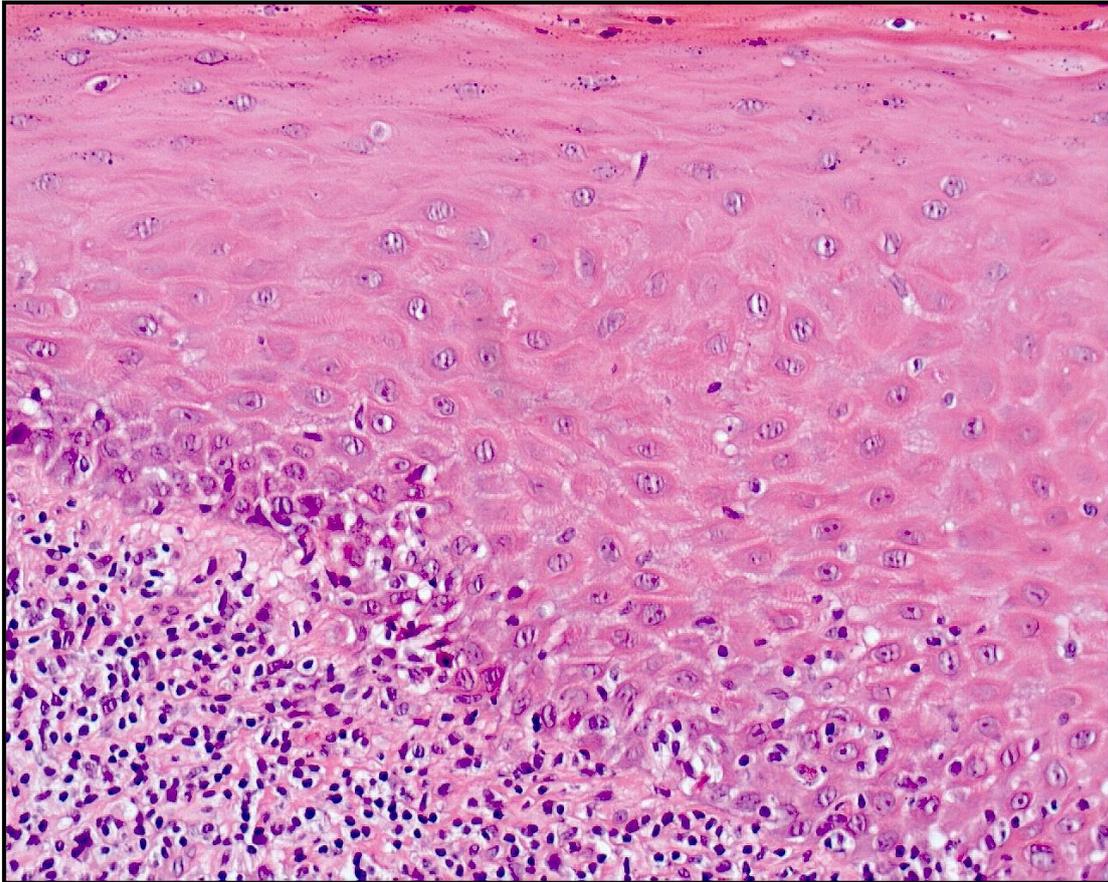


Figura 3 - Fotomicroscopia de um caso de LPO mostrando fragmento de mucosa revestido por tecido epitelial pavimentoso estratificado hiperparaqueratinizado sem displasia.

Fonte: dados da pesquisa

Na figura 3, é possível observar, no corte, a degeneração hidrópica da camada basal e uma proeminente acantose.

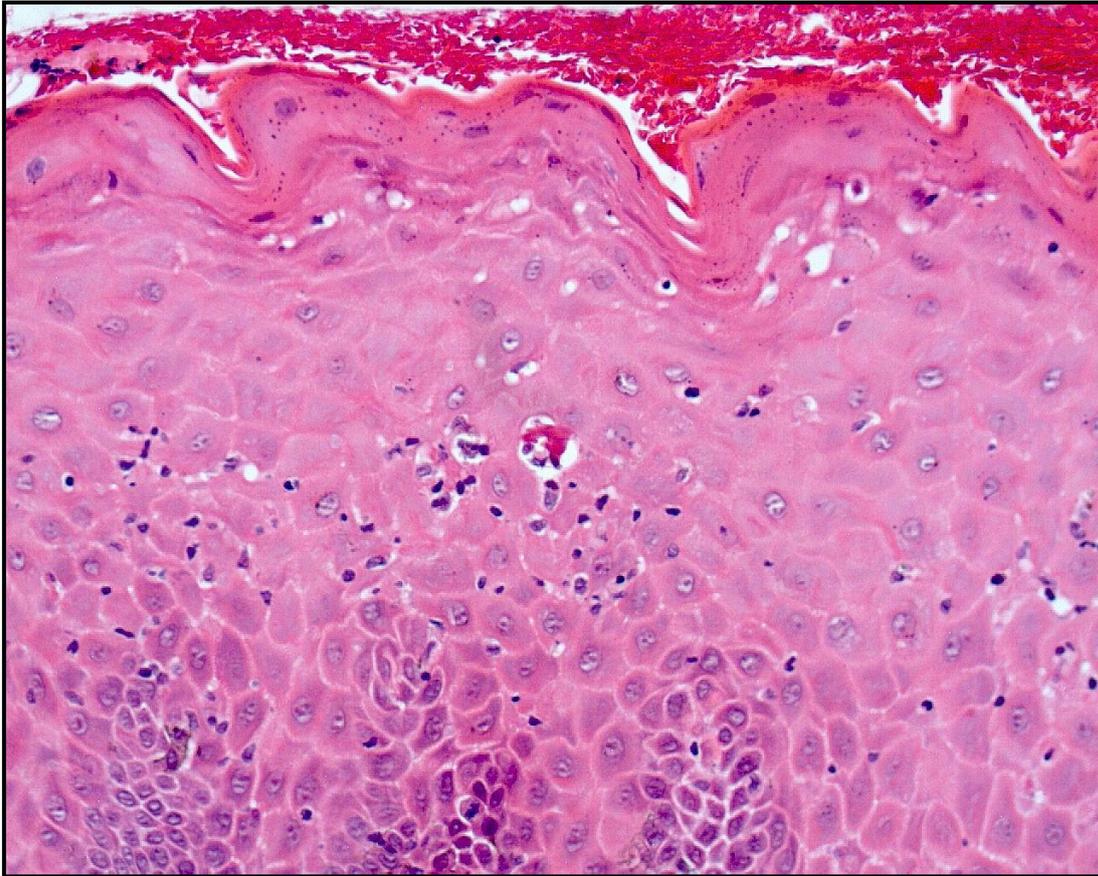


Figura 4 - Fotomicroscopia de um caso de LPO mostrando fragmento de mucosa revestido por tecido epitelial pavimentoso estratificado hiperparaqueratinizado.

Fonte: dados da pesquisa

Neste corte é possível observar a presença de exocitose e um corpo apoptótico de Civatte.

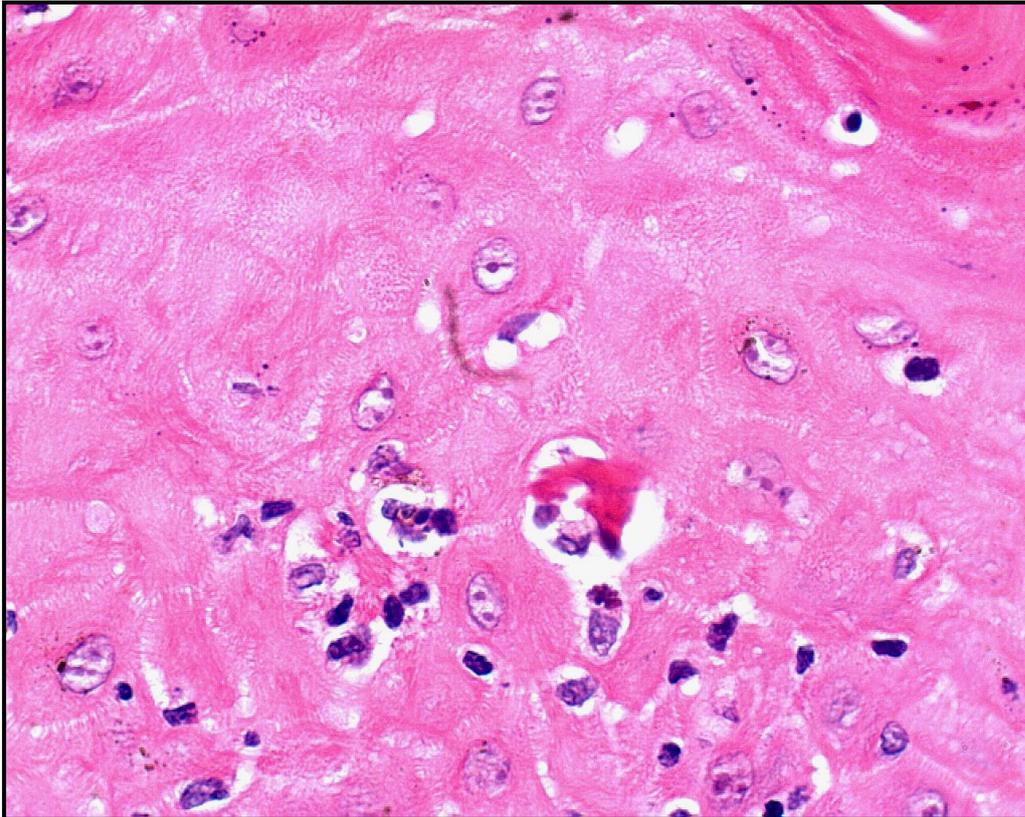


Figura 5 - Fotomicroscopia de um caso de LPO mostrando fragmento de mucosa revestido por tecido epitelial pavimentoso estratificado hiperparaqueratinizado.

Fonte: dados da pesquisa

Nesse corte, é possível observar a presença de um corpo apoptótico de Civatte em maior aumento.

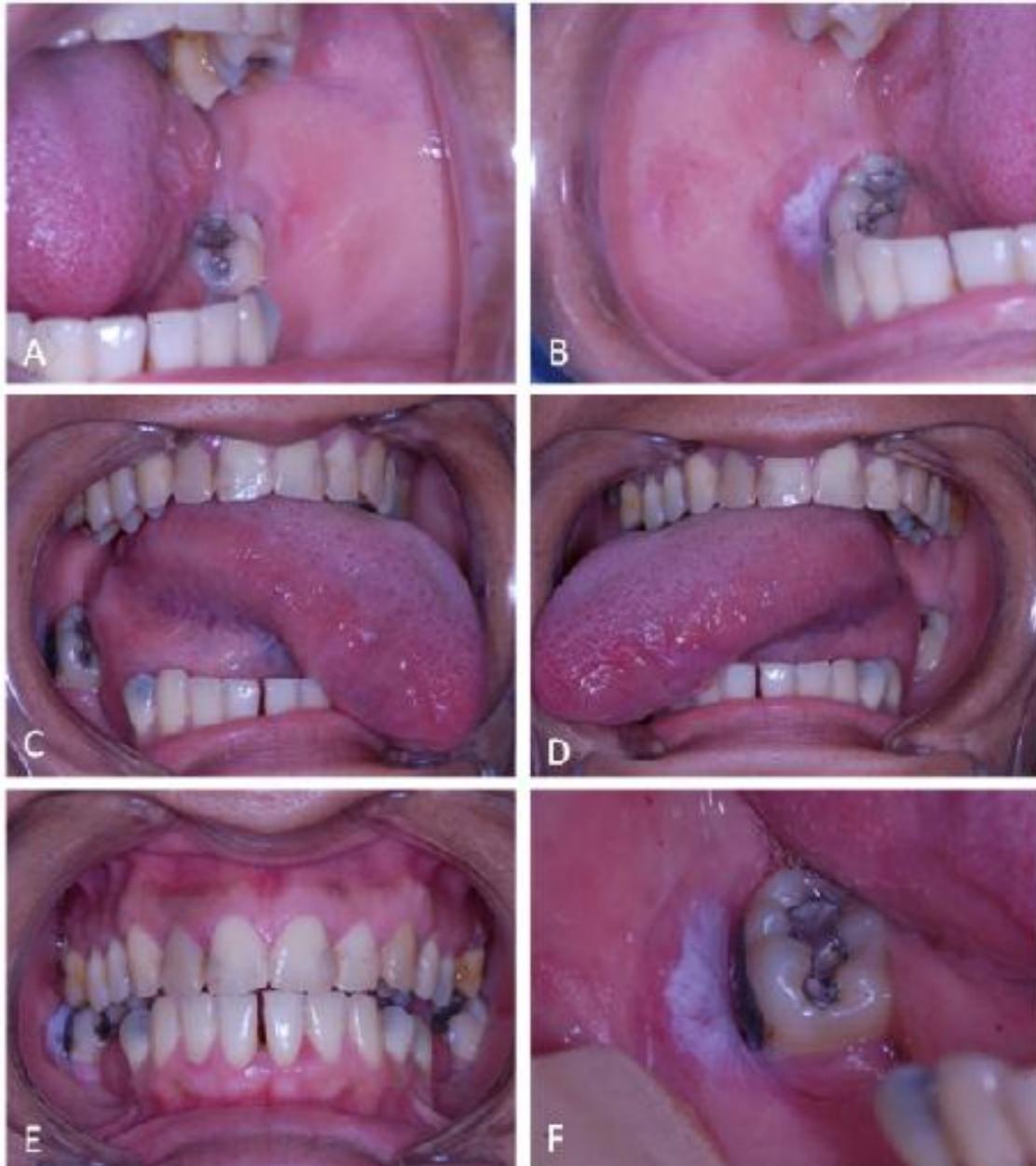


Figura 6 - Fotografia clínica de um caso clássico de RLO-RAM. Em A e B, ausência de lesões bilaterais de mucosa jugal; C e D ausência de lesões bilaterais em borda lateral de língua; em E ausência de lesões simétricas em mucosa gengival e/ou lábios; e em F lesão clássica em região de contato direto com o material restaurador.

Fonte: dados da pesquisa

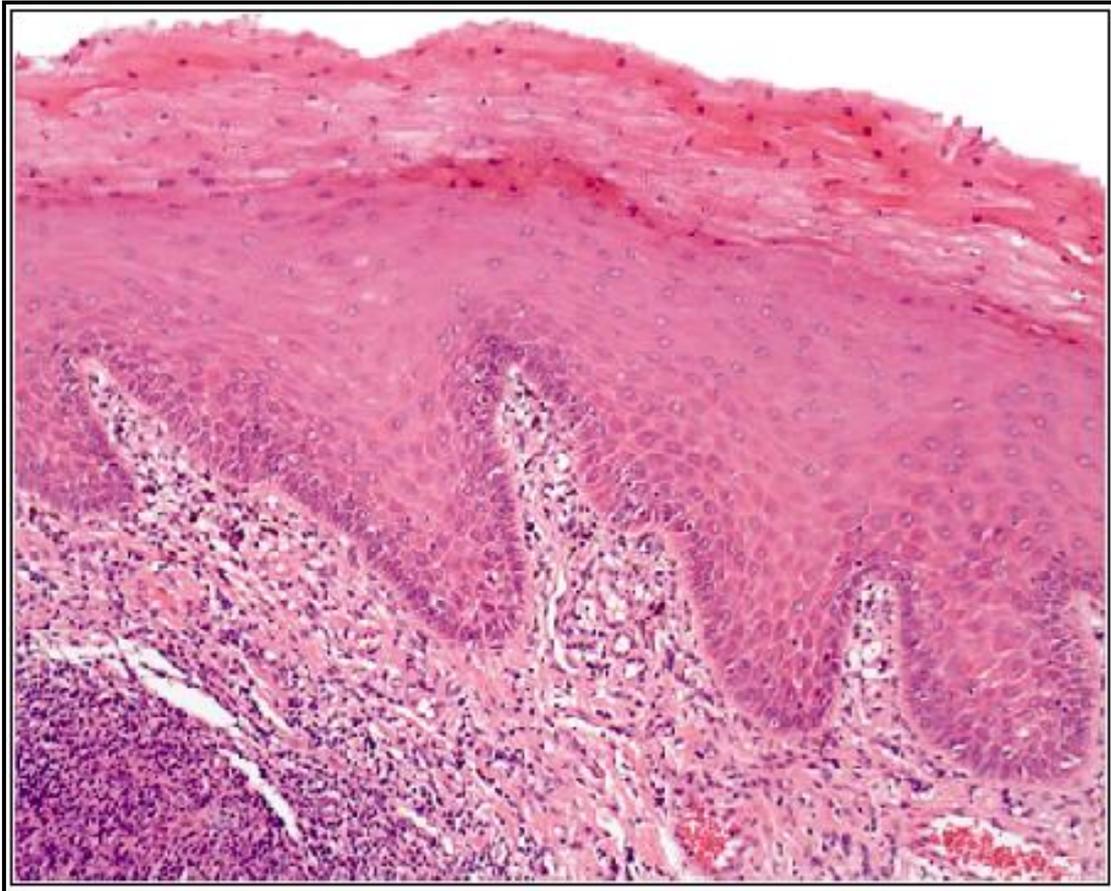


Figura 7 – Fotomicroscopia de um caso de RLO-RAM mostrando fragmento de mucosa revestido por tecido epitelial pavimentoso estratificado hiperparaqueratinizado. O tecido epitelial encontra-se acantótico e com projeções em dentes de serra. Além disso, é possível observar integridade da camada basal. No tecido conjuntivo um infiltrado inflamatório discreto em banda justaepitelial disperso e moderado e a presença de agregados linfóides indicativos de formação de folículo linfóide.

Fonte: dados da pesquisa

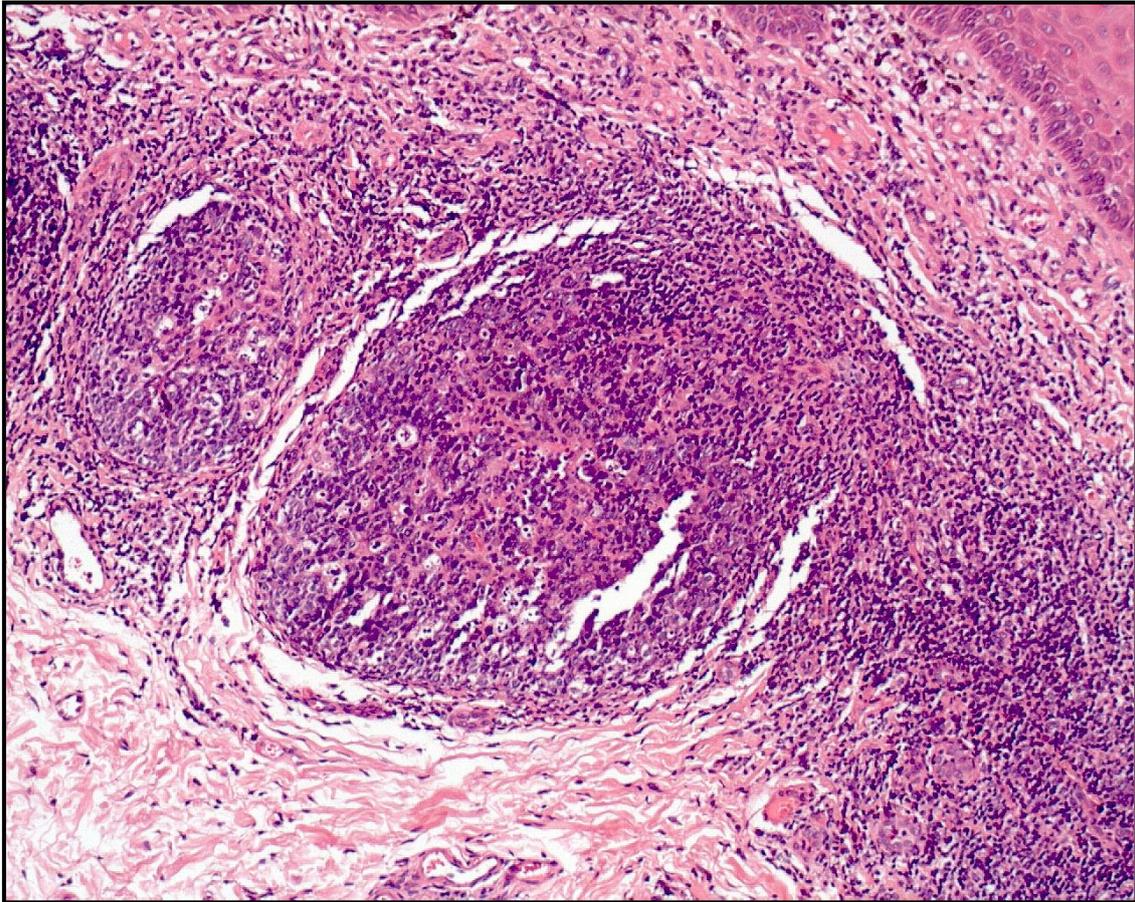


Figura 8 - Fotomicroscopia de um caso de RLO-RAM mostrando fragmento de mucosa com folículo linfóide.

Fonte: dados da pesquisa

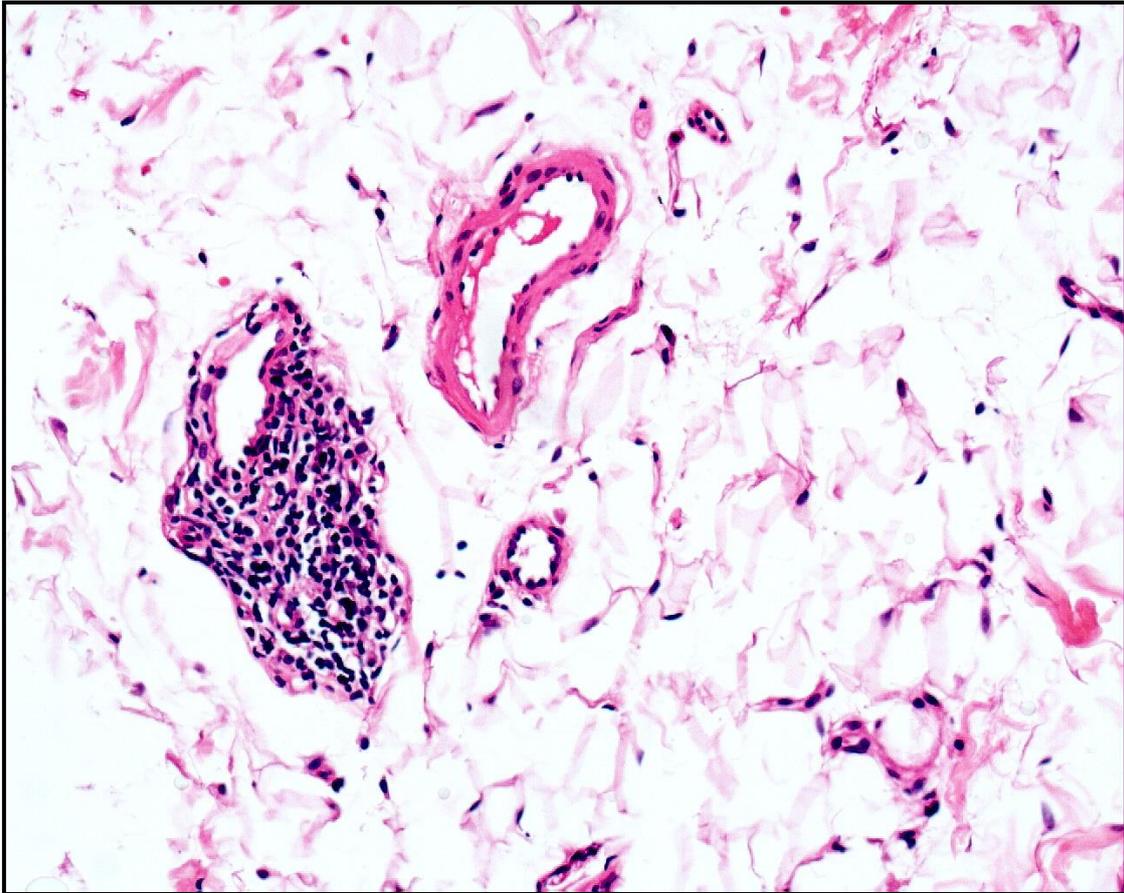


Figura 9 - Fotomicroscopia de um caso de RLO-RAM mostrando fragmento de mucosa mostrando o tecido conjuntivo profundo apresentando infiltrado inflamatório perivascular profundo, no interior da submucosa.

Fonte: dados da pesquisa

2.1.3 Caracterização imunoistoquímica de lesões LPO e RLO-RAM

Pelo fato de essas condições patológicas terem mecanismos patogênicos distintos, porém a resposta imunológica parece ser similar, muitos autores têm objetivado estabelecer uma caracterização histopatológica e imunoistoquímica do infiltrado inflamatório e dos eventos celulares a fim de relacioná-los com as manifestações clínicas dos diferentes tipos de líquen plano oral e doenças mediadas imunologicamente com manifestações liquenóides (McCartan; Lamey, 1997; Mega; Jiang; Takagi, 2001; Soares et al., 2005; Bascones-Ilundain et al., 2006; Köse et al., 2007).

2.1.4 Patogênese das doenças imunologicamente medidas

A patogênese do líquen plano oral está relacionada a mecanismos antígenos-específicos (apresentação de antígenos pela camada basal do epitélio seguida de dano citotóxico promovido por linfócitos T-CD8) e não-específicos (degranulação de mastócitos e ativação de metaloproteinases) que irão promover acúmulo de linfócitos T adjacente à lâmina própria e degeneração da camada basal (Sugerman et al., 2002). A perda de privilégio imune do epitélio normal parece ser um importante evento, estando também ligado à etiologia de outras doenças auto-imunes. A participação de citocinas produzidas pelos linfócitos T-helper1-CD4+ tem um papel fundamental neste processo, com a liberação de interferon- γ (IFN- γ) promovendo a produção do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) pelos linfócitos T-CD8, que por sua vez podem induzir a apoptose de queratinócitos basais (Lodi et al. 2005).

A patogênese da reação liquenóide oral de contato, como por exemplo, a relacionada ao amálgama dentário (RLO-RAM), é explicada por uma reação de hipersensibilidade mediada pelo sistema imunológico do indivíduo, quando ocorre uma dermatite de contato (Van der Meij; Van der Waal, 2003). Pacientes com alterações previamente diagnosticadas como lesões liquenóides apresentam lesões que não migram e, usualmente, envolvem apenas a mucosa diretamente em contato com o amálgama dentário. Essas lesões regridem rapidamente após a remoção da restauração adjacente e devem ser diagnosticadas como reação liquenóide por contato com amálgama, e não como líquen plano verdadeiro (Ostman; Anneroth; Skoglund, 1996).

Atualmente não há nenhum método de confiança para distinguir as duas lesões, entretanto, se uma reação liquenóide é relacionada a um fator causal, como os citados no quadro 3 ou relacionada a uma restauração em amálgama, a remoção do fator causal pode conduzir à resolução da lesão clínica. Isto contrasta com os pacientes que têm líquen plano, os quais podem exigir cuidados e a monitoração paliativos durante muitos anos, sobretudo, devido à condição de lesão liquenóide com potencial de malignização (Van der Meij; Mast; Van der Waal, 2007).

Quadro 3 - Medicamentos relacionados a reações liquenóides*.

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

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

Apesar de possuírem mecanismos patogênicos distintos, estas lesões orais apresentam-se clinicamente semelhantes, como estrias brancas e liquenóides que se estendem ao longo das mucosas orais. Tais mecanismos parecem estar relacionados à ocorrência de eventos mediados por alterações da resposta imune, e 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 manifestações clínicas (Al-Hashimi *et al.*, 2007; Barret; Blanc, 2008; Arora, 2008).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos gerais

Identificar a correlação entre as manifestações clínicas e padrões histopatológicos em pacientes portadores de líquen plano oral (LPO), da reação liquenóide associada à restauração de amálgama (RLO-RAM).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os casos de LPO e RLO-RAM através dos critérios clínicos e histopatológicos propostos pela OMS (2005);
- Avaliar clinicamente a presença de hipossalivação nos pacientes portadores de LPO e RLO-RAM
- Avaliar, caracterizar e comparar o perfil histopatológico da profundidade do infiltrado inflamatório, acantose e atrofia destas duas patologias através da coloração de rotina com H&E e caracterização do infiltrado inflamatório através da técnica imunoistoquímica;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo, divisão dos grupos e critérios de seleção dos sujeitos

4.1.1 Desenho do estudo e divisão de grupos: de estudo, controle de hipossalivação

O estudo foi epidemiológico e observacional, compreendeu um grupo de estudo composto 72 voluntários portadores de LPO ou RLO-RAM, de ambos os sexos, com idades pretendidas entre 18 e 60 anos, em bom estado geral de saúde de acordo com o cálculo amostral. Para a variável hipossalivação, foram selecionados 72 voluntários em bom estado geral de saúde e que possuíam restaurações em amálgama, mas que eram livres de LPO ou RLO-RAM que 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).

O tamanho da amostra foi baseado na prevalência das manifestações orais de lesões liquenóides em diversos estudos. Foram considerados estudos que avaliaram a prevalência LPO $p = 1\%$ (Franklin; Jones, 2006) a 11.62% (Bornstein et al., 2004) e da RL-RAM $p = 1\%$ (Franklin; Jones, 2006). Observou-se que a prevalência variou entre 1% a 11.62%, sendo o ponto médio deste intervalo $p = 5.81\%$. O erro amostral pode ser estimado pela diferença entre a prevalência a ser estudada e a real, e quanto menor o erro amostral, maior será o tamanho da amostra, portanto é ideal calcular pelo menor erro amostral. Considerando-se as diferenças entre o ponto médio do intervalo (6%) e as prevalências observadas em outros estudos, temos que o menor erro amostral é de 6% (12% - 6%).

Portanto para o cálculo utilizou-se um nível de significância de 5%, um erro amostral de 6%, e uma prevalência estimada de 12%, resultando em uma amostra de no mínimo $n = 30$ sujeitos.

Desta forma, considerando-se eventuais perdas de seguimento, a intenção seria de avaliar 30 sujeitos para cada grupo analisado.

Os voluntários que compuseram o grupo de estudo foram selecionados a partir do banco lâminas e laudos provenientes do Orocentro da FOP-UNICAMP (Piracicaba, SP), Clínica de Estomatologia UFPE (Recife, PE) que apresentaram diagnóstico histopatológico de LPO, compatível com LPO, RL-RAM ou compatível com RL-RAM. A sistemática de recrutamento dos voluntários afetados pelo LPO ou RL 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. Os critérios de inclusão para a seleção dos voluntários foram: possuir laudos com o diagnóstico histopatológico de LPO, compatível com LPO, RL ou compatível com RL.
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 através destes meios.
3. Os voluntários que foram recrutados e os novos pacientes advindos da demanda espontânea dos centros de diagnóstico envolvidos passaram pelos procedimentos de pesquisa como descritos a seguir no item 4.2.1.

Os voluntários eleitos para a participação da pesquisa foram distribuídos em um grupo de estudo (grupo 1) e através do chamado via correspondência e/ou telefonemas. Além disso, o voluntário recebeu o atendimento e se necessário fosse, também foram prescritos medicamentos para diminuição dos sintomas quando existiam. Aqueles pacientes que faltavam ao primeiro contato eram novamente convocados por mais duas tentativas, fosse via correspondência ou via telefonema.

Para compor o grupo de voluntários controles para o estudo da hipossalivação foram selecionados, de acordo com os critérios de inclusão/exclusão descritos no item 4.1.2.2, voluntários provenientes da

demanda espontânea dos serviços de estomatologia envolvidos. Estes voluntários foram submetidos a um questionário, assinaram o TCLE, receberam atendimento de triagem e foram encaminhados para as devidas clínicas odontológicas quando necessário. Além disso, cada voluntário foi submetido à coleta de saliva nas condições descritas a seguir com a finalidade de mensuração do fluxo salivar.

4.1.2. Critérios de inclusão e exclusão dos sujeitos

4.1.2.1. Grupos de casos

Grupo 1 - Líquen Plano Oral e RL-RAM

Critérios de inclusão:

- Ser portador de LPO ou RL-RAM. Foram considerados os critérios de diagnóstico da Organização Mundial da Saúde (OMS) para Líquen plano oral (LPO) e Reação liquenóide (OLL) modificados por Van der Meiji et al., 2003 (Quadro 2);
- Pacientes de ambos os gêneros com idade acima de 18 anos e aptos a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE);
- Não estar fazendo uso dos medicamentos potencialmente associados a reações liquenóides (Quadro 3);
- Consentir a sua participação na pesquisa através da assinatura do TCLE.

Critérios de exclusão:

- Não ser portador de LPO, RL-RAM oral ou ser portador de qualquer outra desordem imunologicamente mediada ou auto-imune (Quadro 1);
- Indivíduos com idade inferior a 18 e não aptos para assinar o TCLE;
- Indivíduos 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.

4.1.2.2. Grupo Controle - estudo de hipossalivação

Critérios de inclusão:

- Não apresentar sinais de LPO, reações liquenóides induzidas por uso de medicamentos e/ou contato com restauração de amálgama além de não ser portador de qualquer outra desordem imunologicamente mediada ou auto-imune, não ter sido submetido ao TCTH;
- Pacientes pareados com os grupos 1 e 2 para sexo e idade considerando um intervalo de +/- 5 anos;
- Não estar fazendo uso dos medicamentos (Quadro 3);
- Consentir a sua participação na pesquisa através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Critérios de exclusão:

- Apresentar sinais de LPO, reações liquenóides induzidas por uso de medicamentos e/ou contato com restauração de amálgama.
- Ser portador de qualquer outra desordem imunologicamente mediada ou auto-imune (Quadro 1);
- Estar fazendo uso dos medicamentos potencialmente associados a reações liquenóides (Quadro 3);
- Não se enquadrar nos critérios de elegibilidade.

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

Todos os voluntários do grupo de estudo e controles de hipossalivação foram submetidos a um exame clínico e aplicação de um questionário estruturado para obtenção dos dados sócio-demográficos, dados médicos e história da doença atual (APÊNDICE 1). Os procedimentos de coletas de materiais biológicos foram realizados nos voluntários do grupo de estudo após a obtenção da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE 2), no qual os mesmos foram informados dos objetivos da pesquisa e de todos os procedimentos relacionados à mesma, bem como

os riscos e benefícios, possíveis reações adversas e/ou constrangimentos ocasionados pelos procedimentos de coleta dos dados, de saliva, do sangue e no caso dos pacientes dos grupos de estudo, do procedimento de biópsia em que houveram indicação.

4.2.1 Exame clínico e biópsia

Os pacientes de ambos os grupos foram pacientes que já haviam sido submetidos a exame clínico extra e intra-oral sob luz artificial proveniente do equipo odontológico e uso de instrumentais convencionais de exame clínico de posse disso foram novamente analisados de acordo com os critérios clínicos propostos pela OMS. Foram realizadas fotografias da mucosa oral bilateralmente de todos os pacientes, com o objetivo de arquivar as imagens clínicas no momento do exame clínico e isto era realizado de forma habitual nos serviços relacionados a esta pesquisa. No caso de pacientes novos provenientes da demanda espontânea dos serviços, foi realizada biópsia incisional e estes pacientes foram incluídos no grupo de estudos. Após a remoção o espécime cirúrgico foi fixado em formol neutro a 4% e encaminhado para processamento.

Foram considerados os seguintes critérios clínicos utilizados pela OMS: 1- lesões bilaterais, 2- lesões brancas estriadas (reticular) e 3- Lesões erosivas, atróficas, bolhosas e papulares (Quadro 2). O LPO foi considerado quando na presença de pelo menos os dois primeiros critérios clínicos: presença de lesões bilaterais, a maioria simétrica e presença de redes entrelaçadas de linhas cinza-esbranquiçadas ligeiramente elevadas (padrão reticular) (Figura 1). A RL-RAM foi considerada quando na presença de lesões associadas às restaurações em amálgama e o paciente não possuía nenhuma outra lesão em outros locais da mucosa oral (Figura 3).

4.2.2 Saliva para testes de hipossalivação

Foram coletadas duas amostras de saliva de todos os voluntários que fizeram parte do grupo de pacientes afetados pelo LPO ou RLO-RAM para duas finalidades; a primeira, para a mensuração da hipossalivação e a

segunda, para extração de DNA e avaliação dos polimorfismos.

Sabe-se que a coleta de saliva não estimulada não altera a constituição natural da saliva do paciente, que pode ser modificada quando estimulada, portanto, a primeira coleta foi a de saliva total não estimulada acordo com protocolo preestabelecido (Navazesh, 1993), a qual foi coletada no período da manhã até às 10 horas para que não houvesse influência do ciclo circadiano (Arvidson et al. 1994).

A coleta 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 toda a saliva produzida durante o período de 5 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. Os valores de referência utilizados foram aqueles estabelecidos por Krasse (1986), os quais estabelecem que um volume salivar de 1,0 a 3,0mL/min, é considerado um fluxo normal; um volume de 1,0 a 0,7mL/min é considerado um fluxo baixo; e um volume menor de 0,7 mL/min é considerado hipossalivação. Para a análise das variáveis de fluxo foram atribuídos os seguintes valores: fluxo normal a baixo foi considerado sem hipossalivação e recebeu o valor 1; e aos pacientes com hipossalivação foi atribuído o valor 2.

4.3 Análises das amostras e processamento dos dados

4.3.1 Análises clínicas e histopatológicas

As análises clínicas ocorreram na nas clínicas envolvidas na pesquisa sob a luz artificial e aplicação dos critérios. Após o exame clínico, as fotografias intraorais foram realizadas com os seguintes objetivos: fotografar as regiões afetadas pelas LL da mucosa jugal bilateral, região de borda lateral de língua bilateral, dorso de língua, lábios inferior e superior (quando necessário); e depois analisadas por dois pesquisadores (JJJ e CMBR) de posse das lâminas

e fichas clínicas para a realização da correlação clínico-patológica utilizando os critérios clínicos adotados pela OMS.

Para a realização das análises histopatológicas, as lâminas dos pacientes já cadastrados nos serviços citados e inseridos no grupo de estudo foram reavaliadas e os pacientes re-examinados, a necessidade de nova biópsia foi avaliada e realizada apenas quando houve indicação clínica.

Em resumo os sujeitos do grupo de estudos, composto por pacientes portadores do LPO / RL-RAM, não foram rebiopsiados quando já tiverem passado por biópsia prévia (realizada independentemente desta pesquisa). Os casos novos, provenientes da demanda espontânea dos ambulatórios envolvidos, foram biopsiados (o que fazia parte das rotinas dos ambulatórios onde estes pacientes foram tratados).

A análise histopatológica (morfológica) foi realizada nas lâminas provenientes do arquivo de lâminas dos laboratórios de patologia da FOP-UNICAMP e da UFPE, e das novas biópsias. Após a obtenção dos blocos parafinados, cortes de cinco micrômetros serão realizados para montagem da lâmina que receberá a coloração de rotina em H&E, e cortes de três micrômetros serão realizados para as colorações imunoistoquímicas e avaliados por pesquisadores calibrados de acordo com os critérios sugeridos pela OMS.

Na análise morfológica foi possível a comparação entre as lesões os conforme critérios adotados pela OMS e modificados por Van der Meiji et al., 2003 (Quadro 1) e foi considerada a presença das seguintes alterações: infiltrado inflamatório em banda rico em linfócitos, tipo do infiltrado inflamatório (se em banda ou difuso), degeneração liquefeita na camada de células basais (vacuolização da camada basal) e ausência de displasia. Além das alterações histopatológicas consideradas pela OMS foram consideradas ainda: hiperqueratose (hiperortoqueratose e hiperparaqueratose), acantose, atrofia epitelial, fenda subepitelial focal, projeção em dente de serra, derrame pigmentar, exocitose e presença de folículo linfóide e infiltrado inflamatório perivascular profundo.

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. 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. A projeção em dente de serra foi considerada quando na presença de formação de papilas epiteliais em formato triangular com vértice voltado para o tecido conjuntivo. O derrame pigmentar (ou pigmentação incontinente) foi considerado quando houvesse qualquer quantidade de melanina localizada na lâmina própria. O infiltrado inflamatório perivascular profundo, verificado no tecido conjuntivo profundo, foi definido como presença de células inflamatórias aglomeradas ao redor dos vasos do tecido conjuntivo localizados na submucosa, ou seja, no terço inferior do corte com profundidade média de 1 milímetro. A presença de folículo linfóide foi considerada quando na presença de agregados linfóides eram observados no tecido conjuntivo. Todos estes achados após analisados receberam os seguintes valores: (0= ausente; 1= presente).

A exocitose epitelial e o infiltrado inflamatório subepitelial foram avaliados subjetivamente com a concordância entre dois pesquisadores (CMBR e JJJ) de acordo com a intensidade e considerando-se o aspecto mais proeminente no corte, e 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. Foi realizada uma análise morfométrica computadorizada para as tomadas das medidas de profundidade de infiltrado inflamatório e de espessura epitelial (acantose e atrofia) que foi executada utilizando-se o 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 14).

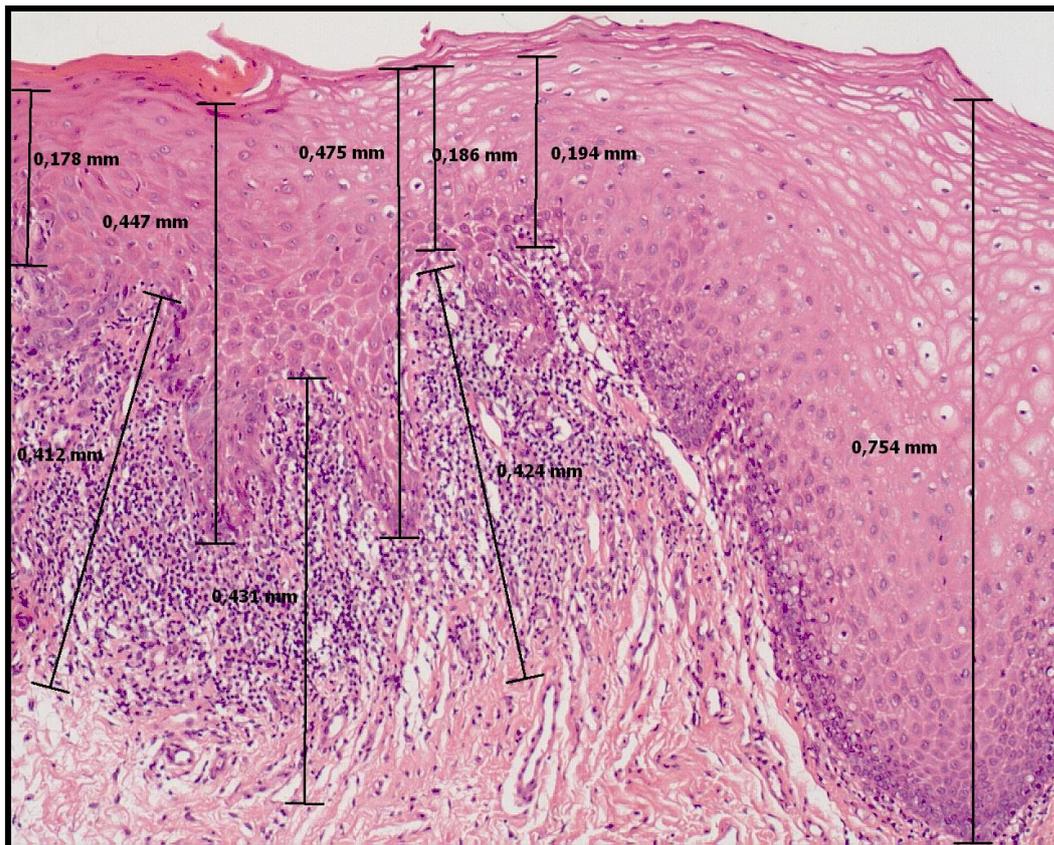


Figura 14 - Fotomicroscopia com os traçados da espessura epitelial e da profundidade do infiltrado inflamatório em um fragmento de mucosa revestido por tecido epitelial estratificado pavimentoso.

Fonte: dados da pesquisa

Na figura 14, observa-se que o tecido conjuntivo era fibroso mostrando área de infiltrado inflamatório em banda que se estendia desde a lâmina própria até a submucosa, rico em linfócitos.

A profundidade do infiltrado inflamatório, definida como a distância entre as células inflamatórias do ápice da papila conjuntiva até a porção mais profunda do infiltrado inflamatório, foi mensurada em três áreas maiores e a partir das quais foi calculada a profundidade média do infiltrado inflamatório.

A espessura epitelial foi definida de duas maneiras: a primeira foi a partir de três medidas obtidas pela distância entre a superfície externa do epitélio até a ponta da crista epitelial, o que representa a acantose; e a segunda, a partir da média de três medidas obtidas da distância entre a superfície do epitélio até a zona da membrana basal (ZMB) localizada entre duas projeções epiteliais, o que representou a atrofia.

4.3.1.2 Imunoistoquímica

Com o objetivo de caracterizar o infiltrado inflamatório no LPO e na RLO-RAM, as colorações imunoistoquímicas foram realizadas com os anticorpos listados nos quadros 5 e 6.

Quadro 5 – Anticorpos que foram utilizados para as reações imunoistoquímicas.

Caracterização do infiltrado inflamatório	Anticorpos
Linfócitos	Linfócitos T CD3, CD8 Linfócitos B : CD20

Quadro 6 - Anticorpos primários, clones, diluições e fabricantes que foram utilizados no estudo imunoistoquímico

Anticorpo primário	Clone	Diluição, recuperação e tempo de incubação	Fabricante
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

Para a realização das reações imunoistoquímicas, 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 etanol (100%, 90%, 70% e 50%), e os cortes foram lavados em 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 em água corrente e água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada de acordo com os padrões descritos no quadro 6. Após resfriamento do líquido, os cortes foram lavados

em água corrente e destilada, e colocados em solução salina tamponada com fosfato (PBS: phosphate-buffered saline) a 10mM (pH 7,0).

Os cortes foram incubados com os anticorpos primários de acordo com a sua especificação (quadro 5), 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 a 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 120mg de substrato cromogênico 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma) misturando-se em 200ml de PBS, 2ml de peróxido de hidrogênio (20 volumes) e 2ml de dimetilsulfóxido (DMSO), e incubando em câmara seca a 37°C durante 5 minutos. Terminada esta etapa, as lâminas foram novamente lavadas em água corrente e destilada e contra-coradas com Hematoxilina de Carrazi durante 5 minutos, desidratadas através de 2 banhos em solução de etanol a 100%, diafanizadas em xilol com 2 trocas de 10 minutos cada, e montadas em Bálsamo do Canadá. Preparados histológicos controles foram utilizados em todas as reações com a finalidade de confirmar a funcionalidade das reações.

A caracterização do infiltrado inflamatório foi realizada por meio da quantificação das células com positividade para os anticorpos CD3 (Figura 15 a,b), CD8 (Figura 16 a,b), CD20 (Figura 17 a,b).

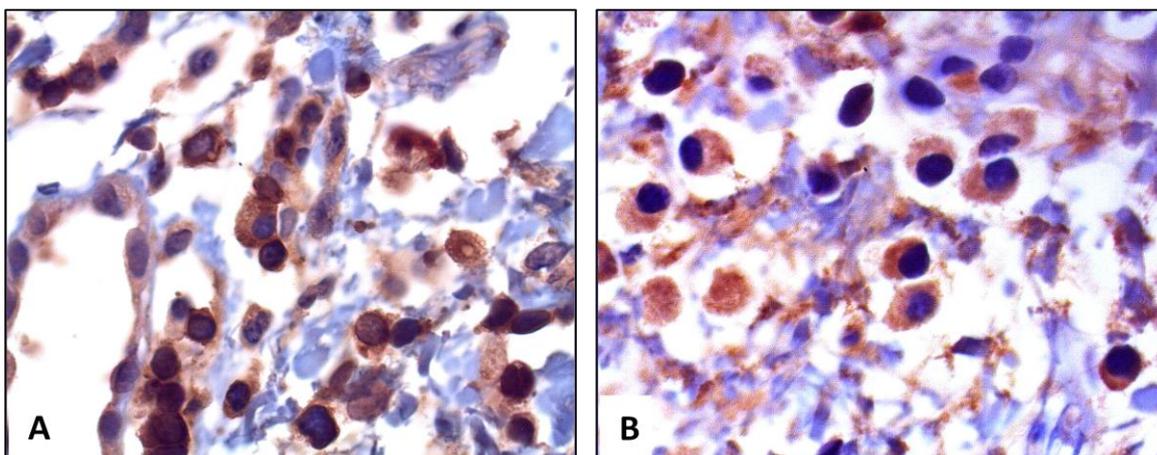


Figura 15 - Células CD3+ no tecido conjuntivo.

Fonte: dados da pesquisa

Observamos, na figura 15, que as células apresentam aspecto ovóide, em A: na RL-RAM com citoplasma granuloso, em B: citoplasma mais homogêneo no LPO.

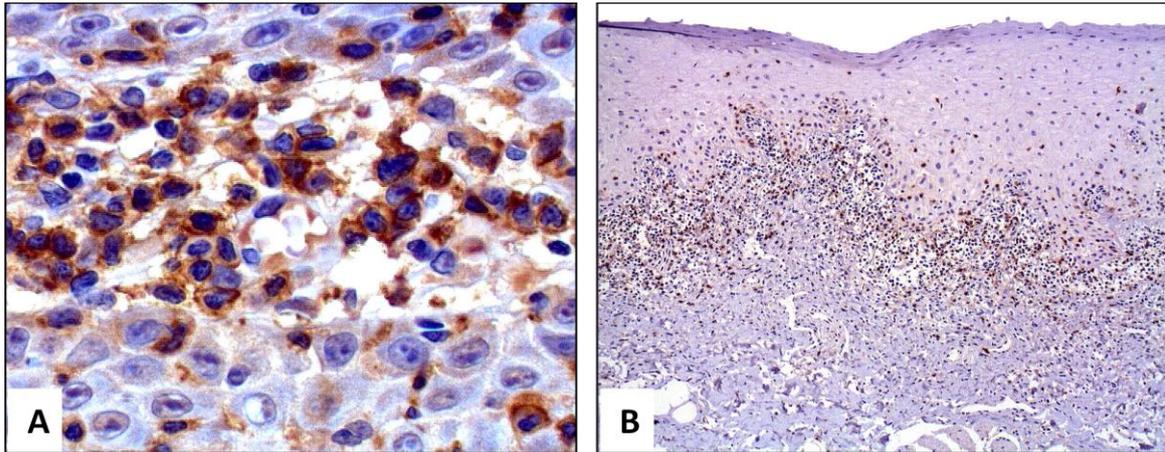


Figura 16 - Células CD8+ no tecido conjuntivo.

Fonte: dados da pesquisa

As células observadas na figura 16 apresentam aspecto circular, em A: na RL-RAM marcação citoplasmática homogênea, em B: no LPO marcação citoplasmática homogênea.

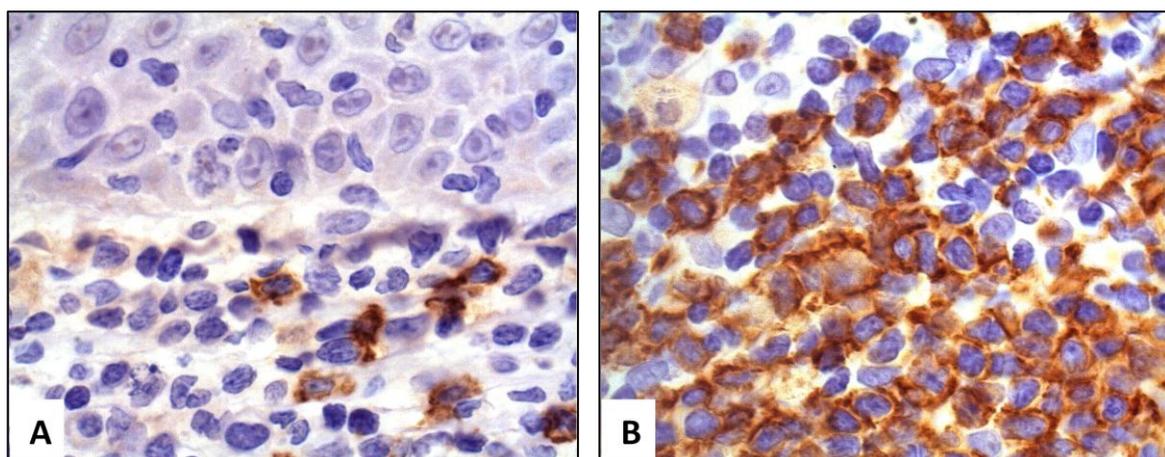


Figura 17 - Células CD20+ no tecido conjuntivo.

Fonte: dados da pesquisa

Essas células apresentam aspecto ovóide com alguns prolongamentos, marcação citoplasmática idêntica em A: na RL-RAM e em B: no LPO, porém em B nota-se maior marcação no tecido conjuntivo para as células indicando maior número linfócitos B no infiltrado inflamatório do LPO.

A análise morfométrica foi realizada utilizando-se microscópio de luz (Carl Zeiss) com objetiva de 40x e ocular reticulada PK 8x (Reichert, Áustria) composta de 10 linhas paralelas e 100 pontos perfazendo uma extensão de 150 μ m e área de 22.500 μ m² (figura 18).

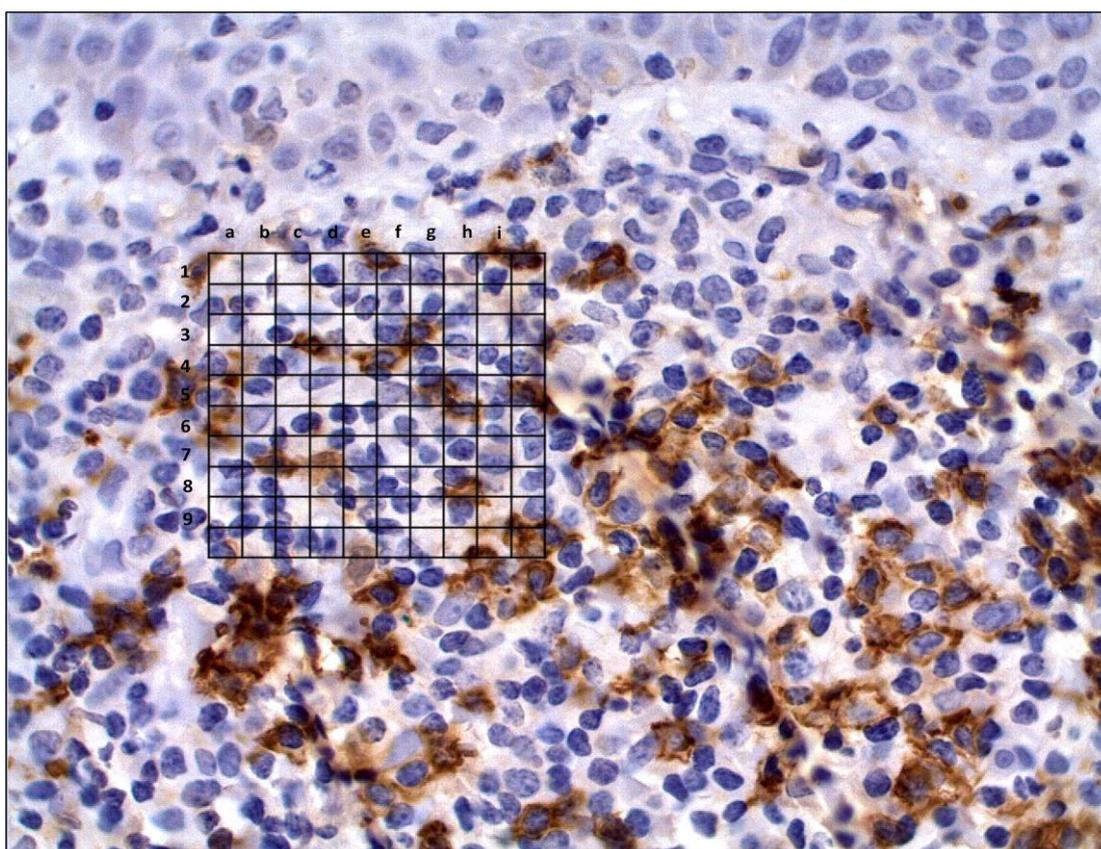


Figura 18. Ocular micrométrica (modelo PK 8x, Reichert) posicionada na camada justaepitelial (lâmina própria) até a membrana basal (LPO, imunistoquímica CD20, 320x).

Fonte: dados da pesquisa.

O índice de positividade foi obtido através da leitura de 7 campos seqüenciados e a escolha da região foi determinada pela integridade estrutural do tecido e positividade mais evidente. As células positivas foram contadas para cada um dos anticorpos em todas as lâminas dos casos selecionados e os resultados expressos em células positivas por área comprimento de membrana

basal em mm². Após a determinação do número médio das células marcadas positivamente/mm², as diferentes lesões foram comparadas estatisticamente.

4.4 Aspectos éticos

Os pacientes incluídos neste 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 (ANEXO 01).

Para preservar a identidade do paciente, o formulário de coleta de dados não conteve o nome ou o número do prontuário. Foi indicado um número de registro, que será vinculado ao número do prontuário. A utilização destes últimos ocorreu nas situações em que houver a necessidade de checagem de dados para os exames laboratoriais (ANEXO 02).

Este projeto foi submetido ao CEP da FOP-UNICAMP e está aprovado sob o Protocolo: 011/2009 (entrada: 12/03/2009). Projeto: 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 líquenóide (RL) e doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (cDECH).

Foram rigorosamente seguidos todos os aspectos éticos, especificamente determinados pelas diretrizes e normas da Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

4.5 Análises estatísticas

As informações obtidas foram utilizadas para a construção de um banco de dados, com o auxílio do programa SPSS versão 15.0. O nível de

significância assumido será de 5% e o software utilizado para análise foi o SSPSS versão 15.0. Para as análises descritivas, foram utilizadas as tabelas de contingência. Para as análises estatísticas com relação aos critérios clínicos, hipossalivação, histopatológicos, achados histológicos e achados imunoistoquímicos, foi utilizado o teste exato de Fisher. Por fim, para as análises de mensuração do infiltrado inflamatório e espessura epitelial, foi utilizada a análise estatística pelo teste Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks.

5 RESULTADOS

5.1 Análises descritivas

Foram recrutados e coletados dados de um total de 72 pacientes com laudos de LPO, compatível com LPO, RLO-RAM ou compatível com RLO-RAM. Após a análise clínico-patológica de acordo com os critérios da OMS (2003), foram selecionados apenas 39 casos que fizeram parte do grupo de estudos e foram alocados em dois subgrupos de estudos: subgrupo 1- LPO, compostos por 30 pacientes portadores de LPO e o subgrupo 2, composto por 9 pacientes portadores de RL-RAM, todos provenientes do Orocentro da FOP-UNICAMP (Piracicaba, SP) e Clínica de Estomatologia UFPE (Recife, PE).

De acordo com os dados da tabela 1, foram observados 30 casos de LPO, sendo esses 10 em pacientes do sexo masculino e 20 em pacientes do gênero feminino. Para a RL associada ao amálgama, foram observados 9 casos, distribuídos da seguinte forma: 2 casos ocorreram em pacientes do sexo masculino e 7 ocorreram em pacientes do sexo feminino. Observa-se ainda que as lesões líquenóides, sejam elas LPO ou RL-RAM afetaram mais pacientes do sexo feminino.

Tabela 1 – Distribuição do gênero de acordo com a lesão

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

Legenda: LPO= Líquen plano oral; RLO-RAM= Reação líquenóide associada ao amálgama

(*) – Nível de significância 5.0%

(1) – Valor de p utilizando o X^2 : Chi-quadrado.

OR – Odds Ratio – não pôde ser calculada por conta do algarismo “0” em uma das caselas

IC – Intervalo de confiança

A média de idade do grupo de estudos foi de 53,13 anos (mínima: 28; máxima: 82; DP: 11,08). A média de idade do subgrupo 1, foi de 53,9 anos (mínima: 28; máxima: 82; DP: 10,82). A média de idade do subgrupo 2, foi de 50,4 anos (mínima: 34; máxima: 68; DP: 13,93).

Os 33 casos remanescentes foram excluídos da amostra por não possuírem os critérios clínico-histopatológicos que pudessem ser utilizados

como parâmetro de pesquisa e serão posteriormente reclassificados. Dos casos excluídos, chamam atenção dois casos que inicialmente haviam sido diagnosticados como LPO e após cinco anos sem acompanhamento das lesões, foi possível observar alterações no padrão clínico das lesões. As pacientes foram reavaliadas clinicamente e histopatologicamente e foi possível diagnosticar dois casos de leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), uma das pacientes encontra-se em acompanhamento da lesão e outra já desenvolveu um carcinoma espinocelular de esôfago.

5.2 Análise da hipossalivação

Foram coletadas amostras de um total de 148 pacientes provenientes dos centros de estudos, porém para a análise pareada em gênero e idade, foram selecionados 39 casos de com o mesmo número de voluntários estratificados pelo gênero e com idades que variaram de +/- 5 anos, quando comparadas com as idades dos voluntários do grupo de estudo.

A hipossalivação foi avaliada em 39 voluntários que compuseram o grupo de estudo e nos 39 voluntários pareados por idade e gênero que compuseram o grupo de controles de hipossalivação. Na tabela 2 é possível observar que 30/39 (77%) dos pacientes portadores de LPO ou RLO-RAM eram portadores de hipossalivação. Contudo, estratificado pelo diagnóstico da lesão, não houve diferença estatisticamente significativa, portanto esse dado de hipossalivação pode ser definido como um perfil clínico de pacientes portadores de LPO ou RLO-RAM.

Tabela 2. Presença de hipossalivação, estratificado pelo diagnóstico da lesão

Presença de Hipossalivação	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-RAM				
Presente	25	5	30	-	-	p ⁽¹⁾ < ,248*
Ausente	9	0	9			
Total	34	5	39			

(*) – Nível de significância 5.0%

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

OR – Odds Ratio – não pôde ser calculada por conta do algarismo "0" em uma das caselas

IC – Intervalo de confiança

A presença de hipossalivação foi avaliada no grupo dos voluntários controles e comparada com o grupo de voluntários com lesão (n=78) (Tabela 3).

Tabela 3 - Presença de hipossalivação, estratificado pelo grupo de estudos e grupo de controles para hipossalivação

Hipossalivação	Diagnóstico		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	Com LPO ou RLO-RAM	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

A presença de lesão liquenóide, seja ela o LPO ou a RLO-RAM, representou um risco de 19.72 vezes mais predisponente para a hipossalivação do que pessoas livres de doença.

5.3 Análises Clínicas - Critérios clínicos OMS

Com base nos critérios clínicos da OMS, todos os 39 casos selecionados e avaliados apresentaram um padrão reticular e estriado. Contudo, de acordo o critério de lesões bilaterais, foi possível observar na tabela 4 que pacientes com lesões liquenóides bilaterais têm 10 vezes mais chances de ter o diagnóstico clínico de LPO, do que pacientes com RLO-RAM.

Tabela 4 - 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	RLO-RAM				
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

A presença de ulcerações (Tabela 5) foi observada em relacionadas com as lesões estavam presentes em 16 pacientes e ausentes em 23 deles. Destes, 13 tiveram diagnóstico de LPO e 3 tiveram diagnóstico de RLO-RAM.

Tabela 5. Critério clínico da OMS – presença de lesões ulceradas, estratificado pelo diagnóstico da lesão

Critério Clínico: OMS Lesões Ulceradas	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-RAM				
Presente	13	3	16	1.529	0.3205 - 7.298	p ⁽¹⁾ <0.446*
Ausente	17	6	23			
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

Esses resultados mostram que pacientes com LPO ou RLO-RAM têm 1.5 vezes mais chances de apresentarem lesões ulceradas, contudo a presença desse critério não foi estatisticamente significativa para diferenciar as duas lesões.

5.4. Análise Histopatológica

5.4.1. Coloração de rotina (H&E)

5.4.1.1. Critérios Histopatológicos OMS

A presença do infiltrado Inflamatório em banda foi observada em 38 casos, assim como a degeneração hidrópica da camada basal e por fim nenhum dos casos apresentava qualquer nível de displasia (Tabela 6).

Tabela 6. Critérios histopatológicos da OMS – presença infiltrado inflamatório em banda, degeneração liquefeita da camada basal e ausência de displasia estratificado pelo diagnóstico da lesão

Critério Histopatológico OMS Presença de infiltrado inflamatório rico em plasmócitos em banda	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-RAM				

Presente	30	8	38			$p^{(1)}$
Ausente	0	1	1			<0.231*
Total	30	9	39			
Critério Histopatológico OMS Degeneração hidrópica da camada basal	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-RAM				
Presente	30	8	38			$p^{(1)}$
Ausente	0	1	1	-	-	<0.231*
Total	30	9	39			
Critério Histopatológico OMS Displasia	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-RAM				
Presente	0	0	0			
Ausente	30	9	39	-	-	-
Total	30	9	39			

(*) – Nível de significância 5.0%

(1) – Valor de p utilizando o Teste Exato de Fisher¹.

OR – Odds Ratio

IC – Intervalo de confiança

Foi possível observar através das análises estatísticas que os critérios histológicos foram muito semelhantes entre as duas lesões, seja LPO ou RLO-RAM, todas estas possuíram características histopatológicas muito semelhantes.

5.4.1.2 Outros aspectos microscópicos

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. Na tabela 7 pode-se observar a presença destes achados estratificados pela lesão.

Tabela 7. Presença de achados histopatológicos estratificados pelo diagnóstico da lesão

Hiperqueratose	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-RAM				
Presente	30	9	39			$p^{(1)}$ <0.647*
Ausente	0	0	0			
Total	30	9	39			
Hiperortoqueratose e hiperparaqueratose	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-RAM				
Hiperortoqueratose	11	3	14	1.1	0.2291- 5.282	$p^{(1)}$ <0.999*
Hiperparaqueratose	20	6	26			
Total	31	9	40**	**Um caso de LPO apresentou hiperpara e hiperortoqueratose		
Acantose	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-RAM				
Presente	11	4	15	0.723	0.1599- 3.276	$p^{(1)}$ <0.481*
Ausente	19	5	24			
Total	30	9	39			
Atrofia epitelial	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-RAM				

	LPO	RLO-RAM				
Presente	12	5	17	0,533	0.1185- 2.4	p ⁽¹⁾ <0.327*
Ausente	18	4	22			
Total	30	9	39			
Fenda subepitelial focal	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-RAM				
Presente	21	6	27	1.167	0.237 - 5.725	p ⁽¹⁾ <0.575*
Ausente	9	3	12			
Total	30	9	39			
Projeção em dente de serra	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-RAM				
Presente	19	7	26	0,49	0.0868- 2.806	p ⁽¹⁾ <0.352*
Ausente	11	2	13			
Total	30	9	39			
Derrame pigmentar	Diagnóstico da lesão		Total	OR	IC (95%)	p-Valor
	LPO	RLO-RAM				
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-RAM				
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-RAM				
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-RAM				
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-RAM				
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

Nos resultados expostos na tabela 7 foi possível observar que a presença do folículo linfóide em RLO-RAM foi estatisticamente significativa quando comparada com este mesmo dado em casos de LPO (p<0,04). Similarmente a estes dados, também foi possível diferenciar a lesão da RLO-RAM do LPO pela presença de infiltrado perivascular profundo que apresentou maior prevalência nos casos de RLO-RAM (p<0,001).

5.4.1.3 Profundidade do infiltrado inflamatório, acantose e atrofia

A média da profundidade do infiltrado inflamatório para os 39 casos analisados foi 2,91 μ m (min: 0,18; máx: 92,79; DP: 14,77).

Na tabela 8 podem ser observadas as médias da profundidade do infiltrado inflamatório, médias de atrofia e médias de acantose estratificadas pelo grupo de estudo de acordo com a presença de LPO ou RLO-RAM. Após tratamento estatístico, das análises morfométricas e comparativas entre o LPO e a RLO-RAM foi possível observar que não houve diferença entre a profundidade do infiltrado inflamatório nas lesões de LPO quando comparadas com as lesões de RLO-RAM ($p>0,05$). Similarmente, os resultados obtidos com relação à acantose e à atrofia, não foi possível diferenciar as lesões de LPO ou RLO-RAM, visto que estas lesões apresentaram graus de acantose e atrofia semelhantes ($p>0,05$).

Tabela 8. Análises morfométricas das profundidades do infiltrado inflamatório, acantose e atrofia, estratificadas pelos grupos de estudos

Morfometria	Diagnóstico	N	Média do Rank	Sumário dos Ranks	p-Valor
Profundidade do infiltrado inflamatório (μ m)	LPO	30	18,98	569,50	$p^{(1)} <0,309$
	RL	9	23,39	210,50	
	Total	39			
Acantose (μ m)	LPO	30	21,40	642,00	$p^{(1)} <0,161$
	RL	9	15,33	138,00	
	Total	39			
Atrofia (μ m)	LPO	30	21,43	643,00	$p^{(1)} <0,150$
	RL	9	15,22	137,00	
	Total	39			

(*) – Nível de significância 5.0%

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

5.4.2 Imunoistoquímica

Os resultados apresentados na tabela 9 mostram que apenas o CD20 constituiu um bom marcador para diferenciar LPO da RLO-RAM ($p<0,05$). Os resultados para a comparação entre as lesões de LPO e RLO-RAM para os demais marcadores não foram estatisticamente significantes.

Tabela 9 - Resultados de acordo com as leituras morfométricas estratificadas pelos marcadores imunoistoquímicos

Morfometria	Diagnóstico	N	Média do Rank	Sumario dos Ranks	p-Valor
Imunoistoquímica CD3	LPO	30	19,18	575,50	p ⁽¹⁾ <0,414
	RL	9	22,72	204,50	
	Total	39			
Imunoistoquímica CD8	LPO	30	18,63	559,00	p ⁽¹⁾ <0,172
	RL	9	24,56	221,00	
	Total	39			
Imunoistoquímica CD20	LPO	30	18,12	543,50	p ⁽¹⁾ <0,050
	RL	9	26,28	236,50	
	Total	39			
Imunoistoquímica Plasma_Cell	LPO	30	19,08	572,50	p ⁽¹⁾ <0,310
	RL	9	23,06	207,50	
	Total	39			
Imunoistoquímica Mast_Cell	LPO	30	20,28	608,50	p ⁽¹⁾ <0,775
	RL	9	19,06	171,50	
	Total	39			

(*) – Nível de significância 5.0%

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

A análise da distribuição normal dos resultados imunoistoquímicos para o anticorpo CD20, na figura 19 é possível observar a distribuição normal estratificada pelos casos analisados.

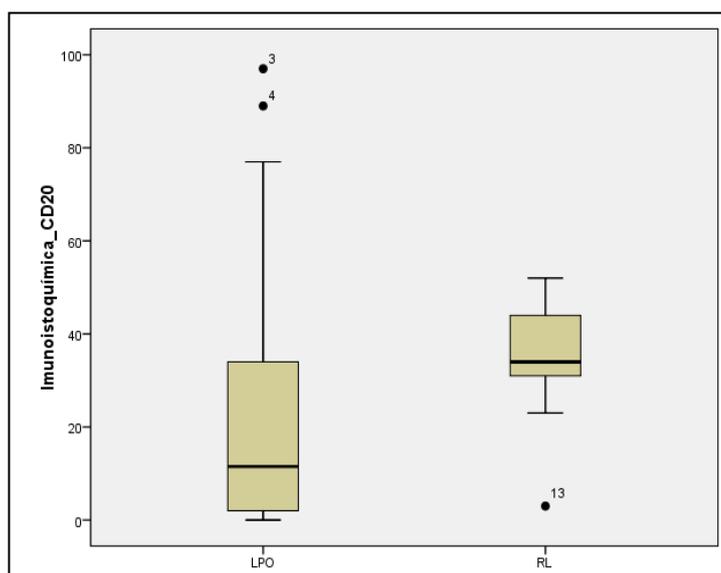


Figura 19 – Blox plot mostrando a distribuição normal dos resultados da imunoistoquímica do CD20 estratificada pela lesão

6 DISCUSSÃO

Todas estas lesões representam entidades de particular interesse à Estomatologia/Patologia Bucal, por outro lado, as doenças como o LPO e a RL, apresentam sintomatologias clínicas muito semelhantes e podem ser agrupadas em um estudo único, além de haver uma necessidade de compreensão mais adequada das suas etiopatogenias de modo a possibilitar um manejo clínico mais adequado (DeRossi; Ciarrocca, 2005).

O LPO é uma doença mucocutânea imunologicamente mediada que acomete mais pacientes do gênero feminino em uma proporção de 2:1. LPO é uma lesão relativamente comum. Alguns artigos de revisão recentes têm mostrado variando prevalências de 0,5-2,2% (Al-Hashimi et al., 2007), 1-2% (Scully et al. 1998) e 0,1-4% (Lodi et al., 2005). No entanto, há uma aparente falta de concordância entre os dados epidemiológicos nos estudos sobre a prevalência do LPO. Os dados deste estudo revelaram uma prevalência desta lesão na ordem de cerca de 1% da população, e houve uma prevalência maior em pacientes do sexo feminino na proporção 3:1, comparada com a prevalência e pacientes do sexo masculino, corroborando com os relatos da literatura (Xue et al., 2005; Ingafou et al., 2006). Por outro lado, as RLO-RAM, apresentaram uma prevalência na ordem de 0,4% na população estudada, sendo este dado inferior àqueles relatados na literatura (Franklin et.al. 2006).

Clinicamente o LPO e a RLO-RAM são muito semelhantes e possuem como características marcantes a presença de lesões bancas com estriações. De acordo com os critérios da OMS (Van der Meiji et al., 2003), essas características clínicas podem auxiliar no diagnóstico das lesões de LPO, no entanto, os resultados deste trabalho mostram que apenas o critério de lesões bilaterais e simétricas podem constituir um bom critério clínico que pode auxiliar na diferenciação entre o LPO e a RLO-RAM.

A hipossalivação foi mais freqüente em pacientes portadores de LPO e RLO-RAM, o quê pode ser relacionada à descarga de interleucinas que podem afetar a função de produção de saliva das glândulas salivares menores, como ocorre por exemplo, as síndrome de Sjögren e da cDECH (Socie et al., 1999; Al-Hashimi et al., 2007; DeRossi; Ciarrocca, 2005).

Similarmente aos critérios clínicos estabelecidos pela OMS para distinção do LPO e da RLO-RAM, foram estabelecidos critérios histopatológicos (Van der Meiji et al., 2003). Porém, os dados do estudo mostraram que as diferenças entre as lesões, levando-se em consideração os critérios estabelecidos pela OMS, não se constituíram como critérios com diferenças estatisticamente significantes. Os mesmos resultados foram observados nas demais avaliações microscópicas.

A disposição do infiltrado, embora subepitelial nos dois grupos, não apresentou diferença entre as lesões. O espessamento do epitélio frequentemente observada no LP, também foi observado nos casos de RLO-RAM, e não apresentou diferença estatística entre os grupos, e na profundidade do infiltrado inflamatório, e na espessura epitelial.

Muitos autores têm objetivado estabelecer uma caracterização histopatológica e imunoistoquímica do infiltrado inflamatório e dos eventos celulares a fim de relacioná-los com as manifestações clínicas dos diferentes tipos de LPO e doenças mediadas imunologicamente com manifestações liquenóides, como a RLO-RAM e as lesões liquenóides da cDECH (McCartan; Lamey, 1997; Mega; Jiang; Takagi, 2001; Soares et al., 2005; Bascones-Ilundain et al. 2006; Köse et al., 2007). Porém dos imunomarcadores utilizados, apenas o CD20 pôde constituir um bom marcador para diferenciar as duas lesões ($P < 0,05$).

Diante dos resultados obtidos, foi possível observar a importância do acompanhamento das lesões leucoplásicas estriadas, pois podem representar lesões como leucoplasias verrucosas proliferativas, LPO ou RLA-RAM. E que a diferença entre as lesões liquenóides é possível de ser realizada após imunomarcagem com o CD20 e aplicando-se o critério clínico de lesões bilaterais da OMS, contudo o diagnóstico final dependerá de um acompanhamento clínico de pelo menos 5 anos após o primeiro diagnóstico.

7 CONCLUSÕES

Por meio da metodologia empregada foi possível observar que LL são mais prevalentes em pacientes do gênero feminino e idades em torno de 53 anos. A hipossalivação é um sinal presente em pacientes portadores de LL. De acordo com os critérios clínicos da OMS para LL, apenas a presença de lesões bilaterais constituiu um bom diferenciador entre o LPO e a RLO-RAM. De acordo com os critérios histopatológicos da OMS não foi possível diferenciar as duas entidades patológicas. A presença de infiltrado inflamatório profundo foi mais prevalente em lesões de RLO-RAM e por fim, a imunohistoquímica para o anticorpo CD20 pode ser um bom marcador na diferenciação destas duas LL.

REFERÊNCIAS

Al-Hashimi I, Schifter M, Lockhart PB, Wray D, Brennan M, Migliorati CA, Axéll T, Bruce AJ, Carpenter W, Eisenberg E, Epstein JB, Holmstrup P, Jontell M, Lozada-Nur F, Nair R, Silverman B, Thongprasom K, Thornhill M, Warnakulasuriya S, van der Waal. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Mar;103 Suppl:S25.e1-12. Epub 2007 Jan 29. Review.

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

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 Aug;53(8):521-4.

Barrett AJ, Le Blanc K. Prophylaxis of acute GVHD: manipulate the graft or the environment? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008 Jun;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 Jan-Feb;26(1A):357-62.

DeRossi SS, Ciarrocca KN. Lichen planus, lichenoid drug reactions, and lichenoid mucositis. *Dental Clinics of North America* Volume 49, Issue 1, January 2005, Pages 77-89

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 Apr 22;200(8):447-50; discussion 443

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

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

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 Jun;49(2):133-9 Bornstein *et al.*, 2004

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.

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 Apr;26(4):176-80. Mega; Jiang; Takagi, 2001

Mega, H; Jiang, W-W; 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 Diseases.* 7(5):296-305.

Navazesh M Methods for collecting saliva. *Ann NY Acad Sci.* 1993; 20:72-77.

Navazesh M Methods for collecting saliva. *Ann NY Acad Sci.* 1993; 20:72-77.

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 Apr;81(4):459-65.

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

Soares AB, Faria PR, Magna LA, Correa ME, de Sousa CA, Almeida OP, Cintra ML. Chronic GVHD in minor salivary glands and oral mucosa: histopathological

and immunohistochemical evaluation of 25 patients. *J Oral Pathol Med*. 2005 Jul;34(6):368-73.

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):350-365.

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 modification. *J Oral Pathol Med* 2003;32:507-12.

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 Sep;34(8):467-72.