

OLÍVIA TOSTA DE MACEDO VIANNA MATEUS

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO FOXP3⁺ EM LESÕES DE
LÍQUEN PLANO BUCAL, CUTÂNEO E HIPERPLASIA FIBROSA
INFLAMATÓRIA**

CAMPO GRANDE

2017

OLÍVIA TOSTA DE MACEDO VIANNA MATEUS

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO FOXP3⁺ EM LESÕES DE
LÍQUEN PLANO BUCAL, CUTÂNEO E HIPERPLASIA FIBROSA
INFLAMATÓRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínicas Odontológicas, área de concentração Patologia Bucal, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Mara Giordano de Barros

CAMPO GRANDE

2017

OLÍVIA TOSTA DE MACEDO VIANNA MATEUS

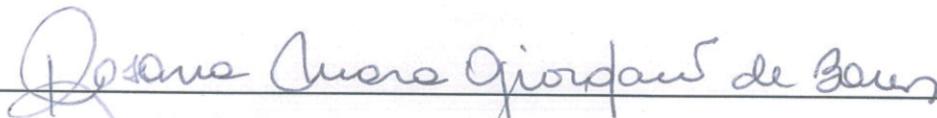
**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO FOXP3⁺ EM LESÕES DE
LÍQUEN PLANO BUCAL, CUTÂNEO E HIPERPLASIA FIBROSA
INFLAMATÓRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínicas Odontológicas, área de concentração Patologia Bucal, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de mestre.

Resultado: APROVADA

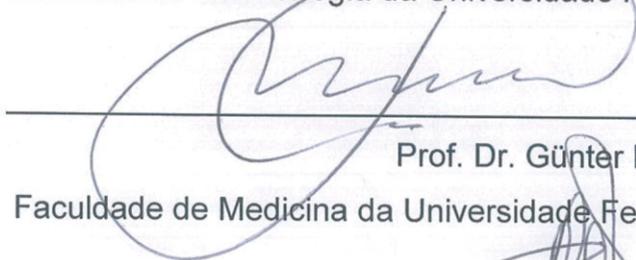
Campo Grande (MS), 20 de janeiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



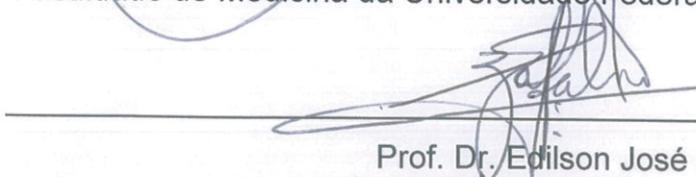
Profa. Dra. Rosana Mara Giordano de Barros (Presidente)

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul / UFMS



Prof. Dr. Günter Hans Filho

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul / UFMS



Prof. Dr. Edilson José Zafalon

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul / UFMS

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus** pela oportunidade concedida de fazer uma pós-graduação em uma Universidade Pública, com professores competentes. Permitiu ampliar meus conhecimentos, realizar um sonho antigo de me especializar numa área em que sou apaixonada desde a graduação! Por todo o carinho e cuidado que Ele derramou sobre mim, principalmente me mantendo firme e esperançosa diante das dificuldades!

Agradeço à minha orientadora, **Profa. Dra. Rosana Mara Giordano de Barros**, que eu admiro muito desde a minha graduação, por ter me acolhido como sua orientanda, por ter dispendido tempo, carinho, por ter me ensinado a ser uma futura Mestre, educadora, por ter permitido aprender a ver a patologia de maneira apaixonada, dividir seu conhecimento, sua experiência, seriedade, por ser uma referência em sua área para mim e muitos outros que a conhecem!

Agradeço ao meu príncipe amado, meu esposo e amigo **Tiago Henrique**, por ter me acompanhado com paciência, ter me incentivado constantemente, por ser meu mais fiel torcedor, o crítico e professor quando necessário. Agradeço pelos seus conselhos, pelo amor desmedido, pelo conforto, amparo e carinho dado, pelos meios que me permitiu concluir e prosseguir sempre!

Agradeço à minha família, **meu pai e irmão**, por serem tão leais e queridos para mim, por me incentivar, animar quando estava desmotivada, por me amarem diariamente mesmo com suas vidas corridas, sempre se interessando pela correria dos meus dias!

Agradeço aos professores doutores **Paulo Zárate, Albert Schiaveto, Günter Hans Filho e Maria Auxiliadora Abdo**, por todo apoio oferecido, as dúvidas tiradas, a atenção oferecida que me permitiu fazer um excelente trabalho proporcionando meios para minha conclusão!

Agradeço aos meus **colegas de turma do mestrado**, por terem me oferecido a amizade, o carinho, partilhado conhecimentos, principalmente por ter conhecido

cada um de vocês durante este período, pelo excelente convívio e espírito de cooperação. Uma turma sensacional, que fez toda a diferença na minha vida durante esses dois anos que convivemos juntos!

Agradeço aos **meus amigos queridos**, aqueles muitos em que pude dividir minhas alegrias, tristezas, decepções e vitórias durante esse período! Vocês são lindos! Sempre compreensivos comigo, com meus períodos de estudo e não socialização. Por me amarem sempre! Por quererem meu bem-estar, pelas orações intercedidas, pelo silêncio ofertado...enfim, por toda parceria oferecida!!!

Agradeço à **Sílvia Cieslak**, que foi uma mão na roda, ajudando sempre que necessário, com disposição e dedicação.

Agradeço à **Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT)**, pelo apoio financeiro, através do edital Universal nº 10/2015: 34440.494.2601.24082015; por apoiar a educação, permitindo o estudo, ensino, empreendedorismo como meio de novas descobertas, na busca de novas ideias e soluções para o desenvolvimento da ciência e do homem.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Mateus OTMV. Expressão imunoistoquímica do Foxp3⁺ em lesão de líquen plano bucal, cutâneo e hiperplasia fibrosa inflamatória. Campo Grande; 2017.
[Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O Foxp3⁺ é um marcador específico para as células T regulatórias CD4⁺, que apresentam papel principal na manutenção e homeostase imunológica. Nos últimos 10 anos têm sido de muito interesse na compreensão da tolerância imunológica e das disfunções destas células no desenvolvimento de doenças autoimunes. Estudos recentes mostram sua relação na patogênese do líquen plano. O objetivo da pesquisa foi examinar a imunoexpressão do Foxp3⁺ em 25 casos de líquen plano bucal (LPB), 14 casos de líquen plano cutâneo (LPC) e 11 casos de hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI). Através da contagem de células imunomarcadas por campo, a análise estatística foi realizada pelo Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, com nível de significância de 5%. Em relação à contagem de células imunomarcadas de Foxp3⁺ os resultados apresentaram expressão média de Foxp3⁺ em LPC significativamente maior comparada ao LPB e HFI (ambos $p > 0,0001$). Este estudo demonstrou que existe atividade linfocítica para as células T CD4⁺ devido ao aumento na expressão de Foxp3⁺ em lesões de LP e suas variantes, contudo sendo maior para o cutâneo que o bucal, devido a possível diferença clínica e variáveis da doença. A presença das células Treg no processo inflamatório sugere um papel potencial na autoimunidade dos processos patológicos do líquen plano.

Palavra-chave: Imunoistoquímica. Foxp3⁺. Líquen plano bucal. Líquen plano cutâneo.

ABSTRACT

Mateus OTMV. Immunohistochemistry expression of Foxp3⁺ in lesions of oral lichen planus, cutaneous and inflammatory fibrous hyperplasia. Campo Grande; 2017. [Master's dissertation – Federal University of Mato Grosso do Sul].

Foxp3⁺ is a specific marker for CD4⁺ regulatory T cells, which play a major role in immune maintenance and homeostasis. In the last 10 years they have been of great interest in understanding the immune tolerance and dysfunctions of these cells in the development of autoimmune diseases. Recent studies show its relation in the pathogenesis of lichen planus. The aim of the study was to examine Foxp3⁺ immunoexpression in 25 cases of oral lichen planus (OLP), 14 cases of cutaneous lichen planus (CLP) and 11 cases of inflammatory fibrous hyperplasia (IFH). By counting immunoblotted cells by field, the statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis and Dunn post-test, with a significance level of 5%. Regarding the count of Foxp3⁺ immunoblotted cells, the results showed significantly higher Foxp3⁺ expression in CLP compared to OLP and IFH (both $p > 0,0001$). This study demonstrated that there is lymphocytic activity for CD4⁺ T cells due to the increase in Foxp3⁺ expression in LP lesions and their variants, but it is larger for the cutaneous than the oral, due to possible clinical difference and disease variables. The presence of Treg cells in the inflammatory process suggests a potential role in the autoimmunity of pathological processes of lichen planus.

Keywords: Immunohistochemistry. Foxp3⁺. Oral lichen planus. Cutaneous lichen planus.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Mecanismo de tolerância periférico das células T..... | 22 |
| Figura 2 - Atuação das Tregs na resposta imune..... | 23 |
| Figura 3 - Gatilho das células T CD8 ⁺ na apoptose dos queratinócitos..... | 31 |
| Figura 4 - Desenho da atividade celular da imunopatogenia do LPB..... | 32 |
| Figura 5 - (a) Método direto imunoistoquímico; (b) Método indireto imunoistoquímico. | 39 |
| Figura 6 - Corte histológico do líquen plano bucal corado em HE, mostrando camada de ortoqueratina, epitélio atrófico, e infiltrado inflamatório intraepitelial (400x)..... | 50 |
| Figura 7 - Corte histológico do líquen plano cutâneo corado em HE, exibindo hiperortoqueratina, epitélio hiperplásico, e denso infiltrado inflamatório justaepitelial (200x). | 50 |
| Figura 8 - Imunoexpressão do marcador Foxp3 ⁺ em líquen plano bucal, mostra marcação intraepitelial e justaepitelial (200x). | 54 |
| Figura 9 - Imunoexpressão do marcador Foxp3 ⁺ em líquen plano bucal, exibindo marcação intraepitelial (400x). | 55 |
| Figura 10 - Imunoexpressão do marcador Foxp3 ⁺ em líquen plano cutâneo, apontando marcação intraepidêmico e justaepidêmico (200x). | 55 |
| Figura 11 – Imunoexpressão do marcador Foxp3 ⁺ em líquen plano cutâneo, apontando marcação justaepidêmico (400x). | 56 |
| Figura 12 - Imunoexpressão do marcador Foxp3 ⁺ em hiperplasia fibrosa inflamatória, exibindo marcação justaepidêmico (200x). | 56 |

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Caracterização relativa (em %) dos casos diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da Faodo (UFMS) e Laboratório da Famed (UFMS), no período de 2007 a 2015. Campo Grande(MS). (n=50).....47
- Gráfico 2** - Frequência de células Treg imunomarcadas pelo anticorpo Foxp3⁺ em região justaepitelial por campo dos casos diagnosticados no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (n=50).....52
- Gráfico 3** - Frequência de células Treg imunomarcadas pelo anticorpo Foxp3⁺ em região intraepitelial por campo dos casos diagnosticados no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (n=50).....53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição e caracterização relativa (em %) dos casos de líquen plano bucal diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da Faodo (UFMS), no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (n=25).48
- Tabela 2** - Distribuição e caracterização relativa (em %) dos casos de líquen plano bucal e cutâneo quanto a queratinização, epitélio/epiderme e exocitose das lesões diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da Faodo (UFMS) e Laboratório da Famed (UFMS), no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (LPB, n=25 e LPC, n=14).49
- Tabela 3** - Quantidade, média \pm erro padrão e probabilidade relativo à contagem de células justaepiteliais imunomarcadas do Foxp3⁺ por campo dos casos diagnosticados no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (n=50)51
- Tabela 4** - Diferença média e valor de P obtidos através da quantidade de células imunomarcadas justaepiteliais do Foxp3⁺ por campo, dos casos diagnosticados no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (n=50)52
- Tabela 5** - Quantidade, média \pm erro padrão e probabilidade relativo à contagem de células intraepiteliais imunomarcadas do Foxp3⁺ por campo dos casos diagnosticados no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (n=50)53
- Tabela 6** - Diferença média e valor de P obtidos através da quantidade de células imunomarcadas justaepiteliais do Foxp3⁺ por campo, dos casos diagnosticados no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (n=50)54

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Critérios de diagnóstico histopatológico proposto pela OMS para LPB, modificados por Van der Meij e Van der Waal, 2003.43
- Quadro 2** - Característica do anticorpo utilizado para imunomarcção Foxp3⁺44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- μm – micrômetro
- APC – Células apresentadoras de antígeno
- CD – Unidade de diferenciação
- CD95-Fas – Receptor de apoptose de diferenciação 95
- Células T – Linfócitos T
- CL – Células de Langerhans
- CTLA-4 – Proteína citotóxica dos linfócitos T4 associado
- CXCR3 – Receptor de quimiocina cxc 3
- Fas – Receptor de apoptose
- Foxp3⁺ – Fator de transcrição *forkhead 3*
- GITR – Receptor TNF induzido por glicocorticoide
- HE – Hematoxilina eosina
- HFI – Hiperplasia fibrosa inflamatória
- HLA – Antígeno leucocitário humano
- IFN- γ – Interferon-gama
- IL- 17 – Interleucina 17
- IL-2 – Interleucina 2
- IPEX – Immunodesregulação poliendocrinopatia enteropatia ligada ao X
- iTreg – Célula T regulatória induzida
- LP – Líquen plano
- LPB – Líquen plano bucal
- LPC – Líquen plano cutâneo
- MHC I – Complexo principal de histocompatibilidade classe I
- MHC II – Complexo principal de histocompatibilidade classe II
- MMP 9 – Matriz metaloproteinase 9
- mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
- nTreg – Célula T regulatória natural
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- CCE – Carcinoma de células escamosas
- TCD4⁺ - Linfócitos T auxiliares
- TCD8⁺ - Linfócitos T citotóxicos

Th1 – Linfócitos T *helper* 1

Th-17 – Linfócitos T *helper* 17

TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa

Treg – Célula T regulatória

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

α – alfa

β – beta

γ – gama

+ – mais

> – maior

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 2.1 | Fator de transcrição <i>forkhead 3</i> (Foxp3⁺) | 19 |
| 2.2 | Líquen plano | 27 |
| 2.3 | Hiperplasia fibrosa inflamatória | 35 |
| 2.4 | Imunoistoquímica | 37 |
| 3 | OBJETIVO | 40 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODO | 41 |
| 4.1 | Considerações éticas | 41 |
| 4.2 | Caracterização do estudo | 41 |
| 4.3 | Amostra | 41 |
| 4.4 | Critérios de seleção da amostra e análise de critérios | 42 |
| 4.4.1 | Critérios de inclusão | 42 |
| 4.4.2 | Critérios de exclusão | 42 |
| 4.5 | Preparo, confecção e produção das lâminas | 42 |
| 4.6 | Estudo morfológico | 42 |
| 4.7 | Estudo imunoistoquímico | 43 |
| 4.7.1 | Método imunoistoquímico do Foxp3 ⁺ | 44 |
| 4.8 | Análise do perfil imunoistoquímico | 46 |
| 4.9 | Análise estatística | 46 |
| 5 | RESULTADOS | 47 |
| 5.1 | Caracterização da amostra | 47 |
| 5.2 | Estudo morfológico | 48 |
| 5.3 | Imunoistoquímica para o Foxp3⁺ | 51 |
| 6 | DISCUSSÃO | 57 |
| 7 | CONCLUSÃO | 61 |
| | REFERÊNCIAS | 62 |
| | ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa | 69 |
| | ANEXO B – Numeração dos blocos utilizados no estudo | 73 |

| | |
|--|-----------|
| APÊNDICE A – Solicitações de autorização para consulta de prontuários, laudos e empréstimo de materiais dos laboratórios..... | 74 |
|--|-----------|

1 INTRODUÇÃO

O Grupo de Definições de Biomarcadores de Saúde definiu um biomarcador como "uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica." Já a Organização Mundial de Saúde (OMS) em coordenação com as Nações Unidas e a Organização Internacional do Trabalho, definiu como "qualquer substância, estrutura ou processo que pode ser medido no corpo ou seus produtos, e influenciar ou prever a incidência de resultado ou doença" (BIOMARKERS DEFINITION WORKING GROUP, 2001; WHO, 2001).

Os biomarcadores podem fornecer aos pesquisadores provas provisórias sobre a segurança e eficácia de tratamentos, reduzindo o risco de danos aos indivíduos. Permitem aos investigadores a oportunidade de interromper intervenções potencialmente nocivas para dados clínicos. Em outros casos, os biomarcadores podem simplesmente projetar estudos menores e mais eficientes, reduzindo o número de pacientes voluntários expostos a um determinado tratamento experimental. Encurtam tempo de aprovação de novos fármacos acelerando o processo, são eficazes para atingir populações de pacientes-alvo mais cedo, ou mesmo materiais e recursos humanos para outros projetos de pesquisa ou ensaios clínicos. Assim, desempenham um papel crítico no processo de desenvolvimento de fármacos. Entender a relação entre os indicadores mensuráveis de processos biológicos e resultados clínicos é vital para expandir tratamentos de doenças, e aprofundar nossa compreensão da fisiologia normal, saudável (STRIMBU; TAVEL, 2011).

O fator transcricional *forkhead box 3* (Foxp3⁺) possui um marcador bioquímico para definir sua expressão em células T regulatórias (Tregs). Estas células apresentam papel central na proteção do indivíduo para a autoimunidade, a fim de estabelecer e manter a homeostase imunológica, por meio de mecanismos regulatórios que são induzidos por agentes patogênicos e agressores ambientais (VIGNALI et al., 2008).

Devido a deficiência de Foxp3⁺ resultar em doença autoimune sistêmica precoce (GAVIN et al., 2007), esta pesquisa teve o propósito de determinar o número de células Treg Foxp3⁺ no infiltrado inflamatório do LPB (líquen plano bucal) e correlacionar os achados com as características clínicas e histopatológicas das lesões de LPC (líquen plano cutâneo) e HFI (hiperplasia fibrosa inflamatória).

Estudos que investigam a presença e a função das células Tregs FoxP3⁺ no LPB são insuficientes. Em razão da etiologia permanecer desconhecida e da apresentação clínica variável da doença, estudos que investigam essas diferenças são de fundamental importância para diagnóstico e tratamento mais adequados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fator de transcrição *forkhead 3* (Foxp3⁺)

As células T regulatórias (Tregs) são um subconjunto de células que possuem a função de suprimir respostas imunes e manter a autotolerância (FEUERER et al., 2009).

Desde 1995, Sakagushi et al. relataram que as células Tregs CD4⁺CD25⁺ foram identificadas como uma subpopulação de células T. Por muito tempo, imunologistas foram céticos com o papel natural supressivo das células T. No decorrer dos anos, o progresso em compreensão de suas funções imunossupressivas auxiliaram a resolver precocemente processos patológicos (LI et al., 2015).

Em 2003, o fator de transcrição *forkhead* – Foxp3⁺, foi identificado como o novo marcador específico para células Tregs, e sua expressão foi considerada necessária e suficiente para a atividade supressora. A identificação do Foxp3⁺ progrediu essencialmente para o desenvolvimento, diferenciação e função supressora das células Treg (FONTENOT et al., 2003).

Foxp3⁺ é o regulador mestre para a geração de Tregs e suas funções supressoras. Mutações do gene Foxp3⁺ em seres humanos acarretam em deficiência de Tregs e são responsáveis pela síndrome de imunodesregulação poliendocrinopatia enteropatia ligada ao X (IPEX). São células derivadas do timo, as células T regulatórias naturais (nTreg), e constituem o maior aglomerado de células no sangue, ou induzidas periféricamente (iTreg), sendo predominantes em locais de inflamação e no intestino. (PANDIYAN; ZHU, 2015).

De acordo com Miyara e Sakaguchi (2011), a subpopulação de células T CD4⁺ que expressa Foxp3⁺ são indispensáveis para a manutenção da autotolerância imunológica e da homeostase. Explicado pelo desenvolvimento espontâneo de doença autoimune, alergia e imunopatologia após a remoção de células Tregs Foxp3⁺ ou como resultado de mutação de Foxp3⁺ em roedores e seres humanos. Inibem respostas imunes eficazes contra tumores autólogos. Apresentam ampla evidência, não somente para tratamento de doenças imunológicas, incluindo doenças autoimunes, mas também para estabelecer a tolerância da transplantação expandindo Foxp3⁺ Tregs ou para aumentar a imunidade tumoral, reduzindo-os.

Gratz et al., em 2013, analisaram, por meio de revisão literária, a vida das células Tregs e o papel destas na manutenção, autotolerância e prevenção de reações autoimunes. Observaram que as células Tregs surgem como uma consequência do reconhecimento próprio do antígeno durante a maturação das células no timo, e também nas regiões periféricas dos tecidos linfóides. Tanto no timo como na região periférica, a geração das células T reconhecem e respondem ao antígeno. Subsequentemente se expandem, e migram para o tecido atingido, multiplicam-se em número e aumentam sua atividade supressora, acumulando-se no tecido onde está localizado o antígeno. A fração ativada das células Tregs, chamada de efetoras, sobrevivem na ausência da expressão do antígeno e continuam controlando a reação inflamatória nos tecidos, funcionando como uma população de memória das células Tregs. A exposição do antígeno e a presença da interleucina-2 (IL-2) são determinantes na geração das células Tregs de memória, já que esta citocina promove o desenvolvimento efetor das células T *helper* 1 (Th1), essencial para geração e função destas células. Estes resultados dão base para o estudo do papel das células Tregs de memória no controle, tratamento de doenças autoimunes e, para testar a hipótese de que os defeitos na geração e manutenção destas células resultam em doenças inflamatórias crônicas e recidivantes.

Uma questão fundamental em imunologia é a compreensão de como o sistema imunológico é capaz de discriminar entre o eu e não-eu, inibindo respostas autoimunes, mas atuando contra antígenos microbianos. O sistema imunológico tem evoluído em vários mecanismos para estabelecer e sustentar a ausência de resposta para autoantígenos (autotolerância imunológica), incluindo a eliminação física ou inativação funcional autoreativa dos linfócitos (deleção clonal e anergia, respectivamente). Há também evidência substancial que as células T mediadas pela supressão das células T autoreativas são outro mecanismo essencial da autotolerância. Embora o fato das células T controlarem negativamente respostas imunes não seja nova para os imunologistas, há uma grande controvérsia sobre se as células realmente constituem a entidade celular funcionalmente distinta no sistema imunitário e, se são importantes em controlar desordens imunológicas tais como doenças autoimunes. Nos últimos anos, porém, a comunidade científica tem testemunhado a retomada do interesse pelas células Tregs em muitos campos da imunologia básica e clínica. Esta mudança é devida a melhor compreensão de que o sistema imune produz endogenicamente um constituinte celular normal, a T CD4⁺,

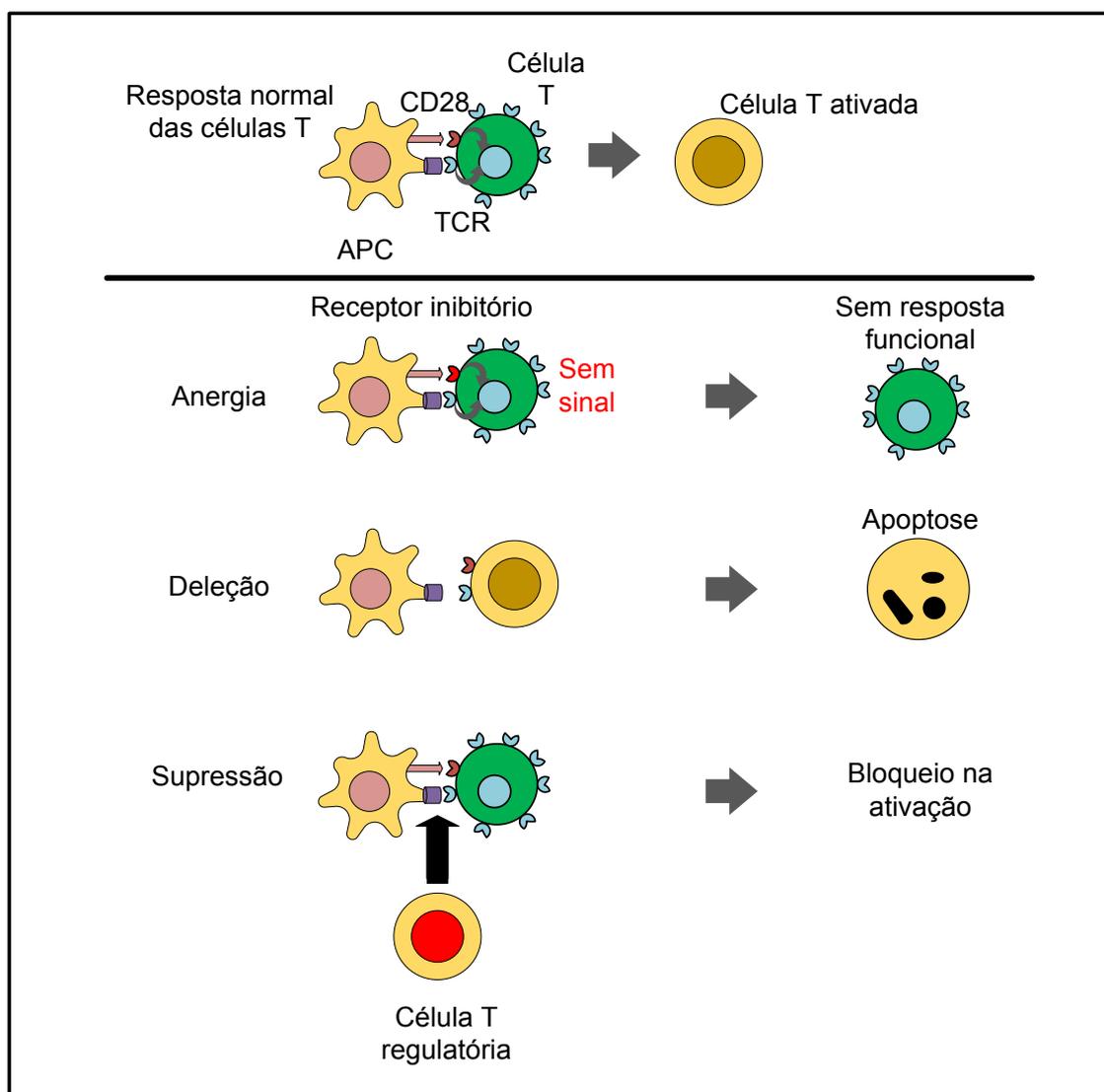
subpopulação de células T que são altamente especializadas na função supressora, e que a anormalidade no número ou função destas células podem ser uma causa principal de doenças autoimunes e outras doenças inflamatórias em animais e seres humanos. Apesar das células nTreg constituírem de 5 a 10% de todas as células T CD4⁺ periféricas, sua presença é vital para o indivíduo (SAKAGUCHI, 2005).

Independente da linhagem, todos os linfócitos regulatórios identificados inibem a autoimunidade e induzem a autotolerância por dois mecanismos gerais. As células regulatórias podem exercer sua função supressiva em células T, B e dendríticas, através do contato direto ou por secreção de citocinas, geralmente por inibição extrínseca à célula. A tolerância é também induzida por mecanismos intrínsecos à célula, como deleção clonal de células autoreativas, edição de receptores de células B ou R que reconhecem o próprio, e a iniciação de sinais de anergia ou apoptose na periferia após contato com antígenos próprios. Apesar das células Tregs serem consideradas os agentes supressores de maior importância, outros tipos celulares também exercem papéis cruciais na manutenção da homeostase imunológica, incluindo células T CD8⁺, B e T CD4⁺ (SKAGGS et al., 2008).

Nas divisões das células T, a tolerância ou a falta de resposta rápida para autoantígenos é mantida pela liberação de células T imaturas que reconhecem estes antígenos no timo, e por vários mecanismos que são operados na periferia. A tolerância periférica é atribuível à indução de anergia funcional, eliminação por apoptose e as ações supressivas dos linfócitos Tregs (Figura 1). A linha germinal das mutações ou exclusões específicas de vários genes conduzem a autoimunidade interrompendo uma ou outra via de tolerância. Por exemplo, a exclusão ou mutação do fator de transcrição Foxp3⁺ ou o fator de crescimento IL-2 interferem na geração e/ou função das células T CD4⁺CD25⁺ Tregs, e a ausência de IL-2 também pode reduzir a morte celular por apoptose mediada por Fas (receptor de apoptose). A perda de Foxp3⁺ ou IL-2 está associada a proliferação linfática e manifestações múltiplas de autoimunidade. A destruição do inibidor do receptor de proteína citotóxica dos linfócitos T-4 associado (CTLA-4) interfere na indução da anergia das células T, e conduz a autoimunidade sistêmica. A existência de múltiplas vias da tolerância, aparentemente obrigatória, levanta a questão óbvia de que cada etapa é essencial na manutenção da autotolerância. A resposta possível é que cada percurso mantém a tolerância a um subconjunto de autoantígenos, assim, a perda de qualquer um irá resultar em um conjunto limitado de reações autoimunes. Uma possível alternativa é

que múltiplos mecanismos devem trabalhar em conjunto para manter a autotolerância e romper qualquer alteração no equilíbrio entre a tolerância e autoimunidade. Logo, se a tolerância falhar, conseqüentemente desenvolvem-se as doenças autoimunes (ABBAS et al., 2004).

Figura 1 - Mecanismo de tolerância periférico das células T.

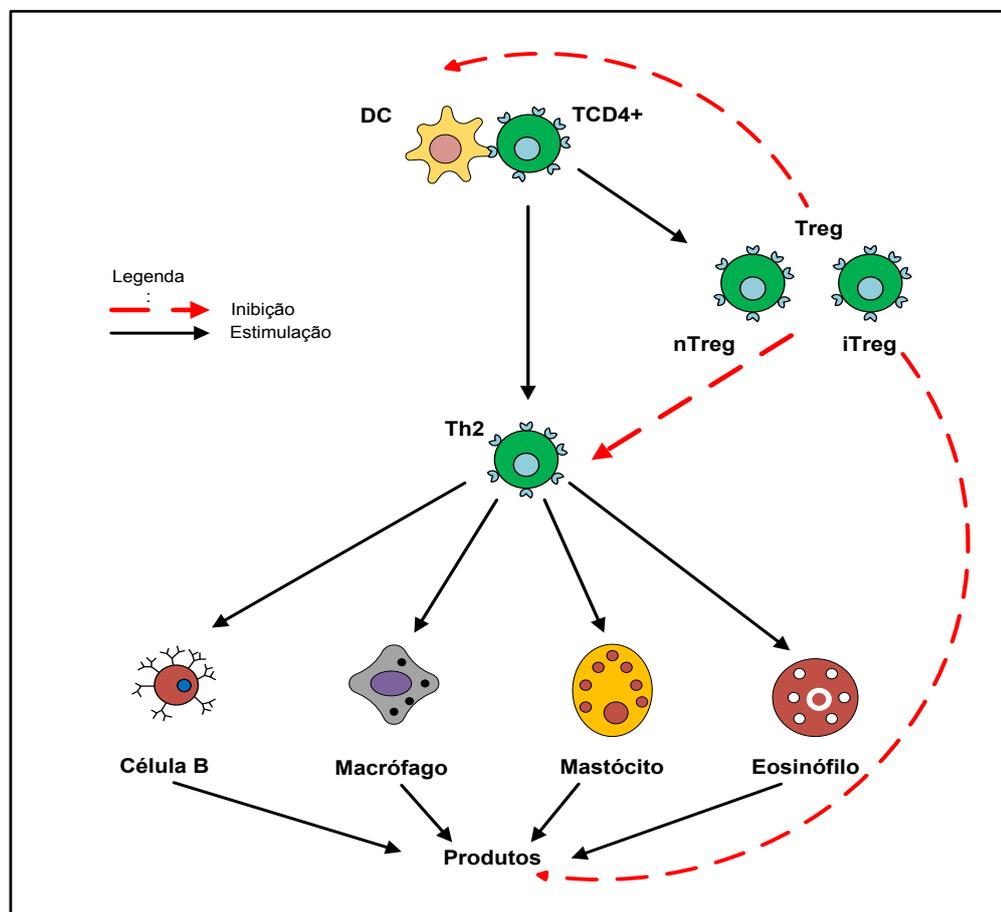


*Fonte: Adaptada de Abbas et al., 2004.

Em análise literária, Piccirillo, em 2008, observou que subconjuntos de células nTreg e iTreg, particularmente as células T $CD4^+ Foxp3^+$, ilustrada na Figura 2, são fundamentais para o controle de respostas imunológicas em seres humanos e roedores. A diminuição de $Foxp3^+$ nTreg causa desenvolvimento espontâneo de

doenças autoimunes, aumenta a resposta imune à invasão de patógenos desencadeando reações alérgicas, não permitem a tolerância ao feto durante a gravidez, e não respondem a células tumorais, sendo importante para regulação orgânica específica da autoimunidade. O Foxp3⁺ é um regulador transcricional da programação genética de desenvolvimento e função das células Tregs. Sua alteração genética pela perda de proteínas e das células Tregs promove a hiperativação de células T CD4⁺ desencadeando doenças autoimunes.

Figura 2 - Atuação das Tregs na resposta imune.



*Fonte: Adaptada de Piccirillo, 2008.

Hori et al., (2003) afirmaram em seu estudo que a expressão de Foxp3⁺ é predominantemente restrita à população de células CD4⁺CD25⁺, tanto no timo quanto nos tecidos linfóides periféricos, e que essa expressão é estável nas células Tregs CD4⁺CD25⁺ independentemente do modo ou estado de ativação. Verificaram que a expressão ectópica do Foxp3⁺ foi suficiente para converter células T não-regulatórias

em um fenótipo de células Tregs capazes de suprimir a proliferação de outras células T, através da inibição da produção de IL-2. Além de que, o Foxp3⁺ é o marcador mais confiável para identificação de tal subtipo celular.

O papel do Foxp3⁺ no desenvolvimento das células Tregs e como marcador, tem facilitado muito as descobertas imunológicas. Mutações no Foxp3⁺ de ratos humanizados foram identificados como o único defeito genético subjacente aos fenótipos das doenças autoimunes. Estas doenças autoimunes surgem a partir de uma falta funcional das Tregs no qual demonstrou que o gene de transferência Foxp3⁺ converteu espontaneamente as células T CD4⁺CD25⁺ para uma população reguladora (BANHAM et al., 2006).

Sugiyama et al., (2005) afirmaram que o equilíbrio entre as funções regulatórias e efectoras são importantes na manutenção de respostas imunes eficientes e na prevenção da autoimunidade. Estes autores observaram que uma subpopulação de células Tregs caracterizada como CD4⁺CD25^{high}CTLA4⁺Foxp3^{high} era deficiente em sua atividade supressora no sangue periférico de pacientes com psoríase. Essa deficiência foi demonstrada através da proliferação acelerada de células T CD4⁺ reativas, que expressou receptor de quimiocina cxc 3 (CXCR3). As células Tregs foram isoladas da pele afetada pela psoríase, revelando uma deficiência na função supressora contra as células T efectoras. Dessa forma, os autores afirmaram que a falha na atividade supressora das células Tregs, tanto no sangue quanto nos tecidos lesionados, pode conduzir a uma hiperproliferação de células T patogênicas na psoríase.

A atividade funcional das células T e das células Tregs devem estar em condições equilibradas para possibilitar respostas imunes adequadas. Portanto, anormalidades no número e na função das células Tregs prejudicam o controle do mecanismo de regulação imune e podem contribuir para a patogênese de certas doenças. A identificação dessas células em condições normais e inflamatórias pode contribuir para um melhor entendimento de doenças associadas. De Boer et al. (2007) investigaram a expressão de Foxp3⁺ e do receptor TNF (fator de necrose tumoral) induzido por glicocorticóide (GITR) na pele normal e em diferentes dermatoses inflamatórias: líquen plano (LP), psoríase, dermatite espongíotica e leishmaniose. Os resultados revelaram que o Foxp3⁺ e o GITR estavam quase que exclusivamente presentes nas células T que expressaram tanto CD4⁺ quanto CD25⁺. Em geral, a frequência das células Foxp3⁺ se mostrou similar em pele normal e no LP. Estas

frequências também não variavam entre os outros processos patológicos, contudo, em doenças distintas, onde há maior atividade da doença, maior o número de células Tregs encontradas. Na pele normal, uma grande variação na frequência de células Foxp3⁺ foi encontrada entre os diferentes pacientes. Estes dados, no entanto, não indicam necessariamente que as células Tregs não estão envolvidas na patogênese das doenças inflamatórias em pele.

Embora estudos prévios que buscaram relacionar a densidade/quantidade do infiltrado inflamatório no LPB com as formas clínicas (reticular e erosiva) não mostrem relação entre as duas variáveis, estes sugerem haver uma relação entre a apresentação clínica da lesão e a qualidade do infiltrado inflamatório, que justifica o interesse em identificar os tipos celulares específicos neste infiltrado para então qualificá-lo (SEOANE et al., 2004).

Firth et al. (2015) em estudo comparativo do número de células expressando Foxp3⁺ e IL-17 em LPB com mucosa inflamada cronicamente, observaram através da imunistoquímica que tanto qualitativamente quanto quantitativamente, a expressão do Foxp3⁺/IL-17 foram significativamente maiores em LPB que em processo inflamatório crônico. As células T *helper* (Th) são proeminentes em lesões precoces, principalmente no tecido conjuntivo superficial com células ocasionais no epitélio. Estas células têm citocina Th1 e secretam outras citocinas, incluindo interferon-gama (INF- γ) que ativam os macrófagos e as células T CD8⁺ citotóxicas. Em LPB avançado, houve um aumento da proporção de T CD8⁺ resultando em Th e acúmulo de T CD8⁺ causando danos aos queratinócitos basais. Além das células Th1 e Th2, mais dois subconjuntos Th têm sido descritos. As células Tregs são um subconjunto Th especializado em expressar o Foxp3⁺ sendo importantes na regulação que controla a resposta imune. As células Tregs poderiam auxiliar no tratamento de LPB, uma vez que estas células têm sido alvo para terapia com sucesso de outras doenças mediadas imunologicamente. A manipulação de vários fatores de transcrição pode desdiferenciar ou referenciar células Th de volta a uma outra situação com implicações importantes de tratamento.

Tao et al. (2010) analisaram a correlação entre o número de células Foxp3⁺ e a atividade das lesões de LPB. Observaram que o Foxp3⁺ está presente nas células CD4⁺CD25⁺. Constataram um aumento no número de células Tregs Foxp3⁺ nas lesões de LPB principalmente dispersas na lâmina própria das lesões, e baixa quantidade do número dessas células nas lesões eritematosas/erosivas em

comparação com as reticulares. Esses dados indicam que as células Tregs Foxp3⁺ estão envolvidas na patogênese do LPB, relacionadas com subtipo clínico e atividade da doença.

Lei et al. (2013), investigaram a expressão do Foxp3⁺ em células T CD4⁺CD25⁺ de células mononucleares do sangue periférico em lesões bucais de pacientes com diagnóstico de LPB, agrupados em tipos, duração e recaída. As células T de 32 pacientes com LPB foram medidas e comparadas com o grupo controle de 10 indivíduos saudáveis. Os níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de Foxp3⁺ nas lesões bucais e CD4⁺CD25⁺ das células T em pacientes com LPB foram significativamente mais elevadas que o grupo controle. Em pacientes com lesões clínicas erosivas, a expressão de mRNA de Foxp3⁺ foi significativamente menor na circulação de CD4⁺CD25⁺ das células T em comparação com pacientes com lesões reticulares e menor em pacientes com história de LPB > 1 ano ou com uma história de recaída. Os níveis de Foxp3⁺ em LPB reticular foram significativamente maiores que aqueles em LPB erosivo e no grupo controle. As lesões de LPB erosivo/atróficas mostraram maior proporção de células que expressam Foxp3⁺, diferente das lesões reticulares. A expressão de Foxp3⁺ em pacientes com LPB está associada à gravidade e duração da doença, sugerindo alterada supressão no desenvolvimento, evolução clínica e na capacidade de resposta ao tratamento.

Pereira et al. (2012), com o objetivo de avaliar a presença de FoxP3⁺ em células de LPB e correlacionar os achados com as características clínicas e histopatológicas destas lesões, compararam 32 casos de LPB (17 reticulares e 15 erosivos) com 10 casos de HFI. Exame clínico, análise histopatológica, histomorfométrica e imunohistoquímica foram realizados com o anticorpo Foxp3⁺ (anti-FoxP3). As células foram contadas nas regiões justaepitelial e intraepitelial das lesões. O número de células de FoxP3⁺ intraepitelial foi maior em LPB reticular e HFI quando comparados com as lesões erosivas. O maior número de células de FoxP3⁺ na região justaepitelial de LPB em relação à HFI também foram encontrados. De acordo com os autores, este resultado pode estar relacionado com a etiopatogenia dessas lesões.

Shen et al. em 2014, realizaram seus estudos sobre o LPB e LPC examinando a imunexpressão do marcador bioquímico Foxp3⁺ e interleucina-17. Estudaram 80 casos de biópsias de líquen plano, sendo 42 LPB e 38 LPC. Compararam as amostras com o grupo controle normal de 10 casos para mucosa bucal e 10 casos para mucosa cutânea. As expressões de Foxp3⁺ e IL-17 foram avaliadas separadamente dentro do

epitélio/epiderme e subepitélio/derme. Os resultados demonstraram um aumento da expressão de Foxp3⁺ e IL-17 em lesões LPB e LPC, e seus padrões de expressão positivamente correlacionados uns com os outros, sendo o Foxp3⁺ em LPB de maior expressão que o LPC. Os autores sugerem que essa diferença pode estar associada à diferença clínica das duas doenças.

2.2 Líquen plano

O líquen plano é uma doença dermatológica com manifestações em mucosas, principalmente bucais e cutâneas, de evolução crônica e inflamatória, cuja base imunológica e etiologia ainda são desconhecidas. Em 1869, Erasmus Wilson foi o primeiro a delinear e nomear a condição do líquen plano. Wickham, em 1895, descreveu as características do aparecimento das estrias esbranquiçadas e das pontuações que se desenvolvem no topo das pápulas da superfície plana (ANURADHA, 2008).

Na maioria dos casos as lesões cutâneas de líquen plano são autolimitadas e causam prurido, lesões em líquen plano bucal são crônicas, e raramente sofrem remissão espontânea, são potencialmente pré-malignizantes e frequente fonte de morbidade (CARROZZO; THORPE, 2009).

As lesões extrabucais associadas ao LPC afetam além da pele, a mucosa genital, couro cabeludo e unhas. Quando limitadas à mucosa bucal, com o mínimo de envolvimento da pele, são responsáveis por 15% de todos os casos relatados, enquanto que estudos de associação do LPB e LPC acometem 40% dos pacientes com lesões cutâneas. O envolvimento do esôfago, mucosa gástrica, conjuntiva e bexiga também foram raramente descritos (BIDARRA et al., 2008).

No entanto, o LPB em geral afeta de 1-2% da população adulta, e predominantemente mulheres de meia-idade (AXÉLL; RUNDQUIST, 1987).

As lesões bucais do LP aparecem na mucosa jugal, o dorso da língua, palato, assoalho da língua, lábio inferior e mucosa gengival, podendo ser simétricas, bilaterais ou múltiplas, e de remissão raramente espontânea. As diferenças clínicas são descritas em reticular (papular, em placa), erosiva (bolhosa, ulcerada) e eritematosa (atrófica), sendo que as múltiplas morfologias podem ser simultâneas. As lesões bucais reticulares consistem em pápulas esbranquiçadas com estrias que formam uma rede laçada (chamadas de estrias de Wickham) na mucosa bucal, gengival,

alveolar, em sulco, e vermelhidão no lábio inferior. Pode ser encontrado isoladamente, sem eritema concomitante ou erosões. É assintomático, sendo descoberto durante exame bucal. Se houver o envolvimento do dorso da língua com grandes placas hiperqueratóticas, podem causar alteração no paladar. O LPB eritematoso é quase sempre acompanhado por pápulas reticulares brancas e estriadas, tornando-se uma pista clínica que facilita o diagnóstico. Os achados bolhosos são raramente observados com vesículas intactas. O LPB erosivo apresenta-se muitas vezes como gengivite descamativa, assim o epitélio gengival é facilmente retirado da submucosa subjacente. Eritemas e erosões podem causar dor significativa (ardor e irritação), inchaço e hemorragia (SCHLOSSER, 2010).

Após analisar a evolução clínica de 115 casos de líquen plano, Andreasen, em 1968, constatou que pacientes reexaminados a cada ano, apresentaram lesões reticulares mais frequente com 42% (49 pacientes) dos casos, enquanto que lesões bolhosas tiveram o menor índice 1,7% (2 pacientes). Em geral a mesma localização estava presente em todos os tipos, mucosa jugal. Lesões de pele estavam presentes em 44% dos pacientes, sendo 21% dos pacientes apresentaram lesões bucais e de pele ao mesmo tempo, 65% dos pacientes eram mulheres com idades de 50 a 59 anos, e 23% dos casos apresentaram remissão espontânea dos sintomas.

Eisen, em 2002, avaliou por meio de um estudo retrospectivo 723 prontuários em um ambulatório de dermatologia com diagnóstico histológico confirmado por patologistas orais e dermatologistas. O estudo evidenciou que 23% das lesões eram reticulares (brancas), 40% eram eritematosas (atrófica) e 37% eram erosivas (bolhosas e ulceradas).

A histologia foi descrita pela primeira vez por Dubreuil, em 1906, e mais tarde por Shklar. As características são semelhantes às do líquen plano cutâneas, sendo acantose irregular em dentes de serra, espessamento da camada de células granulares, liquefação de células basais, degeneração e cristas epiteliais embotadas, e corpos colóides (Civatte). Descreveu as três características microscópicas clássicas de líquen plano bucal, queratinização sobreposta, camada de células inflamatórias crônicas dispostas em banda dentro do tecido conjuntivo subjacente, e liquefação degenerativa da zona de células basais (SHKLAR, 1972).

Os achados histológicos de diagnóstico para LP não sofreram mudanças, incluem a degeneração liquefativa dos queratinócitos da camada basal, formando corpos de Civatte que aparecem como glóbulos homogêneos eosinofílicos, ou seja,

apoptose dos queratinócitos; assim ocorre o rompimento de ancoragem dos queratinócitos basais, infiltrado denso subepitelial de linfócitos e aumento do número de linfócitos intraepiteliais ao longo da interface do tecido epitelial com o conjuntivo superficial, epitélio com citologia de maturação normal, acantose, e composição celular semelhante a dentes de serra com cumes e hiperqueratose (ortoqueratose ou paraqueratose). Além disso, o epitélio superficial pode mostrar sinais de ulceração, tipicamente observado no LP erosivo. Lesão com erosão severa pode exibir a formação de bolhas na área da separação epitelial caracterizando ulceração (SUGERMAN; SAVAGE, 2002).

No passado, as especulações sobre a etiologia da LPB abrangeram uma vasta gama de possibilidades, incluindo trauma, bactérias específicas, sífilis, parasitas, vírus (hepatite C), micoses, alergias, toxicidade, desordens neurogênicas, hereditárias e psicossomáticas, além de drogas. Devido as células basais serem o principal alvo de destruição no LPB, o mecanismo de dano das células basais está relacionado a um processo imunomediado por células como células de Langerhans, linfócitos T e macrófagos. As células de Langerhans e os macrófagos no epitélio são os produtores antigênicos que fornecem a informação antigênica para os linfócitos T (MOLLAOGLU, 2000).

Segundo Farhi e Dupin (2010), o antígeno que desencadeia a resposta inflamatória imunitária em lesões de LPB ainda não foi identificado. Esse gatilho pode ser um autoantígeno ou um antígeno exógeno. Várias descobertas apoiam a intervenção de lesões em LPB como uma resposta autoimune, por exemplo, a cronicidade da doença, início em adultos, prevalência no gênero feminino, associação com outras doenças autoimunes, demonstração de autocitotoxicidade das células T (linfócitos T) em lesões de LPB, desenvolvimento de LPB com lesões em pacientes com doença do enxerto versus hospedeiro, e a eficácia da terapia imunossupressora. Quando as drogas ou materiais dentários induzem lesões semelhantes ao LPB, o termo reações liquenóides bucais é geralmente usado. Muitas outras drogas, como inibidores de ECA, β -bloqueadores, hipolipemiantes, fenolftaleína, têm sido associadas ao LPB, embora com baixo nível de evidência. Os autores demonstraram também que reações liquenóides bucais podem resultar da hipersensibilidade de contato para materiais dentários, tais como amálgama, compósitos e acrílicos dentais. Além disso, a resolução dessas lesões pode ocorrer após a substituição do material dental causal. Dentro deste contexto, os autores analisaram que a característica típica

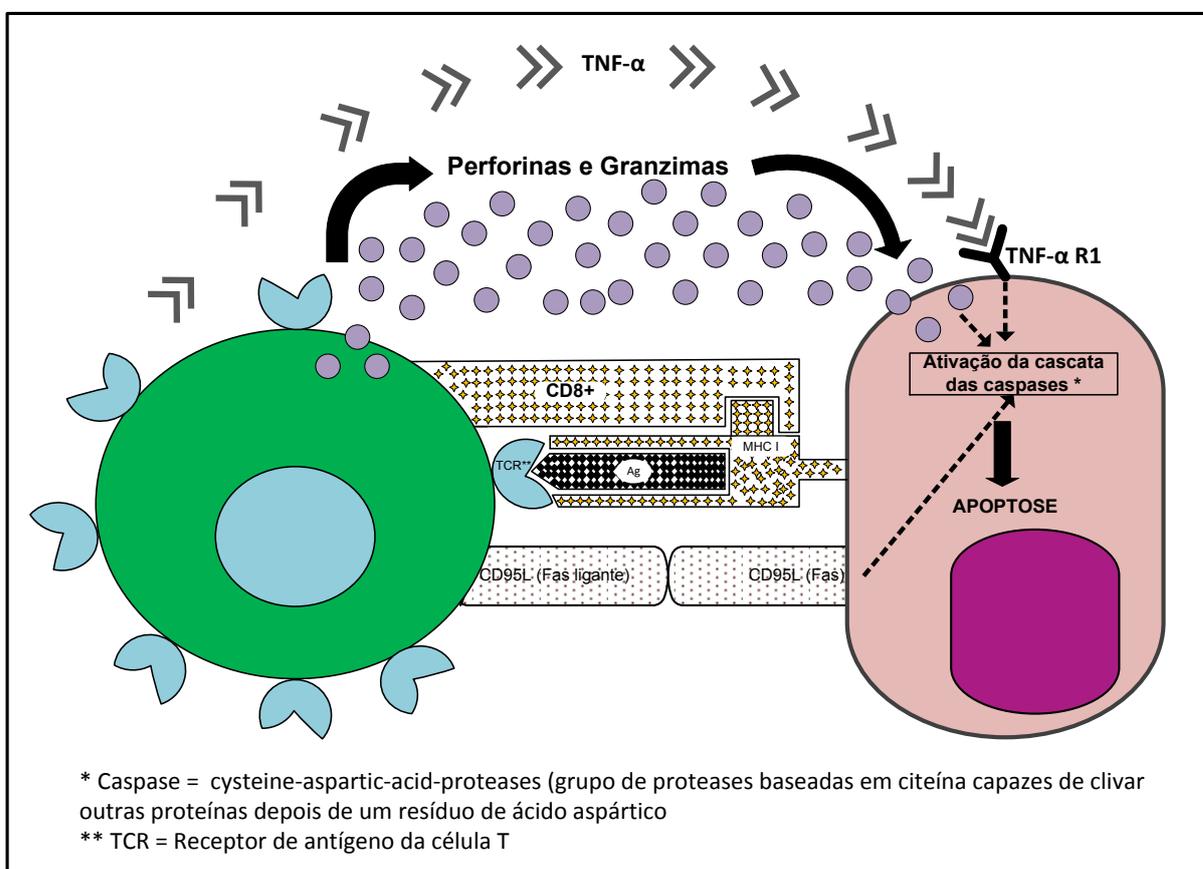
do LPB é um bordo de células epiteliais infiltrados por T CD8⁺ citotóxicas, com queratinócitos basais apoptóticos, que recobrem o infiltrado de células T CD4⁺ da lâmina própria; contudo, o fator (s) desencadeante (s) e o mecanismo patogênico destas respostas imunes ainda são desconhecidos.

O líquen plano possui resposta imunemediada por linfócitos T, em particular as células T CD8⁺ que são citotóxicas para os queratinócitos da camada basal do epitélio. De acordo com os autores, a evidência atual sugere que o LP apresenta uma perturbação da imunidade mediada por células que são precipitadas por fatores endógenos, ou exógenos resultando em resposta alterada ao autoantígeno. Os fatores que podem antecipar o aparecimento do LP, são trauma, estresse, e agentes infecciosos - isto é, o vírus da hepatite C (HCV). O maior número das células T no infiltrado inflamatório do LP são ativadas pelos linfócitos T CD8⁺. Essas células em combinação com o aumento das células Th 1 aumentam a produção de citocinas (IL-1, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α) por sua vez exacerbando a expressão intercelular da molécula-1 de adesão em células de Langerhans, macrófagos, e de antígenos do complexo de histocompatibilidade por queratinócitos. O polimorfismo genético do promotor interferon-gama (IFN- γ) é um importante fator de risco para o desenvolvimento da LPB, e reforça ainda mais o papel das citocinas. Além disso, a função supressora imune periférica é alterada no LP, e o equilíbrio entre a ajuda e supressão por células T pode determinar a atividade da doença. Esta alteração da resposta imune resulta na apoptose de queratinócitos (BARBOSA et al., 2015).

Em um estudo da reatividade lesional e não lesional por células T clonais de pacientes com LP, contra queratinócitos autólogos, as linhas de células T em pacientes lesionados com LP foram significativamente mais citotóxicas para queratinócitos autólogos lesionados que a linha de células T da pele. Clinicamente normais, os clones mais citotóxicos de lesões LP eram T CD8⁺ e a maioria dos clones não citotóxicos de lesões LP foram T CD4⁺. Finalmente, a citotoxicidade lesional das células T CD8⁺ podem ser inibidas pelo anticorpo monoclonal do complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC I). Estas descobertas sugeriram que as células lesionadas T CD8⁺ citotóxicas podem ser ativadas por antígeno de queratinócitos basais associados com MHC I, promovendo a apoptose dos queratinócitos. Antígeno ainda não identificado em lesões de LPB. Lesões de LPB mostram um aumento do número de células T CD4⁺ e células de Langerhans. Células de Langerhans e queratinócitos, expressam MHC II em lesões de LPB. As células T CD4⁺ podem ser

ativadas por antígeno associado com MHC II apresentado por células de Langerhans ou queratinócitos. A IL-12 secretada por células que expressam MHC II, células de Langerhans e queratinócitos lesionais auxiliam no recrutamento de células Th CD4⁺ interferindo na secreção de IL-2. Estas citocinas auxiliares Th1, em conjunto com a apresentação de um antígeno associado ao MHC I sobre os queratinócitos basais, promovem apoptose pela indução citotóxica das células T CD8⁺. A indução da apoptose dos queratinócitos por células T CD8⁺, conforme ilustrada na Figura 3, podem levar a vários caminhos: 1) secreção por células T do TNF- α , que se liga ao receptor de TNF- α 1 na superfície dos queratinócitos; 2) expressão na superfície da célula-T de CD95 (Fas ligante - receptor de apoptose), que se liga à CD95 (Fas) na superfície dos queratinócitos; e 3) infusão de granzima B por células T no queratinócitos pelos poros da membrana induzida por perforina (SUGERMAN et al., 2000a).

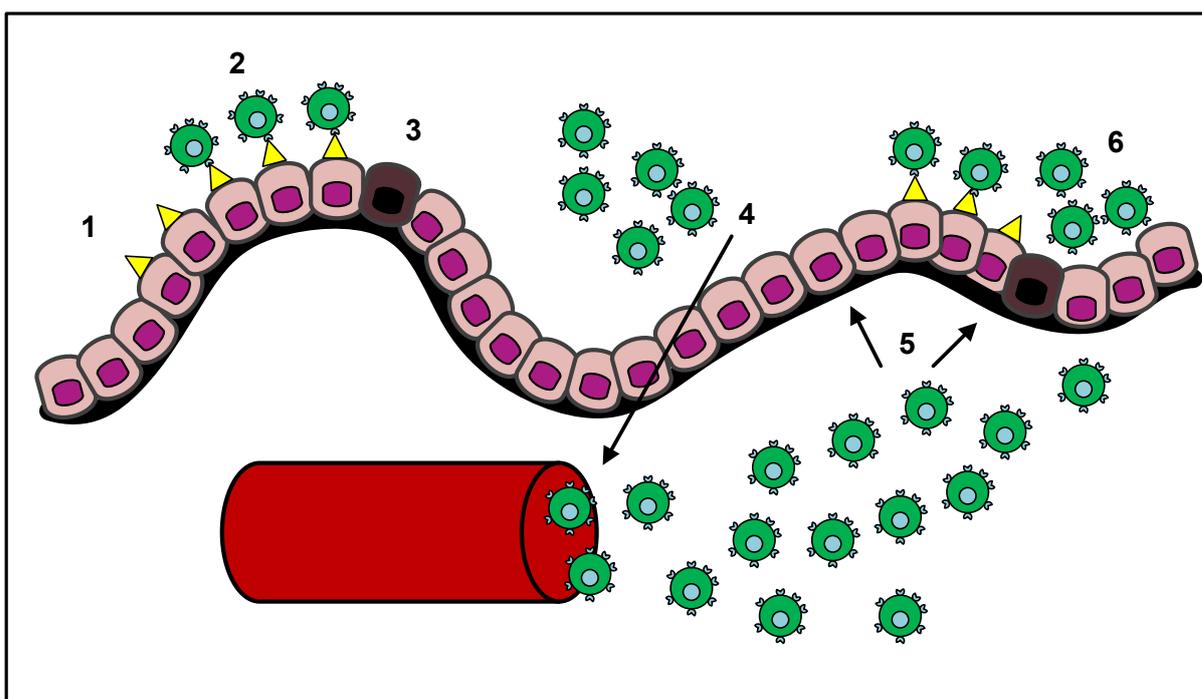
Figura 3 - Gatilho das células T CD8⁺ na apoptose dos queratinócitos.



*Fonte: Adaptada de Sugerman et al., 2000a.

Sugerman et al. (2000b) observaram que um possível mecanismo usado por linfócitos T citotóxicos na patogênese do LPB seria através de um gatilho pelo TNF- α e a matriz de metaloproteinase 9 (MMP-9) rompendo a membrana basal do epitélio. Ainda que o mecanismo usado pelas células T citotóxicas para proporcionar apoptose dos queratinócitos seja desconhecido, os autores sugeriram que um possível mecanismo inclui a hipótese de que a imunopatogênese do LPB seguiria a seguinte sequência ilustrada na Figura 4: 1) expressão do antígeno específico para LP em associação com o MHC I nos queratinócitos; 2) antígenos específicos do linfócito T CD8⁺ são ativados no epitélio do LPB; 3) células T CD8⁺ induzem apoptose de queratinócitos possibilitando a secreção de TNF- α ; 4) T CD8⁺ expande sua ação lesional através de mediadores e citocinas, estimulando o extravasamento de linfócitos nas microvascularizações migrando para o epitélio; 5) secreção de MMP-9 causando a ruptura da membrana basal epitelial; 6) ruptura da membrana epitelial facilita a passagem de linfócitos para dentro do epitélio e a rejeição aos queratinócitos resultando em apoptose. De acordo com os autores, uma terapia futura poderia incluir o bloqueio do TNF- α ou a atividade do MMP-9 nas lesões de LPB.

Figura 4 - Desenho da atividade celular da imunopatogênese do LPB.



*Fonte: Adaptada de Sugerman et al., 2000.

Lopes e Cutrim (2001a) analisaram por revisões bibliográficas que as reações imunológicas do líquen plano na cavidade bucal apresentam possíveis mecanismos imunológicos envolvidos no aparecimento e perpetuação do LP, abordando o antígeno leucocitário humano (HLA) e as células apresentadoras de antígeno (APC). Concluíram que há grande contribuição da imunidade mediada por células, na associação entre o LPB e a expressão do MHC II, além da atuação das células de Langerhans (LC) e dos queratinócitos. Devido ao aumento na expressão de antígenos de classe II pelas LC sugerem que essas células estão imunologicamente ativas, iniciando ou potencializando a reação imune local

Lopes e Cutrim (2001b) analisaram os possíveis mecanismos imunológicos envolvidos no aparecimento e perpetuação do LP, abordando moléculas de adesão, citocinas e imunidade humoral. Concluíram que a doença está mais envolvida em reações imunomediadas por células que com os aspectos de imunidade humorais, pois depende da produção de anticorpos pelas células B. Sugeriram que são mediadas por células T induzidas por antígeno não identificado. O LPB pode representar uma resposta de hipersensibilidade do tipo IV a um antígeno que poderia estar associado aos queratinócitos.

A complicação mais importante do desenvolvimento do LPB está em sua malignização para carcinoma de células escamosas (SCC). Estudos têm relatado um risco significativo de 0,4% a 3,3% para a transformação maligna do LPB para SCC em um período de 0,5 a 20 anos. Como consequência, muitas autoridades consideram LPB uma condição pré-cancerizável. O risco associado parece ser mais fortemente relacionado com os casos de LP atrófico ou erosivo. (SCULLY et al., 2000).

Holmstrup et al., em 1988, pesquisaram o desenvolvimento da malignidade em lesões de líquen plano bucal em 611 pacientes, acompanhando-os no tratamento no período de 1 a 26 anos. Durante o tratamento dos pacientes, 9 (1,5%), 8 mulheres e 1 homem desenvolveram carcinoma de células escamosas, onde o grau de diferenciação dos tumores foi de médio (em 8 casos) e alto grau (1 caso). A maioria dos carcinomas foram precedidos por uma placa e/ou lesões atróficas com ou sem características reticulares ao redor. O estudo não permitiu uma declaração definitiva sobre o mecanismo de desenvolvimento do carcinoma, mas o estudo pode concluir que o risco de malignização desenvolvido na mucosa bucal afetada pelo LP está significativamente aumentado.

Eisenberg em 2000, questionou a natureza pré-maligna do líquen plano bucal uma vez que houve relatos publicados sobre a progressão para carcinoma de células escamosas por alguns médicos e patologistas convictos de uma lesão ser inerentemente pré-cancerígena. O autor observou que em alguns casos, os estudos dos carcinomas bucais surgiram em locais anatomicamente afastados das lesões de LPB. Outros casos o diagnóstico inicial foi feito sem uma biópsia faltando confirmação microscópica do que só eram impressões clínicas de LPB. Em outros relatos, as biópsias foram realizadas, mas fotografias para apoiar os diagnósticos clínicos presuntivos não foram fornecidos. Segundo o autor, erros de diagnóstico evidenciados à questão de saber se LPB é verdadeiramente uma doença pré-maligna com evolução para carcinomas progrediram de lesões atípicas ou displásicas que foram confundidos com LPB no início. Na prática, diagnósticos LPB são prestados livremente em fundamentos empíricos e sem biópsia confirmativa. A verdadeira prevalência do LPB inequívoca não é simplesmente conhecida. Tais análises poderiam expor elementos distintivos fundamentais, que determinam apenas que as lesões liquenóides atípicas representam evolução para displasia e que são incomuns, embora reações epiteliais a diversos estímulos sejam fundamentalmente benignas.

Silverman em 2000, contrariando a análise de Eisenberg de LPB indicou um potencial definitivo para o desenvolvimento de carcinoma escamoso no local da lesão. Conforme o autor a semântica, determina o termo de designação de qualquer risco superior esperado ou pré-malignidade. O termo pré-maligno foi desencorajado apenas porque ele carrega a implicação de que todas as lesões de LPB acabarão por se tornar malignas, em vez de uma descrição mais realista: paciente propenso, de um baixo risco para a transformação maligna. De qualquer maneira um diagnóstico de LPB exige o acompanhamento periódico para monitorar a possibilidade de transformação e a necessidade da detecção precoce minimizando a morbidade e mortalidade associada ao carcinoma epidermóide de boca. A controvérsia não envolve o diagnóstico de carcinoma, mas da lesão anterior. Apesar de o LPB ter uma aparência clínica equivocada, há apresentações de lesões clássicas que não podem ser confundidas com outras doenças. Por isso, o diagnóstico de LPB é feito sobre um combinado histológico e base clínica, confirmado pela história e controle dos sinais e sintomas através da utilização de corticosteróides sistêmicos ou tópicos. No entanto, se em biópsia inicial não há evidência definitiva de displasia epitelial, é importante perceber se a lesão pode representar uma forma de leucoplasia ou eritroplasia em

vez de LPB. Em tais casos, o tratamento, bem como o prognóstico são diferentes. Outros perfis ou características lesionais dos pacientes não são aparentemente relacionados ao risco de malignidade. Estudos do LPB refletem que uma taxa realista para transformação não pode ser estimada. No entanto, a certeza é que LPB carrega um potencial maligno inequívoco e um risco indeterminado que requer um acompanhamento.

Por não ter uma etiologia conhecida, não há uma cura definida para o LPB e LPC. Os tratamentos atuais são apenas para remissão e possuem eficácia variada. Os profissionais devem discutir o curso crônico recidivante do LP, bem como a imprevisibilidade potencial de ataques agudos nos pacientes, o envolvimento clínico, predominância das lesões e a idade. O tratamento inclui em reduzir os sintomas, remissão das lesões erosivas, minimizar o impacto funcional do LP e diminuir o risco de transformação maligna. Os pacientes com LP são gerenciados com medicamentos que não foram desenvolvidos nem destinados à administração e tratamento das lesões orais, necessitando de estudos eficazes e adequados. Assim, fatores como dose, duração do tratamento, segurança e verdadeira eficácia permanecem desconhecidos (EISEN et al., 2005).

2.3 Hiperplasia fibrosa inflamatória

A hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) é uma lesão inflamatória de crescimento lento e geralmente assintomática. Melhor denominação dada as lesões proliferativas benignas que podem surgir na cavidade bucal devido a traumatismos crônicos de baixa intensidade, bem como fatores etiológicos próteses mal adaptadas, diastemas, arestas de dentes cortantes, má higienização, manobras iatrogênicas profissionais, dentre outras formas. Sua frequência está mais relacionada a próteses removíveis mal adaptadas e/ou antigas, por serem causa de traumas constante e inflamação dos tecidos bucais (SANTOS et al., 2004).

Estudos clínicos concordam que a região anterior de ambos os maxilares são as mais afetadas que as regiões posteriores. Possui alta frequência e constitui a lesão mais prevalente. As mulheres são mais afetadas que os homens em uma proporção de 5:1, e especificamente na quarta ou quinta década de vida. O fato de serem maior em mulheres podem estar associados aos aspectos estéticos com o uso das próteses e de mecanismos de alteração hormonal associados. Possui características clínicas

de uma lesão exofítica ou elevada bem definida, com consistência variada entre firme à flácida a palpação, sendo que seu tamanho pode variar de menos 1 cm à grandes lesões que podem afetar a totalidade do vestíbulo. Podem se apresentar séssil ou pediculada, e lisa. Podem ser eritematosas e ulceradas semelhantes ao granuloma piogênico, podendo ser únicas ou múltiplas. Sua coloração pode variar de acordo com a cor da mucosa adjacente, de crescimento lento e assintomático, a não ser que apresente ulceração (MUÑANTE-CÁRDENAS et al., 2009).

Rodríguez e Sacsquispe em 2005, determinaram a prevalência da HFI associada ao uso de prótese dental removível e a fatores como: sexo, grau de instrução, idade, comprometimento sistêmico, estado nutricional e higiene oral, tempo de uso da prótese, tamanho e aspecto da lesão em adultos maiores residentes em um alberque. Avaliaram 91 pacientes e concluíram que a HFI se desenvolveu em menores de idade, com má higiene bucal, portadores de comprometimento sistêmico que não tinham relação com o tipo de prótese e seu tempo de uso.

Gordón-Núñez et al., (2008) analisaram morfológicamente através da técnica de hematoxilina/eosina, a mucosa da hiperplasia fibrosa inflamatória conjuntamente com a displasia epitelial e o tecido normal, para obter maiores informações sobre as alterações epiteliais que poderiam estabelecer em uma possível evolução. Dentro do contexto da HFI, observaram que o aumento do tecido era devido à uma elevação no número de células. Um processo que ocorre de forma exclusiva com tecidos com capacidade mitótica comprometendo as células biologicamente normais capazes de responder aos estímulos sem perder seu padrão morfológico, e com a preservação da membrana basal. São acompanhadas de mudanças em nível subepitelial, tais como hipervascularização, fibrose e infiltrado inflamatório predominantemente crônico. Suas características histológicas são epitélio estratificado escamoso paraqueratinizado/ hiperparaqueratinizado/ ortoqueratinizado, hiperplasia, degeneração hidrópica, espongirose, discreta exocitose, processo discreto à moderado de infiltrado inflamatório mononuclear e tecido conjuntivo denso.

Enfatizando a importância das características histopatológicas, Casian et al., em 2011, apresentaram um relato de caso em um paciente de 8 anos, em que o histopatológico apresentou, sobreposição de tecido conjuntivo fibroso, rico em fibras de colágeno e fibroblastos, delimitado por um epitélio escamoso superficial, e presença de infiltrado inflamatório crônico com linfócitos, células plasmáticas,

leucócitos polimorfonucleares e poucos vasos sanguíneos. O tecido conjuntivo variou conforme a lesão com a presença de tecido de granulação imaturo.

2.4 Imunoistoquímica

É possível localizar antígenos nos componentes histológicos e celulares, mantendo a arquitetura original do tecido circundante através da imunoistoquímica. Os ensaios de imunoistoquímica são análises de diagnóstico altamente utilizados para auxiliar na identificação e na caracterização biológica de tecidos, tipos de doenças neoplásicas e não neoplásicas. Apesar de serem métodos aplicados principalmente para o diagnóstico de neoplasias, alguns desses testes fornecem informações de prognóstico e valor preditivo em neoplasias humanas e são frequentemente críticos para o tratamento adequado e eficaz dos pacientes. Estes ensaios requerem formação especializada na seleção do tecido de fixação apropriado e de processamento, preparação dos artefatos de imunoistoquímica / imunocitoquímico, seleção de controles, pré-tratamento, sistemas de detecção e reagentes, e extensa formação na seleção de teste e interpretação dos resultados (TORLAKOVIC et al., 2010).

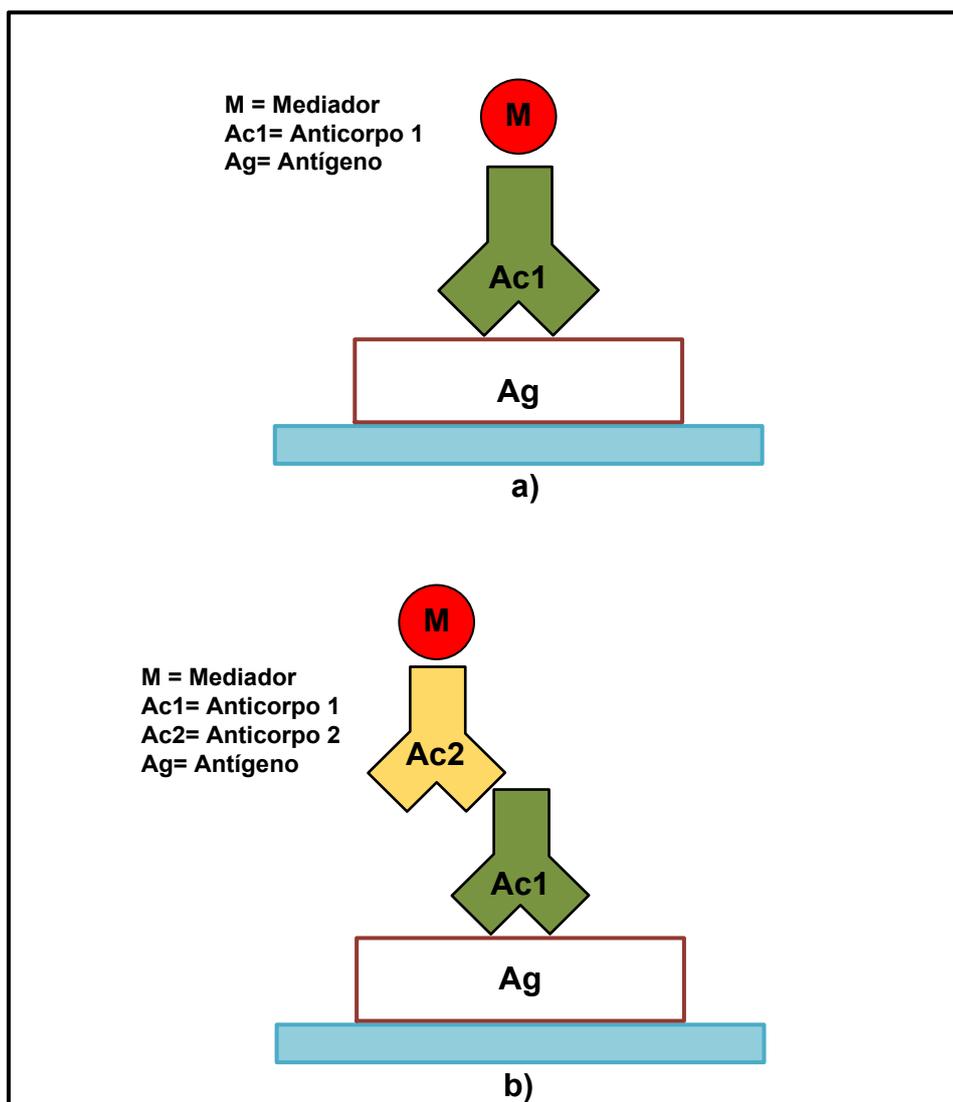
Dako em 2009, salientou que a imunoistoquímica se apresenta como um poderoso meio de identificação de várias estruturas celulares e tecidulares que podem estar diretamente associadas a doenças, e as consequências, funcionais e morfológicas da ação desses mesmos elementos. É uma área em permanente evolução, devendo todos os investigadores que se dedicam a esta atividade permanecer em constante procura. Tal como qualquer outro tipo de tecnologia, a imunoistoquímica, necessita respeitar determinados requisitos de modo que possa ser realizada de uma forma válida, correta e eficaz. A primeira condição é que o antígeno deve permanecer insolúvel, mas disponível no tecido, no decorrer da técnica. Essa insolubilidade implica a sua permanência no local original. Assim, deve também apresentar as características que vão ser reconhecidas pelo anticorpo, em alguns casos, pode ser necessário aplicar métodos de recuperação antigênica. A segunda condição é a marcação específica pelo anticorpo primário, isto é, o anticorpo deverá apenas ligar-se ao antígeno pretendido (marcação específica) e não a outros elementos estranhos (marcação inespecífica). O que se pretende obter é uma marcação específica do antígeno com ausência de marcação inespecífica de fundo.

Depois temos a terceira condição, ou seja, é fundamental conhecer os atributos dos tipos de soros a aplicar clonalidade, classe/subclasse da imunoglobulina, especificidade, reatividade e condições de manuseamento; revelam-se essenciais para a interpretação de resultados, bem como para a avaliação da qualidade da técnica. Finalmente surge a quarta e última condição, é imprescindível o uso de uma marcação estável com uma intensidade suficiente, que não suscite qualquer tipo de dúvidas relativamente à presença ou ausência do antígeno no tecido.

Uma vez que os anticorpos, como proteínas que são, não possuem cor própria nem outra forma de serem visualizados nas preparações histológicas e citológicas, é necessário encontrar forma de lhes conferir uma maneira de serem observáveis quando se encontram ligados aos antígenos que se querem detectar em anatomia patológica. Para tanto, existem duas metodologias de apresentação: o método direto e indireto. O direto é utilizado somente um anticorpo primário, que possui o marcador, conforme ilustrado na Figura 5a. Isto significa que o anticorpo que possui o marcador se liga diretamente ao antígeno. O método indireto envolve um anticorpo primário não-marcado (primeira camada) que reage com o antígeno do tecido, e um anticorpo secundário marcado (segunda camada) que reage com o anticorpo primário, conforme ilustrado na Figura 5b. O anticorpo secundário deve ser produzido contra a IgG da espécie animal em qual o anticorpo primário foi produzido. Esse método é mais sensível devido à amplificação de sinal através de diversas reações de anticorpos secundários com diferentes sítios antigênicos do anticorpo primário. A segunda camada de anticorpos pode ser marcada com corante fluorescente ou uma enzima (SHI et al., 1997).

As técnicas de imunoistoquímica são uma ferramenta poderosa ao dispor do diagnóstico anatomopatológico e da investigação. Auxilia a pensar sobre o diagnóstico e, frequentemente, serve de complemento a um raciocínio, não o substituindo. De um modo geral, são conhecidos e estudados diferentes antígenos que podem ser expressados pelos diferentes tipos de doenças, sendo necessário, muitas vezes, detectar a sua existência para confirmar a doença correspondente. Em outras situações, recorre-se a técnicas imunoistoquímicas, não para confirmar uma suspeita proveniente do aspecto morfológico da patologia, mas sim como ferramenta de primeira linha, pois o aspecto morfológico não indica caminhos definitivos. Assim, recorrem-se a diagnósticos surgindo da imunoistoquímica como a principal determinante da resposta final (FERRO, 2013).

Figura 5 - (a) Método direto imunoistoquímico; (b) Método indireto imunoistoquímico.



*Fonte: Adaptada de SHI et al., 1997.

3 OBJETIVO

Avaliar a presença do imunomarcador Foxp3⁺ das células Tregs em lesões de líquen plano bucal, cutâneo e hiperplasia fibrosa inflamatória a fim de ampliar os estudos sobre a etiopatogenia do líquen plano.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Considerações éticas

O presente estudo foi submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS, sendo aprovado com o CAAE 50810915.8.0000.0021 (Anexo A).

Solicitou-se a autorização aos responsáveis dos bancos de dados do Laboratório de Patologia Faodo/UFMS e do Laboratório de Patologia do Hospital Universitário/UFMS para a utilização dos artefatos pertencentes às suas instituições de ensino e pesquisa, sendo devolvidos após a realização do estudo (Apêndice A).

4.2 Caracterização do estudo

O presente estudo observacional avaliou, de forma sistemática, o registro da expressão imunohistoquímica do Foxp3⁺ através da análise quantitativa comparando os casos de líquen plano bucal, líquen plano cutâneo e hiperplasia fibrosa inflamatória.

4.3 Amostra

Para a realização desta pesquisa, e com prévia autorização, utilizamos os blocos de parafina com biópsia bucal/cutânea de lesões de líquen plano arquivados pelo Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia, de LP bucal e HFI, e do Laboratório de Patologia do Hospital Universitário para biópsias cutâneas de LP da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

A amostra foi intencional, foram selecionados 25 blocos com diagnóstico de líquen plano bucal e 11 blocos com diagnóstico de hiperplasia fibrosa inflamatória, triados no serviço do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia (Faodo), 14 blocos com diagnóstico de líquen plano cutâneo triados na Unidade de Dermatologia (Famed) e Laboratório de Patologia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul do período de 2007 a 2015.

4.4 Critérios de seleção da amostra e análise de critérios

A seguir são apresentados os critérios utilizados na metodologia deste estudo.

4.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos os espécimes diagnosticados histopatologicamente como líquen plano bucal e cutâneo que continham as informações clínicas disponíveis para caracterizá-los, e os espécimes de hiperplasia fibrosa inflamatória com intenso infiltrado inflamatório disposto em posição justaepitelial. Foram incluídos também os espécimes que continham material suficiente nos blocos de parafina para o desenvolvimento da pesquisa.

O quadro apresenta a numeração dos blocos utilizados no presente estudo, segundo doença e ano (Anexo B).

4.4.2 Critérios de exclusão

Material insuficiente para a realização do experimento e/ou grandes áreas de necrose; problemas de fixação e processamento dos tecidos; má conservação dos blocos; dados incompletos e falhas nos registros dos prontuários; dúvidas nos diagnósticos; e também pacientes em que continham em seu histórico clínico doenças, como artrite reumatóide, desordens alérgicas e outras doenças autoimunes.

4.5 Preparo, confecção e produção das lâminas

Os artefatos foram levados ao laboratório APC-Lab Apoio em Patologia Cirúrgica, localizado em São Paulo. Realizou-se os exames de imunoistoquímica com a devida padronização do fabricante.

4.6 Estudo morfológico

Dos espécimes de líquen plano bucal, cutâneo e hiperplasia fibrosa inflamatória selecionados para este estudo, foram realizadas uma análise histomorfológica em microscopia de luz, nos aumentos de 40x, 100x e 400x em cortes de 5 micrômetros (µm) de espessura, dispostos em lâminas de vidro e corados pela técnica da

hematoxilina e eosina (HE), a fim de definir as características histopatológicas, incluindo algumas características epiteliais/epidérmicas, tais como queratinização, atrofia, apoptose (com corpos de Civatte), além da intensidade e localização do infiltrado inflamatório.

A avaliação histopatológica foi realizada por dois observadores patologistas em momentos diferentes após a realização da calibração intra e entre-observadores, com o índice kappa > 0,80.

Para as lesões bucais foi adotado o critério de diagnóstico proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (1978) e modificado por Van der Meij e Van der Waal (2003) associado aos dados clínicos presentes nos prontuários dos pacientes descrito no Quadro 1.

Quadro 1 - Critérios de diagnóstico histopatológico proposto pela OMS para LPB, modificados por Van der Meij e Van der Waal, 2003.

- Presença de uma zona em faixa, bem definida, de infiltração celular, confinada à porção superficial do tecido conjuntivo, consistindo principalmente de linfócitos
- Sinais de liquefação degenerativa na camada basal do epitélio
- Ausência de displasia epitelial

4.7 Estudo imunoistoquímico

Do estudo imunoistoquímico realizado do material emblocado em parafina, foram obtidos através de cortes de 3 µm de espessura e estendidos em lâminas de vidro previamente limpas e preparadas com adesivo, de acordo com a marca solicitada pelo fabricante do marcador bioquímico (Quadro 2).

As sequências seguidas para cada marcador estão descritas separadamente de acordo com suas especificações do produto e do fabricante.

Quadro 2 - Característica do anticorpo utilizado para imunomarcção Foxp3⁺.

| Anticorpo Clone | Especificidade | Diluição | Fonte | Recuperação Antigênica | Tempo de Incubação |
|--------------------|--|----------|----------------|---------------------------|-----------------------|
| EP340 | Antic. Monoclonal de Coelho anti Foxp3 ⁺ | 1:150 | Cell Marque | Tris-EDTA pH 9,0 | <i>Overnight</i> |

4.7.1 Método imunoistoquímico do Foxp3⁺

A técnica utilizada seguiu o protocolo a seguir, de acordo com o fabricante:

- Desparafinização: dois banhos em xilol, ambos por 10 minutos à temperatura ambiente (TA);
- Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:
- Álcool etílico absoluto I (5 minutos) TA;
- Álcool etílico absoluto II (5 minutos) TA;
- Álcool etílico absoluto III (5 minutos) TA;
- Álcool etílico absoluto IV (5 minutos) TA;
- Álcool etílico 95°GL (5 minutos) TA;
- Álcool etílico 80°GL (5 minutos) TA;
- Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95° por 10 minutos, à temperatura ambiente;
- Lavagem em água corrente por 10 minutos;
- Duas passagens em água destilada por 5 minutos cada;
- Recuperação dos sítios antigênicos
- Lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 passagens em água destilada por 5 minutos cada;
- Duas incubações dos cortes, pelo período de 10 minutos cada, em solução de 0,3% de peróxido de hidrogênio em metanol para bloqueio da peroxidase endógena tecidual;
- Lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 passagens em água destilada por 5 minutos cada;

- Duas passagens em solução tampão TRIS-HCl (trisdrocimetilaminometano, Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) pH 7,4 por 5 minutos;
- Incubação com os anticorpos primário (Quadro 1) diluído em solução BSA (albumina sérica bovina, BIOTEST S/A, São Paulo, Brasil) a 1% conservada em azida sódica a 0,1% em TRIS-HCl pH 7,4;
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 por 5 minutos cada;
- Incubação tampão TRIS-HCl, pH 7,4 (2 passagens – 5 minutos cada);
- Incubação de um anticorpo secundário + Envision (Dako Co., Carpinteria, CA, USA)
- Incubação do complexo avidina/biotina, diluído em TRIS gelado (A+B);
- Lavagem em solução tampão TRIS-HCl, pH 7,4;
- Imersão em solução tampão, duas trocas de 5 minutos;
- Aplicação de um agente cromógeno diaminobensidina 25 a 30 mg (3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) diluída em 100ml TRIS-HCl pH 7,4, acrescida de 1,2 ml de peróxido de hidrogênio 10 volumes durante 3 minutos na câmara escura;
- Lavagem em água corrente por 10 minutos;
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Contracoloração com hematoxilina de Mayer por 10 minutos à temperatura ambiente;
- Lavagem em água corrente, 10 minutos;
- Duas passagens em água destilada por 5 minutos cada;
- Desidratação em cadeia ascendente de etanóis;
- Álcool etílico 80°GL (2 minutos) TA;
- Álcool etílico 95°GL (2 minutos) TA;
- Álcool etílico absoluto I (5 minutos) TA;
- Álcool etílico absoluto II (5 minutos) TA;
- Álcool etílico absoluto III (5 minutos) TA;
- Diafanização em dois banhos de xilol: xilol 1 (2 minutos) e xilol 2 (2 minutos);

- Montagem da lamínula em resina Permout (Ficher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Para a imunoistoquímica, utilizamos o controle positivo para Foxp3⁺, previamente com tecido do linfonodo para o anticorpo pesquisado, seguindo as orientações do fabricante. Como controle negativo, substitui-se o anticorpo primário por solução de albumina de soro positivo (BSA – *Bovine Serum Albumin*) a 1% diluída em solução tampão.

As amostras foram avaliadas em microscópio Zeiss Plan-acharomat (415500.1800, Frankfurt, Alemanha), verificados campos histológicos de linfócitos em aumentos de 40X, 100X e 400X. Após a avaliação foram capturadas imagens para arquivo no microscópio supracitado.

4.8 Análise do perfil imunoistoquímico

A expressão imunoistoquímica do Foxp3⁺ foi analisada considerando a localização da referida expressão em tecido justaepitelial e intraepitelial através da quantidade de células imunomarcadas, segundo critério de intensidade de marcação descrito por Santoro et al. (2004). Através de uma disposição aleatória foram feitas a leitura e análise de 10 campos consecutivos com o microscópio em aumento de 400x, por intermédio de dois observadores. Para as células justaepiteliais e intraepiteliais foi feita uma média representando a quantidade de células marcadas em cada campo, conforme Loddenkemper et al. (2009). Os dados de ambas as somas foram expressos em médias \pm erro padrão, conforme Di Stefano et al. (2009).

4.9 Análise estatística

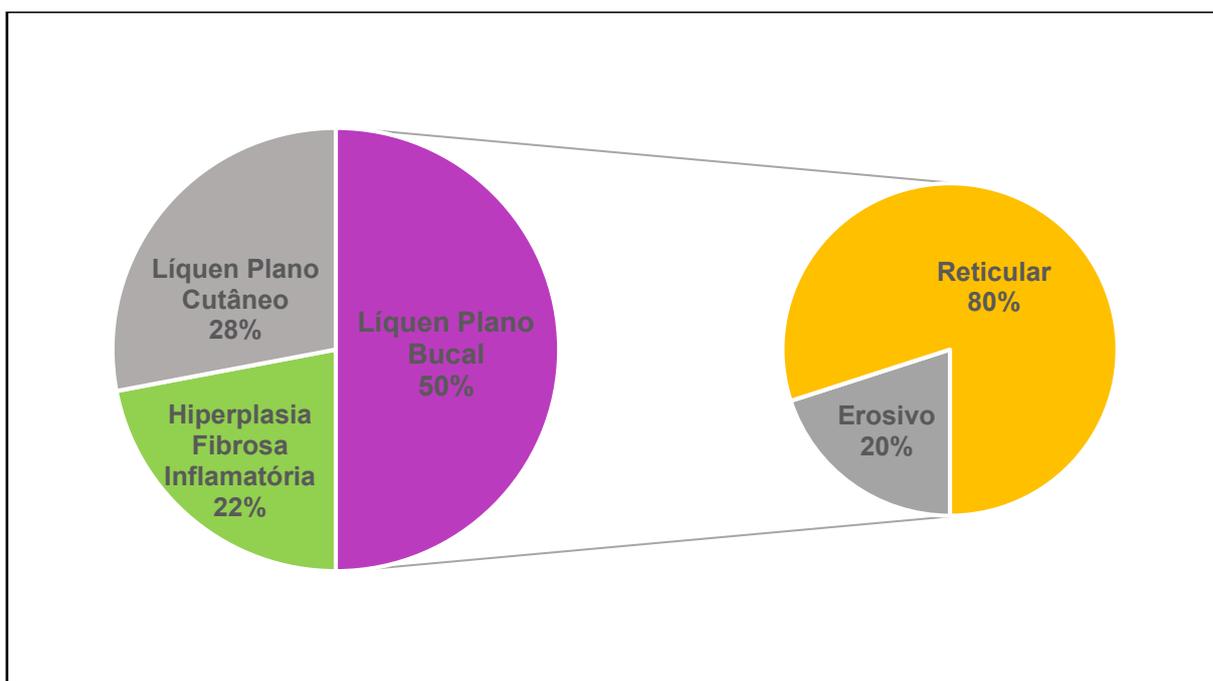
Para a análise estatística foi utilizado o *software* GNU PSPP (livre e gratuito) considerando um nível de significância de 5%, submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Kruskal-Wallis.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra

Foram avaliados espécimes de 25 lesões de líquen plano bucal, sendo divididos em formas clínicas: reticular (20 casos, 80%) e erosiva (5 casos, 20%); 14 casos de líquen plano cutâneo (28%) e 11 casos de hiperplasia fibrosa inflamatória (22%). Todos os espécimes foram retirados do Laboratório de Patologia Bucal da Faodo – UFMS e do Laboratório de Patologia da Famed-UFMS.

Gráfico 1 - Caracterização relativa (em %) dos casos diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da Faodo (UFMS) e Laboratório da Famed (UFMS), no período de 2007 a 2015. Campo Grande(MS). (n=50)



Dentre as amostras coletadas para o líquen plano bucal, afetaram mais o gênero feminino, com predomínio na quinta década de vida. Quanto a localização, prevalência na mucosa jugal e língua conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição e caracterização relativa (em %) dos casos de líquen plano bucal diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da Faodo (UFMS), no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (n=25).

| Variáveis | Frequências (%) |
|------------------------|-----------------|
| Gênero | |
| Masculino | 40 (n=10) |
| Feminino | 60 (n=15) |
| Idade | |
| < 40 anos | 28 (n=7) |
| 40 a 50 anos | 36 (n=9) |
| > 50 anos | 28 (n=7) |
| Localização* | |
| Língua | 32 (n=8) |
| Mucosa gengival | 24 (n=6) |
| Mucosa jugal | 64 (n=16) |
| Região retromolar | 8 (n=2) |
| Papilas interdentárias | 4 (n=1) |

* Os dados de localização apresentam concomitâncias.

5.2 Estudo morfológico

Das características histopatológicas analisadas das lesões de LPB coradas com hematoxilina-eosina (HE), verificou-se a presença do epitélio pavimentoso estratificado, lâmina própria frouxa e densa composta de tecido conjuntivo fibroso de densidade variada.

Em relação as características de queratinização do epitélio do LPB foi dividido em hiperparaqueratinizada (n=11; 44%), ortoqueratinizada (n= 8; 32%) e paraqueratinizada (n=10; 40%). Contudo, o LPC apresentou distribuição igualitária entre ortoqueratinizado (n= 7; 50%) e hiperortoqueratinizada (n=7; 50%). Das características epiteliais, verificou-se que 20 casos (80%) de LPB apresentaram predominância de acantose, enquanto apenas 5 casos (20%) mostraram atrofia. Ainda do total, 5 casos (20%), exibiram projeções epiteliais em forma de dente de serra. Esta preponderância também foi observada mesmo que em menor proporção nos casos de LPC, sendo 8 casos (57,14%) de hiperplasia e 6 casos (42,85%) de atrofia epitelial/epidérmica, de acordo com a Tabela 2 (Figuras 6, 7 e 8).

De acordo com a presença de exocitose nas lesões, a Tabela 2 demonstra que a maioria dos casos de LPB (n=19; 76%) apresentou infiltrado inflamatório intraepitelial em grande parte da extensão do epitélio. Enquanto que no LPC apenas

6 casos (42,85%) foram observados. Verificou-se também a presença de corpos de Civatte na região justaepitelial dos espécimes, destes 20 casos (80%) foram de LPB e 5 casos (35,71%) de LPC.

Tabela 2 - Distribuição e caracterização relativa (em %) dos casos de líquen plano bucal e cutâneo quanto a queratinização, epitélio e exocitose das lesões diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da Faodo (UFMS) e Laboratório da Famed (UFMS), no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (LPB, n=25 e LPC, n=14).

| Variáveis | LPB (%) | LPC (%) |
|---------------------------|-----------|-------------|
| Queratinização | | |
| Paraqueratinizado | 40 (n=10) | 0 |
| Ortoqueratinizado | 32 (n=8) | 50 (n=7) |
| Hiperparaqueratinizado | 44 (n=11) | 0 |
| Hiperortoqueratinizado | 0 | 50 (n=7) |
| Epitélio | | |
| Atrofia | 20 (n=5) | 42,85 (n=6) |
| Hiperplasia | 80 (n=20) | 57,14 (n=8) |
| Exocitose | | |
| Infiltrado Intraepitelial | 76 (n=19) | 42,85 (n=6) |
| Corpos de Civatte | 80 (n=20) | 35,71 (n=5) |

LPB – Líquen Plano Bucal. LPC – Líquen Plano Cutâneo.

Nos casos de LPB e LPC analisados, o tecido conjuntivo fibroso foi predominantemente frouxo, exibindo infiltrado inflamatório basicamente linfocítico, posicionado em faixa contínua em região justaepitelial.

A análise dos cortes histológicos de hiperplasia fibrosa inflamatória mostrou fragmentos de mucosa oral revestidos por epitélio pavimentoso estratificado com camada córnea de espessura variável, sendo ortoqueratinizada ou paraqueratinizada, com hiperplasia, acantose e exocitose variável. O tecido conjuntivo fibroso subjacente foi geralmente frouxo, exibindo infiltrado inflamatório, na sua maioria mononuclear, situado em região justaepitelial.

Figura 6 - Corte histológico do líquen plano bucal corado em HE, mostrando camada de ortoqueratina, epitélio atrófico, e infiltrado inflamatório intraepitelial (400x).

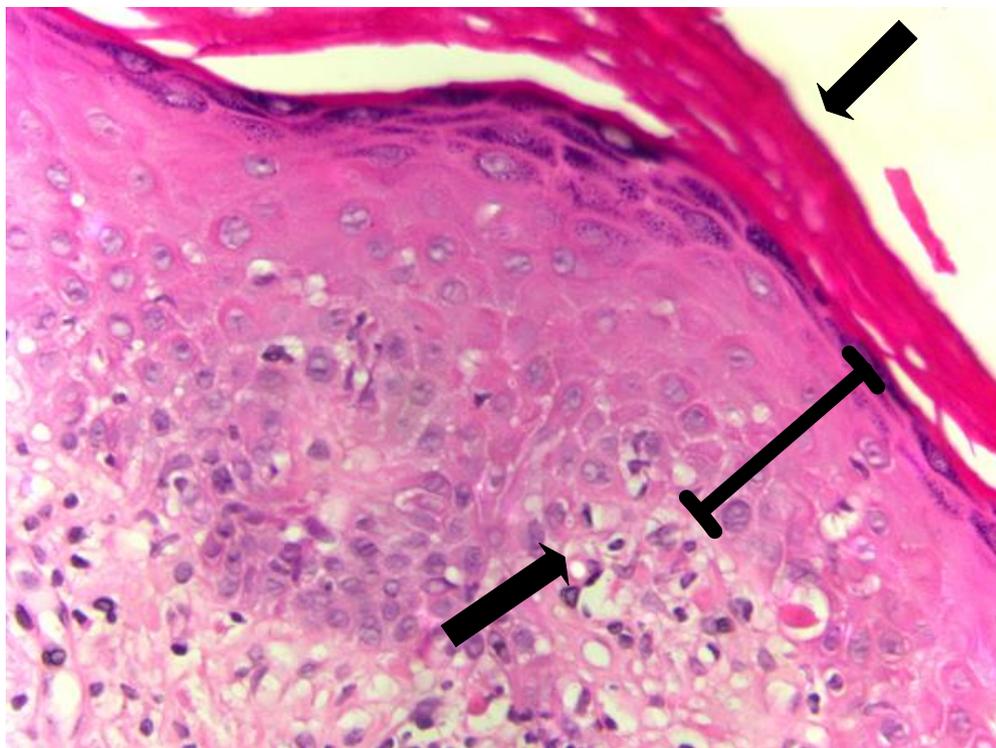
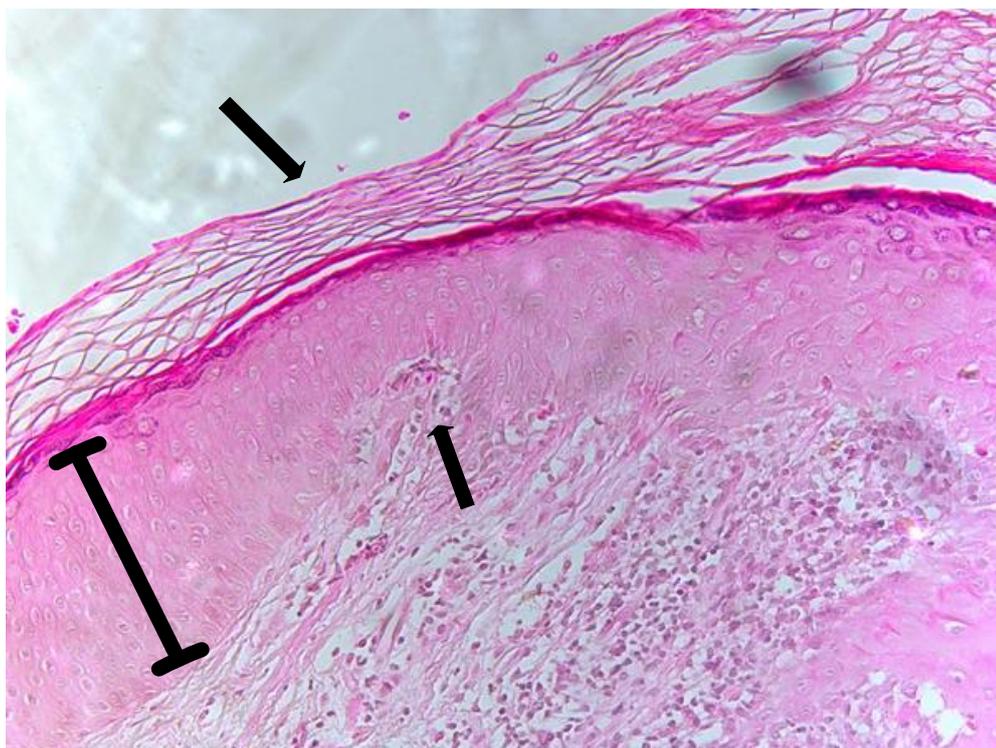


Figura 7 - Corte histológico do líquen plano cutâneo corado em HE, exibindo hiperortoqueratina, epitélio hiperplásico, e denso infiltrado inflamatório justaepitelial (200x).



*Fonte: Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Faodo).

5.3 Imunoistoquímica para o Foxp3⁺

A marcação imunoistoquímica para o Foxp3⁺, de cor marrom acastanhada em região nuclear/citoplasmática foi analisada em microscopia de luz, que se revelou difusa quanto à distribuição, localizando-se nas células do infiltrado inflamatório linfocítico situado na região justaepitelial, bem como em poucas células inflamatórias intraepiteliais.

Foram contadas as células justaepiteliais e intraepiteliais do infiltrado inflamatório imunomarcadas para o Foxp3⁺ em 10 campos consecutivos, sendo obtida uma média para cada caso. Encontrou-se uma média \pm erro padrão de todos os casos de LPB, LPC e HFI. A comparação entre os processos patológicos em relação à quantidade de células marcadas com Foxp3⁺, tanto no tecido justaepitelial quanto no intraepitelial, foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por pós-teste de Dunn, uma vez que a maior parte das amostras não passaram no teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para verificar diferenças estatisticamente significativas (nível de significância de 5%).

De acordo com a contagem na região justaepitelial, o LP bucal exibiu uma média de $5,39 \pm 1,56$ de células marcadas por campo. O LP cutâneo exibiu uma média maior que o bucal $23,10 \pm 4,80$. Os casos de hiperplasia fibrosa inflamatória, por sua vez exibiram média menor que os tipos clínicos de LP, correspondendo a $1,39 \pm 1,23$. (Tabela 3) (Gráfico 2)

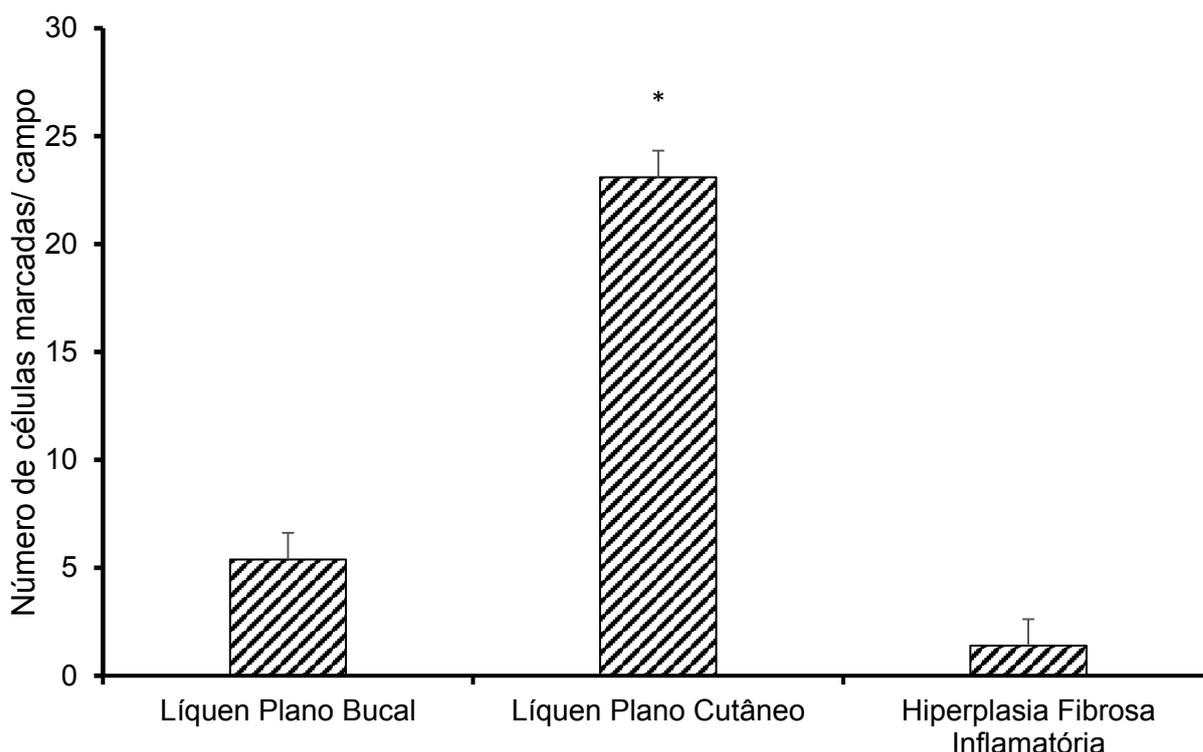
Tabela 3 - Quantidade, média \pm erro padrão e probabilidade relativo à contagem de células justaepiteliais imunomarcadas do Foxp3⁺ por campo dos casos diagnosticados no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (n=50)

| | Células | Média \pm Erro | Valor de P |
|------------|----------------|------------------------------------|-------------------|
| LP Bucal | 1348 | $5,39 \pm 1,56$ | $P < 0,0001$ |
| LP Cutâneo | 3235 | $23,10 \pm 4,80$ | $P > 0,076$ |
| HFI | 153 | $1,39 \pm 1,23$ | $P < 0,0001$ |

Como a distribuição dos dados não foi Normal em todos os casos, aplicou-se teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar a relação existente entre a imunomarcagem para o Foxp3⁺ entre a relação LPB, LPC e a HFI separadamente, onde mostrou diferença estatisticamente significativa entre a relação LPC x LPB e a

LPC x HFI ($P < 0,001$), no entanto, não foi observado diferença significativa para a relação LPB e a HFI ($P > 0,05$). Estes dados são demonstrados na Tabela 4 (Figuras 8, 10, 11 e 12).

Gráfico 2 - Frequência de células Treg imunomarcadas pelo anticorpo Foxp3⁺ em região justaeptelias por campo dos casos diagnosticados no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (n=50)



* Diferença significativa.

Tabela 4 - Diferença média e valor de P obtidos através da quantidade de células imunomarcadas justaeptelias do Foxp3⁺ por campo, dos casos diagnosticados no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (n=50)

| | Diferença de classificação média | Valor de P |
|-----------------------|-------------------------------------|-------------|
| LP Bucal X LP Cutâneo | 17,680 | $P < 0,001$ |
| LP Bucal X HFI | 5,775 | $P > 0,05$ |
| LP Cutâneo X HFI | 23,455 | $P < 0,001$ |

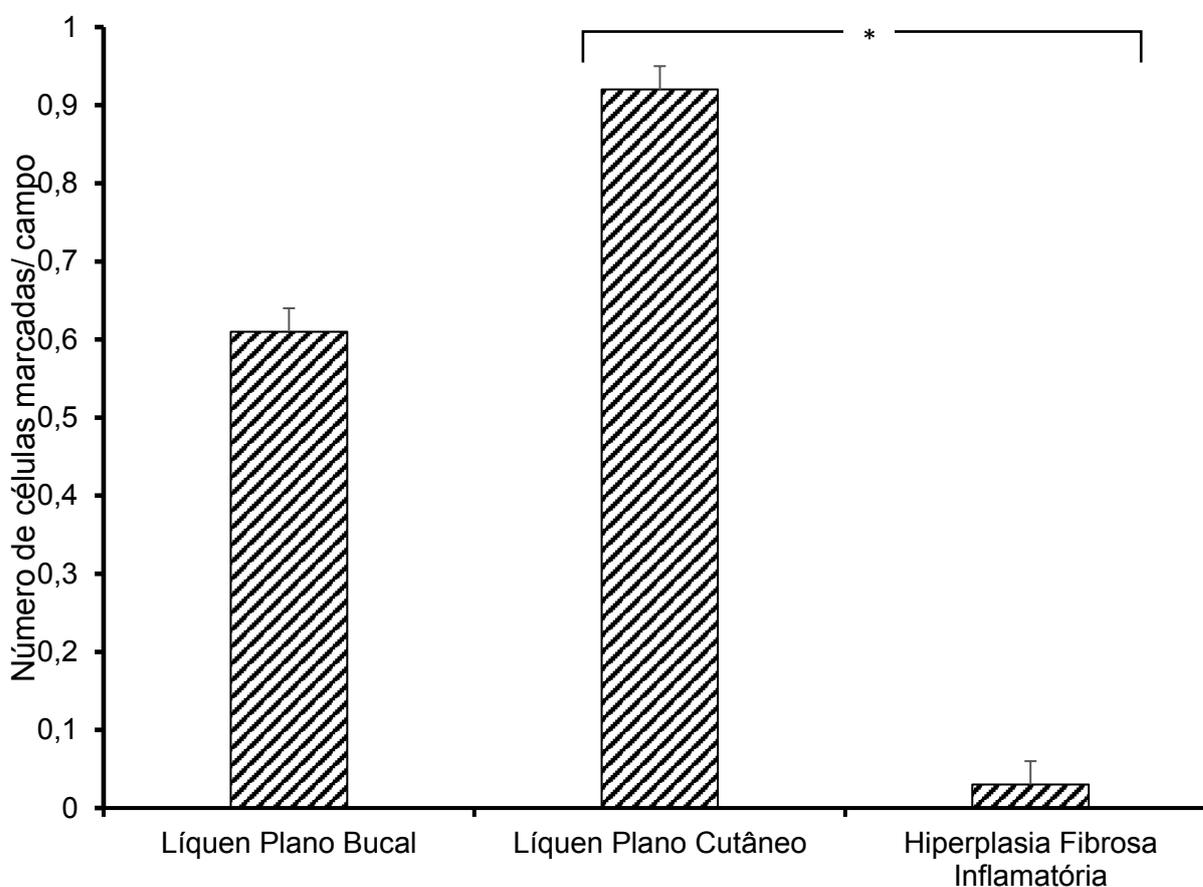
Teste Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn.

De acordo com a contagem das células imunomarcadas na região intraepitelial, o LPB exibiu uma média de $0,61 \pm 0,25$ de células marcadas. O LPC exibiu uma média maior, sendo $0,92 \pm 0,26$. Os casos de hiperplasia fibrosa inflamatória, por sua vez, exibiram uma média muito menor que os casos de LPB e LPC, correspondendo a $0,03 \pm 0,03$. (Tabela 5) (Gráfico 3).

Tabela 5 - Quantidade, média \pm erro padrão e probabilidade relativo à contagem de células intraepiteliais imunomarcadas do Foxp3⁺ por campo dos casos diagnosticados no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (n=50)

| | Células | Média \pm Erro | Valor de P |
|------------|----------------|------------------------------------|-------------------|
| LP Bucal | 84 | $0,61 \pm 0,25$ | $P < 0,0001$ |
| LP Cutâneo | 130 | $0,92 \pm 0,26$ | $P > 0,10$ |
| HFI | 4 | $0,03 \pm 0,03$ | $P < 0,0001$ |

Gráfico 3 - Frequência de células Treg imunomarcadas pelo anticorpo Foxp3⁺ em região intraepitelial por campo dos casos diagnosticados no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (n=50)



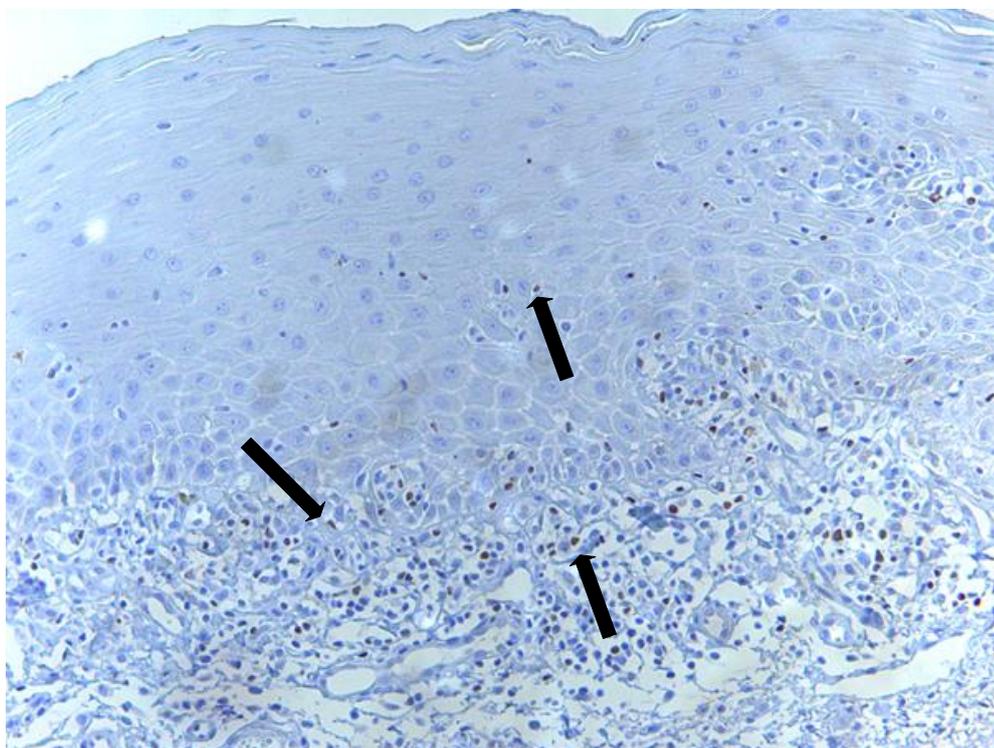
* Diferença significativa.

Verificou-se ainda a relação existente entre a quantidade de células intraepiteliais marcadas pelo Foxp3⁺ entre as doenças LPB, LPC e HFI, separadamente, entre os LPB e LPC analisados com HFI. Apenas a relação LPC e HFI apresentou diferença estatisticamente significativa ($P < 0,01$). Enquanto que as outras relações não revelaram diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$). Estes dados são demonstrados na Tabela 6 (Figura 8, 9, 10 e 12).

Tabela 6 - Diferença média e valor de P obtidos através da quantidade de células imunomarcadas intraepiteliais do Foxp3⁺ por campo, dos casos diagnosticados no período de 2007 a 2015. Campo Grande (MS). (n=50)

| | Diferença de classificação média | Valor de P |
|-----------------------|-------------------------------------|------------|
| LP Bucal X LP Cutâneo | 7,720 | $P > 0,05$ |
| LP Bucal X HFI | 8,825 | $P > 0,05$ |
| LP Cutâneo X HFI | 16,545 | $P < 0,01$ |

Figura 8 - Imunoexpressão do marcador Foxp3⁺ em líquen plano bucal, mostra marcação intraepitelial e justaepitelial (200x).



*Fonte: Imagem tirada no Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Faodo).

Figura 9 - Imunoexpressão do marcador Foxp3+ em líquen plano bucal, exibindo marcação intraepitelial (400x).

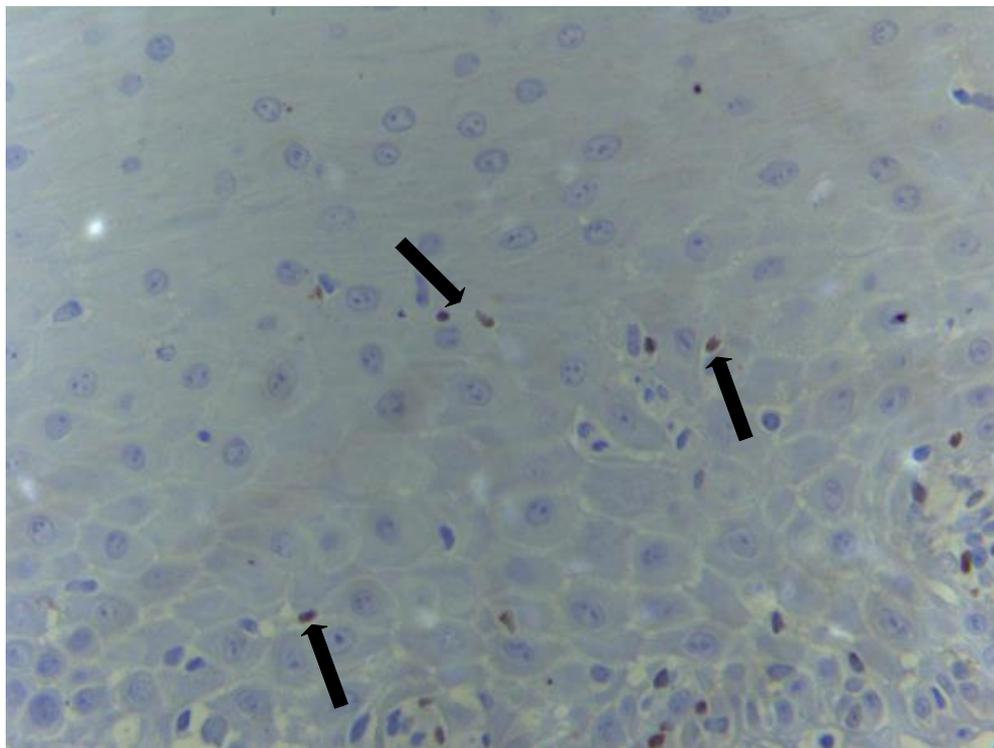
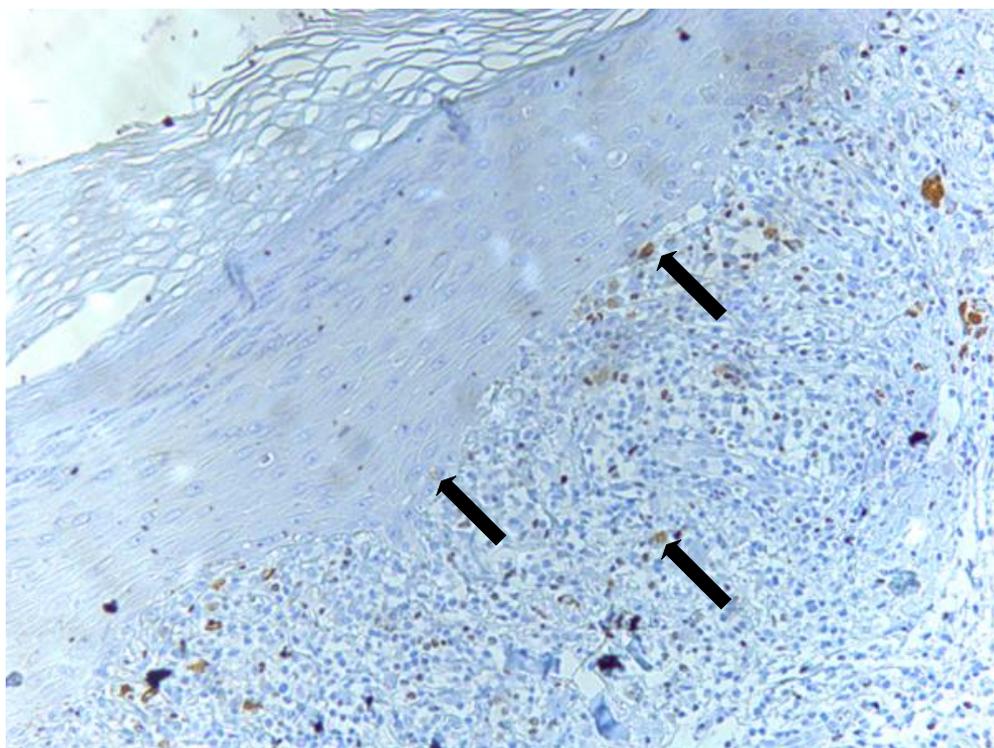


Figura 10 - Imunoexpressão do marcador Foxp3+ em líquen plano cutâneo, apontando marcação intraepidêmico e justaepidêmico (200x).



*Fonte: Imagens tiradas no Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAODO).

Figura 11 - Imunoexpressão do marcador Foxp3+ em líquen plano cutâneo, apontando marcação justaepidérmico (400x).

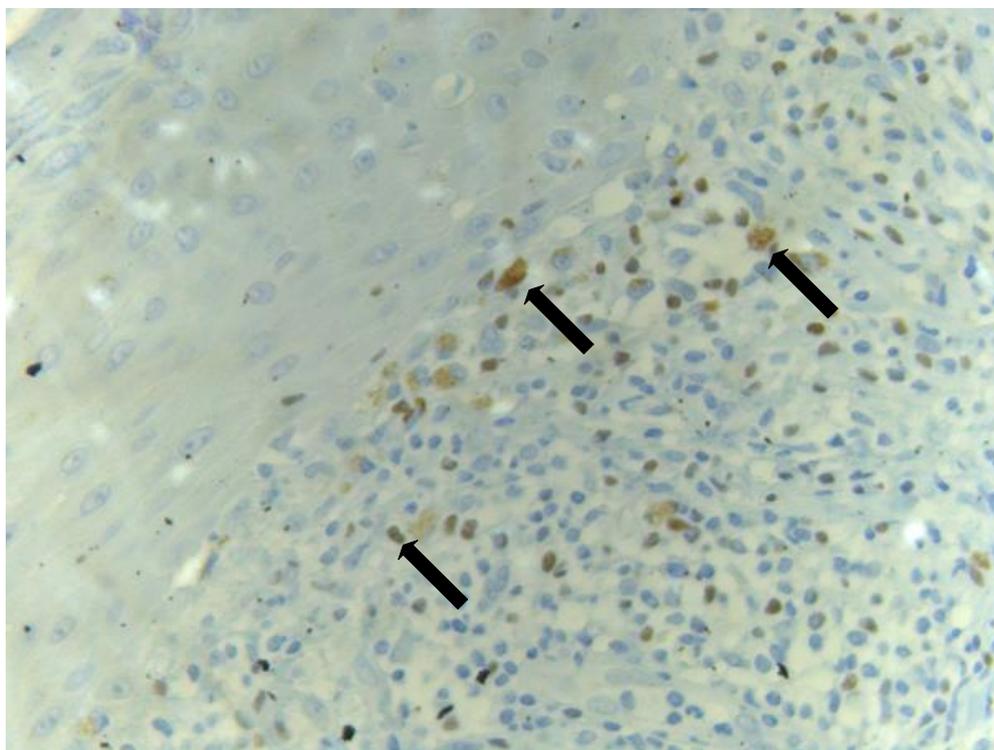
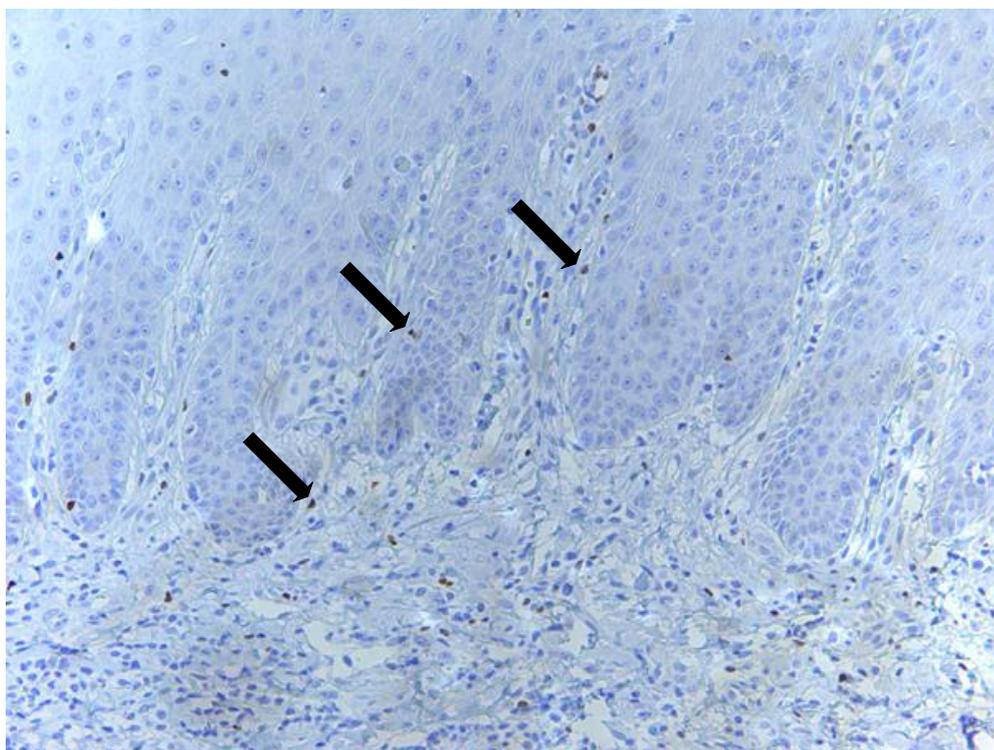


Figura 12 - Imunoexpressão do marcador Foxp3+ em hiperplasia fibrosa inflamatória, exibindo marcação justaepidérmico (200x).



*Fonte: Imagens tiradas no Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAODO).

6 DISCUSSÃO

As lesões extrabuciais associadas ao LPB afetam além da pele, a mucosa genital, couro cabeludo e unhas. (SHKLAR, 1972; ANURADHA, 2008). De etiologia desconhecida, podem ser manifestadas clinicamente em papular, reticular, eritematosa e erosiva (SHKLAR, 1972; SUGERMAN et al., 2002; BIDARRA, 2008; SCHLOSSER, 2010), sendo a forma erosiva considerada a mais sintomática (CARROZO; THORPE, 2009). Contudo a forma reticular é mais frequente em detrimento da forma erosiva (ANDREASEN, 1968; SHKLAR, 1972; AXÉLL; RUNDQUIST, 1987; EISEN, 2002; ANURADHA, 2008). Acometendo mais mulheres que homens principalmente entre a quarta e quinta década de vida (AXÉLL; RUNDQUIST, 1987; SUGERMAN; SAVAGE, 2002), sendo a mucosa jugal mais afetada (EISEN, 2002).

O presente estudo está em concordância com os autores uma vez que 60% dos casos afetam mulheres e com prevalência na quarta década de vida (36%), destas 80% foram lesões reticulares, e sua localização mais afetada a mucosa jugal.

Histologicamente o LPB em relação ao tipo de queratinização, evidenciou níveis equilibrados de paraqueratose, ortoqueratose e hiperparaqueratose, este último um pouco maior que os demais, isto, devido a maior parte das amostras serem de mucosa jugal e bordo de língua. Ao receber estímulos externos ocorre um aumento significativo na produção de queratina. Apresentou em 76% dos casos de LPB denso infiltrado inflamatório predominantemente linfocítico disposto em forma de faixa em região subepitelial. Havendo estudos que citam a presença deste achado histológico como uma das características principais do líquen plano (MOLLAOGLU, 2000; ANURADHA, 2008).

O líquen plano ainda apresenta etiologia desconhecida, contudo possui resposta imunomediada por infiltrado inflamatório predominante em linfócitos T (EISEN, 2005), em particular as células T CD8⁺ que são citotóxicas aos queratinócitos na camada basal do epitélio, sobrepondo as células T CD4⁺ (FARHI; DUPIN, 2010; BARBOSA et al, 2015). O ataque das células T auxiliares contra o epitélio e as ações do infiltrado, incluindo as células dendríticas às epiteliais, são considerados os mais prováveis na patogênese do líquen plano bucal, associados à expressão do MHC II (LOPES; COTRIM, 2001; FARHI; DUPIN, 2010). As células T CD8⁺ lesionais por sua

vez, podem ser ativadas por um antígeno de queratinócitos basais associados com MHC I promovendo uma resposta rápida e a consequente apoptose dos queratinócitos (SUGERMAN et al., 2000; SUGERMAN; SAVAGE, 2000; CARROZZO, 2014).

A identificação de células Tregs recentemente descritas como um subconjunto de células T CD4⁺ tem estendido seu papel no paradigma da imunidade adaptativa (HORI et al., 2003). Tem importante papel na modulação de doenças autoimunes e desordens inflamatórias (MIYARA; SAKAGUCHI, 2011). O LP é caracterizado por uma resposta imunemediada de células T contra células epiteliais, causando destruição celular e infiltração subepitelial de linfócitos T. Estudo recente encontrou grande número de células Tregs Foxp3⁺ no LPB comparado ao tecido sadio (PEREIRA et al., 2012).

No presente estudo verificou-se que dos 25 casos de LPB e 14 casos de LPC analisados, todos apresentaram marcação positiva para o Foxp3⁺, muito embora em diferentes quantidades. Confirmou-se que os níveis quantitativos do Foxp3⁺ em lesões de LP foram aumentadas comparadas a HFI. Devido as células Tregs terem um papel principal na indução e manutenção da tolerância e supressão da resposta imune, o grande número de Foxp3⁺ em lesões de LP indicam um aumento de células Tregs na tentativa de controlar a resposta imune exacerbada. Demonstrou-se que os níveis de Foxp3⁺ no infiltrado inflamatório do LPC foi aumentado comparado ao LPB e HFI. Este resultado sugere que é uma molécula principal imunológica a desempenhar papel na patogênese do LP, melhorando a nossa compreensão da resposta inflamatória. O que segundo De Boer et al. (2007) relataram que, em doenças distintas, onde há maior atividade da doença, maior o número de células Tregs encontradas.

O estudo acabou por focalizar as diferenças de comportamento imunoistoquímico do LPB e LPC. A maioria das doenças inflamatórias da mucosa bucal e da pele são devido à resposta imunemediada por células T. Estudos comparativos destes mecanismos pelos quais as células T reagem nestes tecidos devem ser realizados. O LP que afeta a mucosa bucal e a pele exibe manifestações clínicas distintas e o surgimento em cada órgão de maneira diferenciada, de acordo com as variações na sua estrutura e função. A mucosa bucal e pele diferem na queratinização, padrões, resistência à pressão externa, ambiente seco e umidade. Além disso, a pele tanto quanto a mucosa bucal é exposta a grandes quantidades de antígenos, bactérias, vírus ou fungos. Assim, fazendo possível a carga antigênica interferir nas células imunocompetentes.

Para explorar as células imunocompetentes que poderiam explicar a heterogeneidade do comportamento clínico, avaliou-se a expressão do Foxp3⁺, que foi significativamente maior em LPC comparado ao LPB. Isto indica que células Tregs foram significativamente maiores no LPC comparado ao LPB. Esta diferença no número das células Tregs Foxp3⁺ influenciam no curso clínico das duas variantes de LP. A ação do meio externo é uma outra possibilidade para explicar a alteração do número de Tregs nas lesões de pele, e da microbiota bucal nas lesões de LPB. A expressão de Foxp3⁺ em pacientes com LPB está associada à gravidade e duração da doença, sugerindo alterada resposta no desenvolvimento, evolução clínica e na capacidade de resultado ao tratamento. Isso pode estar relacionado também ao fato de o LPB atingir pacientes com duração prolongada da doença, além de não terem remissão espontânea, se comparado ao LPC. Fatores psicogênicos, dentes afiados, restaurações metálicas, próteses metálicas, intenso número de bactérias na microbiota bucal dentre outros fatores, acarretam na gravidade e duração da doença. Maiores investigações são necessárias para a performance do mecanismo de células Tregs Foxp3⁺ nas lesões de LPB. Isso pode depender de diferentes mecanismos imunopatológicos refletidos pela composição celular do infiltrado inflamatório subepitelial e reações de células epiteliais.

A ideia de que as subpopulações de linfócitos no LPB apresentem um desequilíbrio numérico, ocasiona falha nas funções supressoras, progredindo com a doença e as alterações clínicas, intensificando-se, dessa maneira há o aumento das células citotóxicas predominando no infiltrado inflamatório local onde o ambiente é menos favorável ao seu controle.

Considerando as diferenças no comportamento do sistema imune da mucosa bucal e cutânea focados em mecanismos de tolerância a exposição a um antígeno que modula a resposta para um comportamento tolerogênico, tomados em conjunto, estes dados oferecem uma explicação para a diferença de comportamento clínico das duas variantes da doença. Suportam a hipótese de que mecanismos imunopatogênicos diferentes podem ser envolvidos. O que podemos sugerir que células Tregs induzidas periféricamente podem estar aumentadas em processos inflamatórios cutâneos se comparados ao bucal. Além disso, deve-se notar que estes resultados não foram influenciados pela terapia, desde que nenhum paciente recebeu tratamento para influenciar o comportamento imunológico antes da biópsia. Conforme proposto para outras doenças autoimunes crônicas associadas com células Tregs

(SUGIYAMA et al., 2005), o envolvimento de Foxp3⁺ na patogênese de LP pode ser considerado seletivo para o auxílio terapêutico.

O método imunoistoquímico usado para detectar Foxp3⁺ não é suficiente para relacionar em relação a etiopatogenia do LP, mas auxilia na compreensão de que este também pode ser um fator envolvido ou associado a outros na descoberta de novos meios de controle e tratamento da doença, além de suas possíveis causas.

Considerando a capacidade já estabelecida das células Tregs de modular as respostas imunológicas, juntamente com o grande potencial (de regeneração) que o LPC apresenta para remissão espontânea, ressalta-se que o desenvolvimento e a implantação de novas estratégias imunoterapêuticas que regulem as frequências e funções destas células possam futuramente auxiliar no tratamento de várias lesões inflamatórias mediadas imunologicamente, entre elas o LPB.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- a.) O Foxp3⁺ está presente nas lesões de líquen plano;
- b.) Apresenta-se em maior quantidade em lesões de líquen plano cutâneo que líquen plano bucal;
- c.) Podemos especular que por participar da modulação imunológica em maior quantidade em LPC, justificaria o fato das lesões terem sua regressão espontânea, diferentemente do LPB que não evolui;
- d.) A imunexpressão do Foxp3⁺ tanto para as células justaepteliais quanto para as intraepiteliais tiveram maior marcação para o LPC, sendo que o LPB e HFI tiveram suas expressões, porém em menor quantidade.

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lohr J, Knoechel B, Nagabhushanam V. T cell tolerance and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 2004; 3:471-5.

Andreasen JO. Oral lichen planus. *OSOMOP*. 1968; 25(1):31-42.

Anuradha C, Reddy BVR, Nandan SRK, Kumar SRK. Oral lichen planus: A review. *N Y State Dent J*. 2008; 74(4):66-8.

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

Banham AH, Powrie FM, Suri-Payer E. Foxp3+ regulatory T cell: current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol*. 2006; 36:2832-6.

Barbosa NG, Silveira EJD, Lima ENA, Oliveira PT, Soares MSM, Medeiros AMC. Factors associated with clinical characteristics and symptoms in a case series of oral lichen planus. *Inter J Dermatol*. 2015; 54(1):e1-e6.

Bidarra M, Buchanan JAG, Scully C, Moles DR, Porter SR. Oral lichen planus: a condition with more persistence and extra-oral involvement than suspected? *J Oral Pathol Med*. 2008; 37:582-6.

Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Therapeutics*. 2001; 69:89-95.

Carrozzo M, Thorpe RJ. Update on oral lichen planus. *Expert Rev Dermatol*. 2009; 4(5):483-94.

Casian RA, Trejo QP, De León TC, Carmona RD. Hiperplasia fibrosa inflamatória: reporte de um caso. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*. 2011; 4(2):74-9.

Dako. Immunohistochemical staining methods. 5 ed. Kumar G, Rudbeck L, eds. Carpinteria: Dako; 2009. p. 1-218.

De Boer OJ, Van der Loos CM, Teeling P, Van der Wal AC, Teunissen MBM. Immunohistochemical analysis of regulatory T cell markers Foxp3 and GITR on CD4+CD25+ T cells in normal skin and inflammatory dermatoses. *J Histochem Cytochem.* 2007; 55(9):891-8.

Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, Capelli A, Magno F, D'AnnaSE, Zanini A, Brun P, Casolari P, Chung KF, Barnes PJ, Papi A, Adcock I, Balbi B. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol.* 2009; 157:316-24.

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

Eisen D, Carrozzo M, Sebastian JVB, Thongprasom K. Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Diseases.* 2005; 11(6):338-49.

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

Farhi D, Dupin N. Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. *Clin Dermatol.* 2010; 28:100-8.

Ferro AB. Imunohistoquímica [tese]. Lisboa: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa; 2013.

Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nature immunology* 2009; 10(7):689-95.

Firth FA, Friedlander LT, Parachuru VPB, Kardos TB, Seymour GJ, Rich AM. Regulation of immune cells in oral lichen planus. *Arch Dermatol Res*. 2015; 307(4):333-9.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*. 2003; 4(4):330-6.

Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*. 2007. 445(15): 771-5.

Gratz IK, Rosenblum MD, Abbas AK. The life of regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1283(1):8-12.

Gordón-Núñez MA, Silva Júnior FL, Lucena HF, Galvão HC, Souza LB, Pinto LP. Análisis clínico e histomorfológico de la mucosa oral normal, hiperplasia fibroepitelial inflamatoria oral y displasia epitelial oral. *Int J Morphol*. 2008;26(2):345-52.

Holmstrup P, Thorn JJ, Rindum J, Pindborg JJ. Malignant development of lichen planus-affected oral mucosa. *J Oral Pathol*. 1988; 17:219-25.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cells development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003; 299:1057-61.

Li Z, Li D, Tsun A, Li B. Foxp3⁺ regulatory cells and their functional regulation. *Cell Mol Immunol*. 2015; 12:558-65.

Lei L, Zhan L, Tan W, Chen S, Li Y, Reynolds M. Foxp3 gene expression in oral lichen planus: a clinicopathological study. *Mol Med Rep*. 2013; 9:928-34.

Loddenkemper C, Hoffmann C, Stanke J, Nagorsen D, Baron U, Olek S, Huehn J, Ritz JP, Stein H, Kaufmann AM, Schneider A, Cichon G. Regulatory (FOXP3⁺) T cells as target for immune therapy of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Cancer Sci*. 2009; 100(6):1112-7.

Lopes FF; Cutrim MCFN. Imunopatologia do líquen plano oral – parte I. Antígeno leucocitário (HLA) e as células apresentadoras de antígeno (APC). RFO UPF. 2001; 6(1):7-10.

Lopes FF; Cutrim MCFN. Imunopatologia do líquen plano oral – parte II. Moléculas de adesão, citocinas e imunidade humoral. RFO UPF. 2001;6(1):11-13.

Miyara M, Sakaguchi S. Human Foxp3⁺CD4⁺ regulatory T cells: their knowns and unknowns. Immunol Cell Biol. 2011; 89:346-51.

Mollaoglu N. Oral lichen planus: a review. Br J Oral Maxillofac Surg. 2000; 38(4):370-7.

Muñante-Cárdenas JL, Jaimes M, Olate S, Albergaria-Barbosa JR. Consideraciones actuales em hiperplasia fibrosa inflamatoria. Acta Odontológica Venezolana. 2009; 47(2):1-9.

Pandiyan P, Zhu J. Origin and functions of pro-inflammatory cytokine producing Foxp3⁺ regulatory T cells. Cytokine. 2015; 76(1):13-24.

Pereira JS, Monteiro BV, Nonaka CF, Silveira EJ, Miguel MC. Foxp3⁺ T regulatory cells in oral lichen planus and its correlation with the distinct clinical appearance of the lesions. Int J Exp Path. 2012; 93:287-94.

Piccirillo, CA. Regulatory T cells in health and disease. Cytokine 2008; 43(3):395-401.

Rodríguez AF, Sacsquispe SJ. Hiperplasia fibrosa inflamatoria y posibles factores asociados em adultos mayores. Rev Estomatol Herediana. 2005; 15(2):139-44.

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3⁺ - expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nature immunology 2005; 6(4):345-52.

Santoro A, Majorana A, Bardellini E, Gentili F, Festa S, Sapelli P, Facchetti F. Cytotoxic molecule expression. and epitelial cell apoptosis in oral and cutaneous lichen planus. *Am J Clin Pathol.*2004; 121:758-64.

Santos MESM, Costa WRM, Silva Neto JC. Terapêutica cirúrgica da hiperplasia fibrosa inflamatória – relato de caso. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxi-Fac.* 2004; 4(4):241-5.

Schlosser BJ. Lichen planus and lichenoid reactions of the oral mucosa. *Dermatol Ther.* 2010; 23(3):251-67.

Scully C, Eisen D, Carrozzo M. Management of oral lichen planus. *Am J Clin Dermatol.* 2000; 1(5):287-306.

Seoane J, Romero MA, Varela-Centelles P, Diz-Dios P, Garcia-Pola MJ. Oral lichen planus: a clinical and morphometric study of oral lesions in relation to clinical presentation. *Braz Dent J.* 2004; 15(1):9-12.

Shen Z, Gao X, Ma L, Zhou Z, Shen X, Liu W. Expression of Foxp3 and interleukin-17 in lichen planus lesions with emphasis on difference in oral and cutaneous variants. *Arch Dermatol Res* 2014; 306(5):441-6.

Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: past present, and future. *J Histochem Cytochem.* 1997; 45(3):327-43.

Shklar G. Lichen planus as an oral ulcerative disease. *Oral Surg.* 1972; 33(3):376-88.

Silverman S. Oral lichen planus: a potentially premalignant lesion. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58:1286-8.

Skaggs BJ, Singh RP, Hahn BH. Induction of immune tolerance by activation of CD8+ T suppressor/regulatory cells in lupus-prone mice. *Hum Immunol.* 2008; 69(11):790-6.

Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2011; 5(6): 463-66.

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

Sugerman PB, Savage NW, Zhou X, Walsh LJ, Bigby M. Oral lichen planus. *Clin Dermatol*. 2000a; 18(5):533–9.

Sugerman PB, Satterwhite K, Bigby M. Autocytotoxic T-cell clones in lichen planus. *Br J Dermatol*. 2000b; 142:449-56.

Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, McCormick TS, Cooper KD. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol*. 2005; 174:164-73.

Tao X, Xia J, Chen X, Wang H, Dai Y, Rhodus NL, Cheng B. Foxp3+ T regulatory cells in lesions of oral lichen planus correlated with disease activity. *Oral Diseases*. 2010; 16:76-82.

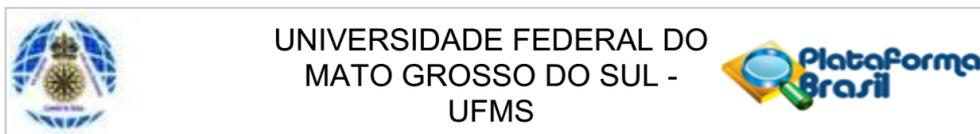
Torlakovic EE, Riddell R, Banerjee D, El-Zimaity H, Pilavdzic D, Dawe P, et al. Canadian Association of Pathologists–Association canadienne des pathologistes National Standards Committee /Immunohistochemistry Best Practice Recommendations for Standardization of Immunohistochemistry Tests. *Am J Clin Pathol*. 2010; 133(3):354–65.

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.

Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(7):523-32.

WHO International Programme on Chemical Safety. Biomarkers in risk assessment: validity and validation. 2001.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão imuno-histoquímica do Foxp3 e IL-23 em lesões de Líquen plano bucal, cutâneo e hiperplasia fibrosa inflamatória.

Pesquisador: Olívia Tosta de Macedo Vianna Mateus

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50810915.8.0000.0021

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.345.753

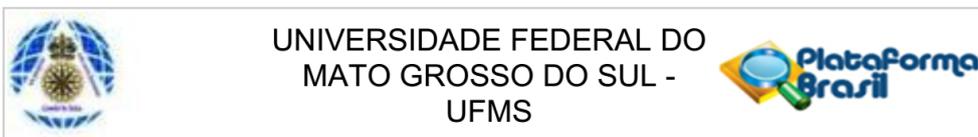
Apresentação do Projeto:

O líquen plano (LP) bucal é uma doença autoimune mucocutânea e inflamatória. Apresenta-se com diferenças clínicas descritas em: reticular (papular, em placa), erosiva (bolhosa, ulcerada) e eritematoso (atrófica), sendo que as múltiplas morfologias podem apresentar-se simultaneamente. Não há cura para o LP bucal e cutâneo. Os tratamentos atuais são paliativos e têm eficácia variada. Os pacientes com LP são gerenciados com medicamentos que não foram desenvolvidos nem destinados à administração e tratamento das lesões orais, necessitando de estudos eficazes e adequados. Existem poucos estudos científicos de marcadores imuno-histoquímicos de processos inflamatórios em lesões de líquen plano bucal, e não há na literatura uma correlação direta entre o Foxp3, e a Interleucina-23, assim este estudo irá propor um novo modelo de interação entre as células Treg FoxP3+, células T e queratinócitos na patogênese do líquen plano, fornecendo dados para auxiliar na busca de uma etiopatogenia.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar a expressão dos marcadores imuno-histoquímicos, Foxp3+ e IL23 no líquen plano bucal e cutâneo com o infiltrado inflamatório da hiperplasias fibrosas inflamatórias.

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br



Continuação do Parecer: 1.345.753

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos para os pacientes, pois os mesmos não serão atendidos por nós, apenas utilizaremos os artefatos armazenados no laboratório de Patologia Bucal da UFMS.

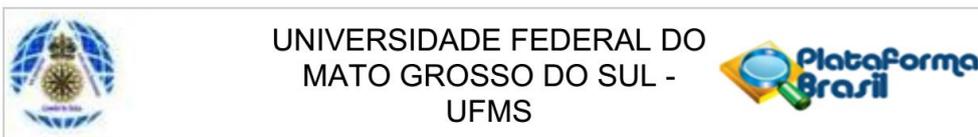
A elaboração da imuno histoquímica será realizada por um laboratório químico especializado de São Paulo. O estudo irá beneficiar e impactar a sociedade científica tanto do estado do Mato Grosso do Sul quanto a comunidade científica mundial atentando para a necessidade contínua de estudo e pesquisa para o líquen plano, especificamente o bucal, uma doença autoimune que ainda possui uma pequena porcentagem de malignização, sendo pré-cancerizável. Por acometer a cavidade bucal, LP apresenta maior dificuldade para uma remissão rápida devido a gravidade e implicações celulares das lesões. Nenhuma remissão e alívio de lesões sintomáticas apresentam remissão espontânea, causando muita dor, dificuldade na alimentação, apatia, febre e outros sintomas, que após o início do tratamento leva alguns dias para a cicatrização. Uma maior conscientização da população para a procura de profissionais assim poderão aprender a lidar com esta patologia, seus sinais e sintomas procurando ajuda, através de palestras e divulgação para a busca de tratamento. A coleta para os artefatos de estudo serão realizadas através dos bancos de dados da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, devido a elevada demanda de materiais biopsiados de pacientes com estas enfermidades da rede pública, assim poderemos saber a condição bucal em nosso município, além de contribuímos para a saúde pública de nosso Estado. Uma vez que nosso estado é conhecido mundialmente pela cura e tratamento de doenças dermatológicas como foi o "Fogo Selvagem", o pênfigo, na década de 40, pelo Hospital Adventista do Pênfigo, poderemos manter a sensibilidade e a oportunidade de sermos cooperadores em doenças dermatológicas autoimunes como o líquen plano bucal e cutâneo, que ainda apresentam cura e etiopatogenia ainda não conhecidas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Na primeira versão do Projeto, foi informado pela pesquisadora que o projeto "será custeado por edital de fomento/bolsa de estudo, ou verba particular". Na segunda versão apresentada na Plataforma Brasil a pesquisadora atribuiu a ela a responsabilidade pelo orçamento (financiamento próprio). Solicitamos que, caso a pesquisadora esteja no aguardo de aprovação de recursos externos para custeio e não seja contemplada, impedindo a realização da pesquisa, que o Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição seja informado.

Solicitamos adequação do cronograma de execução das atividades, programando a atividade de "triagem dos prontuários e dos blocos de parafina contendo lesões de líquen plano e hiperplasia

| |
|--|
| Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS |
| Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110 |
| UF: MS Município: CAMPO GRANDE |
| Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br |



Continuação do Parecer: 1.345.753

fibrosa inflamatória" para ocorrer após a aprovação ética do Projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador atendeu todas as solicitações de adequação feitas após análise ética do Projeto:

- a folha de rosto foi apresentada devidamente assinada pela Instituição Proponente;
- foram inseridos no projeto anexado os riscos e benefícios da pesquisa, o orçamento e a responsabilidade pelo financiamento;
- foi retirada a informação sobre a aplicação do TCLE aos pesquisadores que farão a análise das lâminas, já que o TCLE é sempre direcionado aos participantes da pesquisa;
- a dispensa de TCLE foi devidamente justificada pela pesquisadora: "Os prontuários serão apenas analisados apenas a título de critérios de inclusão e exclusão, não entraremos em contato com os pacientes, uma vez que muitos morreram, moram em outras capitais e estão sem os dados cadastrais atualizados, não sendo necessário o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido";
- foi apresentada a responsabilidade pelo orçamento da pesquisa: financiamento próprio.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador atendeu todas as solicitações de adequação feitas após análise ética do Projeto:

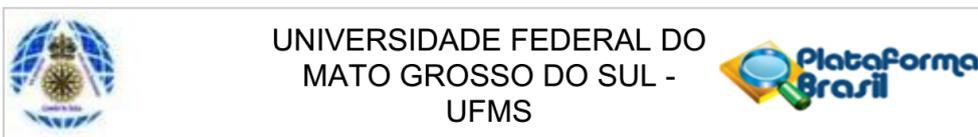
- a folha de rosto foi apresentada devidamente assinada pela Instituição Proponente;
- foram inseridos no projeto anexado os riscos e benefícios da pesquisa, o orçamento e a responsabilidade pelo financiamento;
- foi retirada a informação sobre a aplicação do TCLE aos pesquisadores que farão a análise das lâminas, já que o TCLE é sempre direcionado aos participantes da pesquisa;
- a dispensa de TCLE foi devidamente justificada pela pesquisadora: "Os prontuários serão apenas analisados apenas a título de critérios de inclusão e exclusão, não entraremos em contato com os pacientes, uma vez que muitos morreram, moram em outras capitais e estão sem os dados cadastrais atualizados, não sendo necessário o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido";
- foi apresentada a responsabilidade pelo orçamento da pesquisa: financiamento próprio.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|----------------|-----------------------------|------------|---------------|----------|
| Outros | doc02575920151201141357.pdf | 01/12/2015 | PAULO ROBERTO | Aceito |

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br



Continuação do Parecer: 1.345.753

| | | | | |
|--|--|---------------------|--------------------------------------|--------|
| Outros | doc02575920151201141357.pdf | 16:16:42 | H Aidamus de Oliveira Bastos | Aceito |
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_521132.pdf | 23/11/2015 17:05:53 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PESQUISA_OTMVM.pdf | 23/11/2015 17:05:27 | Olivia Tosta de Macedo Vianna Mateus | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_Rosto.pdf | 23/11/2015 17:00:37 | Olivia Tosta de Macedo Vianna Mateus | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Zarate.pdf | 20/10/2015 22:23:21 | Olivia Tosta de Macedo Vianna Mateus | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Rosana.pdf | 20/10/2015 22:22:58 | Olivia Tosta de Macedo Vianna Mateus | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Nara.pdf | 20/10/2015 22:22:22 | Olivia Tosta de Macedo Vianna Mateus | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Ginter.pdf | 20/10/2015 22:21:53 | Olivia Tosta de Macedo Vianna Mateus | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPO GRANDE, 01 de Dezembro de 2015

Assinado por:
PAULO ROBERTO HAIDAMUS DE OLIVEIRA BASTOS
 (Coordenador)

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br

ANEXO B – Numeração dos blocos utilizados no estudo.

| Nº Caso | Nº Laudo | Nº Caso | Nº Laudo |
|----------------|-----------------|----------------|----------------------|
| 1 | 71/07 | 26 | 84/14 |
| 2 | 143/07 | 27 | 87/14 |
| 3 | 206/07 | 28 | 89/14 |
| 4 | 45/09 | 29 | 103/14 |
| 5 | 70/09 | 30 | 108/14 |
| 6 | 204/09 | 31 | 117/14 |
| 7 | 238/09 | 32 | 126/14 |
| 8 | 12/10 | 33 | 132/18 |
| 9 | 18/10 | 34 | 142/14 |
| 10 | 142/10 | 35 | 67/16 |
| 11 | 18/12 | 36 | 76/16 |
| 12 | 63/12 | 37 | 550/13 |
| 13 | 67/12 | 38 | 1919A/13 |
| 14 | 77/12 | 39 | 1919B/13 |
| 15 | 82/12 | 40 | 1243/13 |
| 16 | 83/12 | 41 | 1293/13 |
| 17 | 27/13 | 42 | 3300A/13 |
| 18 | 44/13 | 43 | 3300B/13 |
| 19 | 47/13 | 44 | 369/14 |
| 20 | 92/14 | 45 | 369 ^a /14 |
| 21 | 12/16 | 46 | 784/14 |
| 22 | 13/16 | 47 | 805/14 |
| 23 | 41/16 | 48 | 1914/14 |
| 24 | 43/16 | 49 | 323/15 |
| 25 | 77/16 | 50 | 1627/15 |

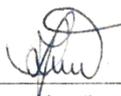
APÊNDICE A – Solicitações de autorização para consulta de prontuários, laudos e empréstimo de materiais dos laboratórios.

SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO

Eu, Olivia Tosta de Macedo Vianna Mateus, portadora do R.G 001765855 SSP/MS, pesquisadora do curso de Pós-Graduação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul da Faculdade de Odontologia, do programa de carcinogênes, solicito autorização da Profª Drª Rosana Mara Giordano de Barros, Profª Responsável pelo Laboratório de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da UFMS, para acesso aos blocos de parafina contendo material biopsiado, requisições de exames e laudos histopatológicos para atividades relacionadas à pesquisa científica e elaboração de dissertação de mestrado intitulada “Expressão imunoistoquímica de Foxp3⁺ e IL-23 em lesões de líquen plano oral e cutâneo” sob orientação da Profª Drª Rosana Mara Giordano de Barros, no período de maio de 2015 à janeiro de 2017.

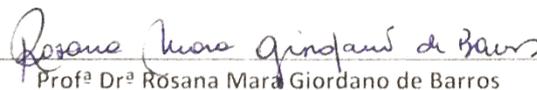
Comprometo-me a utilizá-los e devolvê-los aos seus respectivos banco de dados ao término da pesquisa, ou quando solicitado, de maneira sempre a zelar o conteúdo sem causar danos.

Campo Grande, 26 de maio de 15.



Olivia Tosta de Macedo Vianna Mateus
Mestranda em Patologia Bucal
Solicitante

Ciente/Autorizado:



Profª Drª Rosana Mara Giordano de Barros
Responsável pela Disciplina e Laboratório de Patologia Buco-Dental

SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO

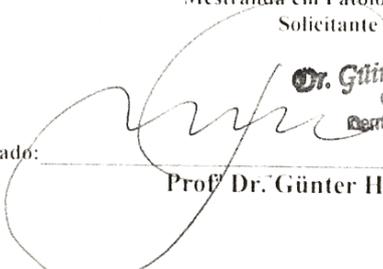
Eu, Olivia Tosta de Macedo Vianna Mateus, portadora do R.G 001765855 SSP/MS, pesquisadora do curso de Pós-Graduação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul da Faculdade de Odontologia, do programa carcinogênese, solicito autorização da Profª Dr. Günter Hans Filho coordenador do setor de dermatologia da Faculdade de Medicina da UFMS, para ter acesso aos dados e materiais para pesquisa, tanto de laboratórios quanto para os prontuários nas atividades relacionadas à pesquisa científica e elaboração de dissertação de mestrado intitulada "Expressão imuno-histoquímica de Foxp3 e IL-23 em lesões de líquen plano bucal, cutâneo e hiperplasia fibrosa inflamatória" sob orientação da Profª Drª Rosana Mara Giordano de Barros, no período de agosto de 2015 à janeiro de 2017.

Comprometo-me a utilizá-los e devolvê-los aos seus respectivos banco de dados ao término da pesquisa, ou quando solicitado, de maneira sempre a zelar o conteúdo sem causar danos.

Campo Grande, 25 de agosto de 2015.

Olivia Tosta de Macedo Vianna Mateus
Mestranda em Patologia Bucal
Solicitante

Ciente/Autorizado:


Prof. Dr. Günter Hans Filho

Dr. Günter Hans Filho
CRM 1336
Dermatologia - NHU

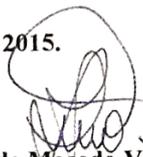
em 25/08/15

SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO

Eu, **Olivia Tosta de Macedo Vianna Mateus**, portadora do R.G 001765855 SSP/MS, pesquisadora do curso de Pós-Graduação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul da Faculdade de Odontologia, do programa carcinogênese, solicito autorização da Prof^a Dra Nára Rejane Santos Pereira Coordenadora das clínicas odontológicas da UFMS, para ter acesso aos dados e materiais para pesquisa, tanto de laboratórios quanto para os prontuários nas atividades relacionadas à pesquisa científica e elaboração de dissertação de mestrado intitulada “Expressão imuno-histoquímica de Foxp3⁺ e IL-23 em lesões de líquen plano bucal, cutâneo e hiperplasia fibrosa inflamatória” sob orientação da Prof^a Dr^a Rosana Mara Giordano de Barros, no período de agosto de 2015 à janeiro de 2017.

Comprometo-me a consultá-los em seus respectivos bancos de dados, de maneira a sempre zelar o conteúdo sem causar danos.

Campo Grande, 01 de setembro de 2015.


Olivia Tosta de Macedo Vianna Mateus
Mestranda em Patologia Bucal
Solicitante

Ciente/Autorizado:


Prof^a Dra Nára-Rejane Santos Pereira
Nára Rejane Santos Pereira
Coordenadora Clínica
Faodp/UFMS

SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO

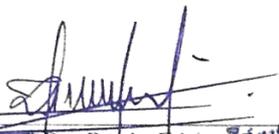
Eu, Olivia Tosta de Macedo Vianna Mateus, portadora do R.G. 001765855 SSP/MS, pesquisadora do curso de Pós-Graduação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul da Faculdade de Odontologia, do programa carcinogênese, solicito autorização da Profª Drª Paulo Zárato Pereira, Diretor da Faculdade de Odontologia da UFMS, para ter acesso aos dados e materiais para a pesquisa, tanto de laboratórios quanto os prontuários nas atividades relacionadas à pesquisa científica e elaboração de dissertação de mestrado intitulada "Expressão imunohistoquímica de Foxp3 e IL-23 em lesões de líquen plano bucal, cutâneo e hiperplasia fibrosa inflamatória", sob orientação da Profª Drª Rosana Mara Giordano de Barros, no período de agosto de 2015 à janeiro de 2017.

Comprometo-me a consultá-los em seus respectivos banco de dados, de maneira a sempre zelar o conteúdo sem causar danos.

Campo Grande, 15 de outubro de 15.


Olivia Tosta de Macedo Vianna Mateus
Mestranda em Patologia Bucal
Solicitante

Ciente/Autorizado:


~~Prof. Dr. Paulo Zárato Pereira~~
Prof. Paulo Zárato Pereira
Diretor da Faculdade de Odontologia
FAODO - UFMS

19/10/2015.