

MÁRCIA FAVA

**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE
LESÕES ORAIS DE LÍQUEN PLANO E
LÚPUS ERITEMATOSO POR MEIO DE
IMUNOISTOQUÍMICA E PAS**

Profª Drª Karen Cherubini

Orientadora



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LESÕES ORAIS DE LÍQUEN
PLANO E LÚPUS ERITEMATOSO POR MEIO DE
IMUNOISTOQUÍMICA E PAS**

**DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF LICHEN PLANUS AND LUPUS
ERYTHEMATOSUS ORAL LESIONS USING
IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND PAS**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Área de Concentração, Estomatologia Clínica

MÁRCIA FAVA

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Karen Cherubini

PORTO ALEGRE

2011

MÁRCIA FAVA

**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LESÕES ORAIS DE LÍQUEN
PLANO E LÚPUS ERITEMATOSO POR MEIO DE
IMUNOISTOQUÍMICA E PAS**

**DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF LICHEN PLANUS AND LUPUS
ERYTHEMATOSUS ORAL LESIONS USING
IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND PAS**

Porto Alegre

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F272d Fava, Márcia
Diagnóstico diferencial de lesões orais de líquen plano e lúpus eritematoso por meio de imunistoquímica e PAS = Differential diagnosis of lichen planus and lupus erythematosus oral lesions using immunohistochemistry and PAS / Márcia Fava. - Porto Alegre, 2011.
78 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Fac. de Odontologia, PUCRS.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Karen Cherubini.

1. Odontologia. 2. Estomatologia Clínica. 3. Líquen Plano Bucal. 4. Lúpus Eritematoso Sistêmico. 5. Imunistoquímica. I. Cherubini, Karen. II. Título.

CDD 617.607

Ficha Catalográfica elaborada por
Vanessa Pinent
CRB 10/1297

Dedico esta Tese aos meus pais, Ary e Vera, por terem me dado a vida. Às minhas irmãs, Maristela e Marion, amigas de toda a hora. À minha avó, Antonieta (*in memoriam*), minha grande incentivadora e amiga. Ao meu marido e companheiro, Paulo Rabello.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Cada ser humano recebe a anunciação e, grávido de alma, leva a mão à garganta, em susto e angústia. Como se houvesse para cada um, em algum momento da vida, a anunciação de que há uma missão a cumprir. A missão não é leve: cada homem é responsável pelo mundo inteiro.

A Descoberta do Mundo, Clarice Lispector (1925-1977)

E minha orientadora, professora Dra. Karen Cherubini, recebeu sua missão, a difícil missão de transmitir ensinamento. E com responsabilidade, dedicação e competência cumpre sua tarefa com leveza, naturalidade e segurança.

Meu agradecimento especial a essa pessoa incansável na missão de orientar e grande responsável por este trabalho, com quem tive um aprendizado constante.

Agradeço a convivência agradável, a amizade que cultivamos nesses anos e a paciência nos momentos mais difíceis.

Agradeço por sempre me incentivar e por nunca esmorecer, mesmo quando tudo parecia tão difícil.

Dra. Karen, obrigada por acreditar que era possível e tornar realidade nosso trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em especial, às Professoras **Dra. Liliane Soares Yurgel, Dra. Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo e Dra. Fernanda Gonçalves Salum**, exemplos de sabedoria e profissionalismo, pelo carinho recebido e amizade que fizemos nesses longos anos de convivência. Por fazerem o Serviço de Estomatologia da PUCRS ter o reconhecimento que tem.

Aos meus colegas **Filipe Ivan Daniel e Renata da Rocha Hoffmann**, pelo coleguismo, pela troca de experiência e, principalmente, pela amizade que fizemos. Obrigada pelos bons momentos e pelo apoio nas horas difíceis.

A **Tiago Giulianni**, técnico do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital São Lucas da PUCRS, pelo compromisso, dedicação, disponibilidade, paciência e assessoramento técnico. Obrigada por fazer nossos encontros de estudo serem momentos agradáveis e transformá-los em amizade.

Ao residente de Reumatologia, **Dr. Deonilson G. Schmoeller**, pela colaboração na seleção das pacientes, pela competência, pelo apoio e carinho.

Ao Prof. **Dr. José Antônio Poli de Figueiredo**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS.

Aos demais Professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da PUCRS.

Ao Professor **Dr. Vinícius Duval da Silva**, do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS, por disponibilizar o uso do equipamento do laboratório.

Ao Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS, em especial aos Professores **Dr. Mauro Kaiserman, Dr. Marcus Franck e Dr. Henrique Staub**.

À acadêmica da Faculdade de Odontologia, **Débora Martins Simões**, pela colaboração como bolsista de Iniciação Científica e pela amizade.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, **Ana Lúcia, Carlos Eduardo, Davenir e Marcos** pela paciência, carinho e atenção.

À **Dra. Ana Geyer**, à técnica **Cristina** e à **Sra. Hebe**, do Laboratório Patologistas Reunidos.

Às pacientes que participaram desta pesquisa.

A todos os meus amigos que compreenderam esse longo período de ausências.

*Aprender é a única arte de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.*

Leonardo Da Vinci (1452-1519)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	LÍQUEN PLANO	21
2.1.1	Apoptose	22
2.1.2	Células Dendríticas	24
2.1.3	Mastócitos	26
2.1.4	Linfócitos T CD4 e T CD8	27
2.1.5	Linfócitos B	28
2.1.6	Membrana Basal	28
2.1.7	Imunofluorescência Direta	29
2.2	LÚPUS ERITEMATOSO	30
2.2.1	Lúpus Eritematoso Sistêmico	30
2.2.2	Lúpus Eritematoso Discoide	31
2.2.3	Lesões Orais no Lúpus Eritematoso	31
2.2.4	Apoptose	32
2.2.5	Células Dendríticas	34
2.2.6	Mastócitos	35
2.2.7	Linfócitos T CD4 e T CD8	35
2.2.8	Linfócitos B	36
2.2.9	Membrana Basal	36
2.2.10	Imunofluorescência Direta	37
2.3	LÍQUEN PLANO VERSUS LÚPUS ERITEMATOSO	39
3	PROPOSIÇÃO	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	42
4.2	APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DE PESQUISA	42
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	42
4.3.1	Critérios de Inclusão	42
4.3.2	Critérios de Exclusão	43

4.4	PROCEDIMENTOS	43
4.4.1	Confirmação Diagnóstica	45
4.4.1.1	Hematoxilina e Eosina	45
4.4.1.2	Imunofluorescência Direta	46
4.4.2	Processamento Imunoistoquímico e PAS	47
4.4.3	Captura e Análise das Imagens	48
4.4.3.1	Imunoistoquímica	49
4.4.3.2	PAS	51
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5	RESULTADOS	53
5.1	CONFIRMAÇÃO DIAGNÓSTICA	53
5.2	ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	54
5.2.1	CD1a	54
5.2.2	CD4	54
5.2.3	CD8	55
5.2.4	CD20	55
5.2.5	Caspase-3	56
5.2.6	Triptase	56
5.2.7	Comparação entre Líquen Plano, Lúpus Eritematoso Sistêmico e Lúpus Eritematoso Discoide	57
5.3	PAS – ESPESSURA DA MEMBRANA BASAL	59
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÕES	70
8	REFERÊNCIAS	71
	ANEXOS	79

RESUMO

As lesões orais do líquen plano e do lúpus eritematoso exibem aparência clínica e histopatológica similar, o que dificulta o diagnóstico. A presente pesquisa teve por objetivo investigar critérios de diagnóstico diferencial das lesões orais das duas doenças por meio de PAS e imunohistoquímica. Pacientes portadoras de lesões orais de líquen plano (n=21) e de lúpus eritematoso (n=23) foram submetidas à biópsia incisional das lesões, e o diagnóstico clínico foi confirmado por HE e imunofluorescência direta. Após a confirmação diagnóstica, os espécimes foram submetidos à coloração por PAS e processamento imunohistoquímico. As imagens histológicas foram avaliadas no programa Image ProPlus 5.4.1, sendo quantificadas a expressão imunohistoquímica de CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase-3, triptase e a espessura da membrana basal. A expressão imunohistoquímica de CD1a foi significativamente maior no grupo líquen plano, tanto para epitélio, quanto para conjuntivo. A expressão de CD4 e CD20 em epitélio não diferiu significativamente entre líquen plano e lúpus eritematoso; entretanto, no tecido conjuntivo foi significativamente maior para o grupo líquen plano. A expressão de CD8 foi maior no líquen, tanto para epitélio quanto para conjuntivo. A expressão da caspase-3 não diferiu significativamente entre os grupos, enquanto a expressão da triptase foi maior no epitélio das lesões de lúpus eritematoso. A espessura da membrana basal não exibiu diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os resultados permitem concluir que (1) a expressão imunohistoquímica de CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase-3 e triptase, bem como a espessura da membrana basal em PAS não constituem critérios definidores para diagnóstico diferencial entre lesões orais de líquen plano e de lúpus eritematoso; (2) a expressão imunohistoquímica de CD4, CD8 e CD20 é maior nas lesões orais de líquen plano do que nas de lúpus, o que sugere que, no líquen, o infiltrado seja mais rico em linfócitos; (3) a triptase está mais expressada no epitélio das lesões orais de lúpus eritematoso, enquanto o CD1a prevalece tanto em epitélio quanto em conjuntivo das lesões orais de líquen plano; (4) as lesões orais de líquen plano e lúpus eritematoso parecem diferir no que se refere ao antígeno que suscita a resposta inflamatória, mas partilham a apoptose de células epiteliais e inflamatórias em sua patogenia.

Palavras-chave: Líquen plano. Lúpus eritematoso sistêmico. Lúpus eritematoso discoide. PAS. Imunohistoquímica.

SUMMARY

Oral lesions of lichen planus and lupus erythematosus share similarities either in clinical or in histopathological appearance, which makes the differential diagnosis difficult. This study aimed to investigate differential diagnostic criteria of oral lesions of both diseases using PAS and immunohistochemistry. Patients with oral lesions of lichen planus (n = 21) and lupus erythematosus (n = 23) underwent to lesions biopsy. The clinical diagnosis was confirmed by hematoxylin and eosin stain (HE) and direct immunofluorescence. After diagnostic confirmation, the specimens were processed by PAS and immunohistochemistry. The histological images were analyzed in the Image ProPlus 5.4.1 software, quantifying the expression of CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase-3, tryptase and the thickness of basement membrane. The immunohistochemical expression of CD1a was significantly greater in the epithelium and connective tissue of lichen planus. The expression of CD4 and CD20 in the epithelium did not significantly differ between lichen planus and lupus erythematosus; however, in the connective tissue it was significantly greater for lichen. Expression of CD8 was significantly greater in both epithelium and connective tissue of lichen. The expression of caspase-3 did not significantly differ between the groups, whereas tryptase expression was significantly greater in the epithelium of lupus erythematosus. The basement membrane thickness did not show significant difference between lichen planus and lupus erythematosus. The results indicate that (1) the immunohistochemical expression of CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase-3 and tryptase as well as the thickness of basement membrane in PAS are not definite criteria for differential diagnosis of oral lesions of lichen planus and lupus erythematosus; (2) the immunohistochemical expression of CD4, CD8 and CD20 is greater in the lichen planus oral lesions than in lupus, which suggests that lichen has more intense lymphocyte infiltrate; (3) tryptase is more expressed in the epithelium of lupus oral lesions, while CD1a is more expressed either in the epithelium or in the connective tissue of lichen; (4) oral lesions of lichen planus and lupus erythematosus seem to differ for the antigen which triggers the inflammatory response, but they share apoptosis of epithelial and inflammatory cells in their pathogenesis.

Keywords: Lichen Planus. Systemic lupus erythematosus. Discoid lupus erythematosus. PAS. Immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Biópsia incisional de lesão em mucosa jugal esquerda	44
Figura 2	Processamento dos espécimes: (A) Espécime biopsiado dividido em dois fragmentos, sendo um fragmento armazenado em isopentano (B) e o outro em formalina tamponada a 10% (C) para posterior processamento por imunofluorescência direta (D) e HE (E)	44
Figura 3	Exame histopatológico em HE: (A) Líquen plano; (B) lúpus eritematoso discoide; (C) lúpus eritematoso sistêmico	45
Figura 4	Análise por imunofluorescência direta: positividade para fibrinogênio em amostra de líquen plano (A); positividade para IgM em amostra de lúpus eritematoso sistêmico (B) e lúpus eritematoso discoide (C)	47
Figura 5	Análise imunoistoquímica: marcação do anticorpo CD1a nos campos selecionados. (A) Extremidade esquerda, (B) centro e (C) extremidade direita	49
Figura 6	Recorte das áreas de epitélio e conjuntivo no programa Adobe Photoshop Elements versão 7.0 (Adobe Systems Inc, San Jose, CA, USA) para posterior quantificação. (A) Área de epitélio a ser analisada; (B) área de tecido conjuntivo	49
Figura 7	Quantificação da expressão imunoistoquímica pela técnica da segmentação semiautomatizada no Programa Image Proplus, versão 4.5.1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA)	50
Figura 8	Sítio de mensuração da espessura da membrana basal. PAS, objetiva 20X	51
Figura 9	Medida da espessura da membrana basal no programa Image Proplus versão 4.5.1 (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA). PAS, objetiva 20X	51
Figura 10	Expressão imunoistoquímica (μm^2) de CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase-3 e triptase em tecido epitelial das lesões orais de líquen plano, lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide, Porto Alegre, 2011	58
Figura 11	Expressão imunoistoquímica (μm^2) de CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase-3 e triptase em tecido conjuntivo das lesões orais de líquen plano, lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide, Porto Alegre, 2011	59

Figura 12 Espessura (μm) da membrana basal nas lesões orais de líquen plano, lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide, Porto Alegre, 2011

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1	Critérios diagnósticos de imunofluorescência direta para líquen plano e lúpus eritematoso + positivo/- negativo	47
Quadro 2	Anticorpos primários empregados, respectiva diluição e fabricante ¹ Bio SB. Inc., Santa Barbara, CA, USA ² Biosystems Newcastle Ltd., Benton Lane, Newcastle, UK	47
Tabela 1	Distribuição da amostra de acordo com os diagnósticos obtidos por exame clínico, HE e imunofluorescência direta, Porto Alegre, 2011	53
Tabela 2	Expressão imunoistoquímica de CD1a (μm^2) em epitélio e conjuntivo para os grupos líquen plano e lúpus eritematoso, Porto Alegre, 2011	54
Tabela 3	Expressão imunoistoquímica de CD4 (μm^2) em epitélio e conjuntivo para os grupos líquen plano e lúpus eritematoso, Porto Alegre, 2011	54
Tabela 4	Expressão imunoistoquímica de CD8 (μm^2) em epitélio e conjuntivo para os grupos líquen plano e lúpus eritematoso, Porto Alegre, 2011	55
Tabela 5	Expressão imunoistoquímica de CD20 (μm^2) em epitélio e conjuntivo para os grupos líquen plano e lúpus eritematoso, Porto Alegre, 2011	55
Tabela 6	Expressão imunoistoquímica de caspase-3 (μm^2) em epitélio e conjuntivo para os grupos líquen plano e lúpus eritematoso, Porto Alegre, 2011	56
Tabela 7	Expressão imunoistoquímica de triptase (μm^2) em epitélio e conjuntivo para os grupos líquen plano e lúpus eritematoso, Porto Alegre, 2011	56
Tabela 8	Expressão imunoistoquímica (μm^2) de CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase-3 e triptase em tecido epitelial das lesões orais de líquen plano, lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide, Porto Alegre, 2011	57
Tabela 9	Expressão imunoistoquímica (μm^2) de CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase-3 e triptase em tecido conjuntivo das lesões orais de líquen plano, lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide, Porto Alegre, 2011	58
Tabela 10	Espessura (μm) da membrana basal nas lesões orais de líquen plano e lúpus eritematoso, Porto Alegre, 2011	59

Tabela 11 Espessura (μm) da membrana basal nas lesões orais de líquen plano, lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide, Porto Alegre, 2011

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Bax – *Bcl-2 associated x protein* (Bcl-2 associada à proteína X)
- Bcl-2 – *B-cell lymphoma 2* (Linfoma de células B-2)
- C – componente do complemento
- CD – *cluster of differentiation* (grupamento de diferenciação)
- CK – citoqueratina
- DBCA-2 – *blood dendritic cell antigen 2* (antígeno de célula dendrítica do sangue 2)
- DC-LAMP – *dendritic cell-specific lysosome-associated membrane glycoprotein* (glicoproteína de membrana associada ao lisossoma específico de células dendríticas)
- DC-SIGN – *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin* (molécula de adesão intercelular não integrina específica para célula dendrítica)
- ELISA – *enzyme linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático)
- Fas-L – *fatty acid synthase ligand* (ligante da sintase de ácido graxo)
- Fas-R – *fatty acid synthase receptor* (receptor da sintase de ácido graxo)
- GVHD – *graft versus host disease* (doença do enxerto versus hospedeiro)
- HE – hematoxilina & eosina
- ICAM-1 – *inter-cellular adhesion molecule 1* (molécula de adesão intercelular 1)
- IFD – imunofluorescência direta
- Ig – imunoglobulina
- IL – interleucina
- MMPs – *matrix metalloproteinase* (metaloproteinases de matriz)
- PAS – *periodic acid Schiff* (ácido periódico de Schiff)
- SLEDAI – *systemic lupus erythematosus disease activity index* (índice de atividade da doença lúpus eritematoso sistêmico)
- TGF – *tumor growth factor* (fator de crescimento tumoral)
- Th1 e 2 – *T helper cell 1 and 2* (células auxiliares efectoras 1 e 2)
- TIA-1 – *T-cell intercellular antigen-1* (antígeno intercelular de células T-1)
- TNF – *tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

1 INTRODUÇÃO

O líquen plano é uma doença inflamatória crônica de etiologia desconhecida, que afeta pele, mucosa oral e genital, couro cabeludo e unhas. Evidências sugerem o papel de um desequilíbrio imunológico em que as células basais do epitélio tornam-se alvo dos linfócitos T na patogênese da doença (SKLAVOUNOU et al., 2000; SUGERMAN e SAVAGE, 2002; CARROZZO, 2008). As formas clínicas são variadas, apresentando-se como lesões estriadas e placas brancas, bem como áreas eritematosas e/ou erosivas com estrias brancas, podendo persistir por muitos anos com períodos de remissão e exacerbação (ISMAIL et al., 2007).

O lúpus eritematoso é uma condição inflamatória crônica considerada o protótipo da doença autoimune humana. A causa ainda é desconhecida, porém fatores genéticos, imunológicos, hormonais e ambientais têm sido implicados em sua patogênese. Enquanto o lúpus eritematoso sistêmico afeta vários órgãos e tem prognóstico incerto, o lúpus eritematoso discoide é uma condição menos grave e limita-se à pele e/ou a superfícies mucosas (LOURENÇO et al., 2007). A prevalência do envolvimento da mucosa nos pacientes com lúpus é variável. Segundo alguns autores, as lesões orais estão presentes em 9% a 45% dos pacientes com a forma sistêmica da doença e em 3% a 20% dos pacientes com lúpus discoide (SCHIÖDT, 1984; BURGE et al., 1989; LOURENÇO et al., 2007). A apresentação clínica das lesões orais nas formas discoide e sistêmica do lúpus eritematoso exhibe um amplo espectro, que varia entre placas brancas com eritema central circundadas por estrias esbranquiçadas, placas eritematosas tipo *favos de mel* ou lesões ulceradas (ORTEU et al., 2001; LOURENÇO et al., 2007).

As lesões orais do líquen plano e do lúpus eritematoso exibem aparência clínica similar. Os achados histopatológicos de ambas as doenças também se sobrepõem (ORTEU et al., 2001; SCULLY e CARROZZO, 2008). O quadro histopatológico dos espécimes biopsiados de líquen plano oral exhibe, na coloração por hematoxilina e eosina (HE), ortoceratose e paraceratose na superfície do epitélio, degeneração da camada de células basais, cristas epiteliais em forma de *dentes de serra* com infiltrado linfocitário em banda imediatamente abaixo, e corpos de Civatte no epitélio e na interface do conjuntivo. As características imunopatológicas são inespecíficas, apresentando a deposição de uma banda desalinhada de fibrinogênio na zona da membrana basal (KULTHANAN et al., 2007; ARISAWA et al., 2008). O lúpus eritematoso, na coloração HE, exhibe quadro

histopatológico semelhante ao do líquen plano. A hiperqueratose está presente, há alternância entre atrofia e espessamento da camada de células espinhosas, bem como degeneração da camada basal e infiltrado linfocitário subepitelial (LÓPEZ-LABADY et al., 2007).

Ao exame por HE, o lúpus exhibe infiltrado inflamatório profundo, geralmente com orientação perivascular. O emprego da coloração por ácido periódico de Schiff (PAS) também pode auxiliar na diferenciação das duas enfermidades, sendo que, no lúpus, exhibe depósitos de material positivo em placa na região da membrana basal e no edema subepitelial (NEVILLE et al., 2004). Entretanto, há quem defenda o emprego da imunofluorescência direta para o diagnóstico diferencial (SUGERMAN e SAVAGE, 2002; BERBERT e MANTESE, 2005; KULTHANAN et al., 2007). A imunofluorescência direta no tecido biopsiado das lesões de pele de lúpus eritematoso tem sido usada a fim de auxiliar no diagnóstico. As lâminas mostram deposição de imunoglobulinas, principalmente IgM e IgG, e componentes do complemento (C3) em banda desalinhada (WU e LIN, 2007; NICO et al., 2008; WALLING e SONTHEIMER, 2009). Apesar de a imunofluorescência direta ser um método complementar importante no diagnóstico diferencial das lesões orais de líquen plano e lúpus eritematoso, deve-se considerar as dificuldades de armazenamento, transporte e leitura das lâminas nessa técnica. Os espécimes biopsiados devem ser envoltos em gaze umedecida em soro fisiológico, congelados em nitrogênio líquido, ou armazenados em isopentano 99% P.A., e os fragmentos, transportados para o laboratório o mais breve possível para serem submetidos à microtomia no criostato. As lâminas são fixadas e marcadas com fluoresceína e devem ser imediatamente fotografadas, ou as imagens digitalizadas, pois a intensidade da fluorescência tende a diminuir com a exposição à luz e à temperatura ambiente. Além disso, deve-se ter o cuidado de avisar antecipadamente o laboratório que realizará a confecção e leitura das lâminas (KULTHANAN et al., 2007).

A imunistoquímica tornou-se um método diagnóstico auxiliar importante em muitas situações e tem sido amplamente empregada em pesquisa, para detecção e investigação de antígenos. Diversos trabalhos que investigam os eventos imunológicos envolvidos na patogenia do líquen plano são relatados na literatura, tanto para lesões orais como para lesões cutâneas. As investigações baseiam-se na expressão de linfócitos T CD4 e CD8 (VILLARROEL DORREGO et al., 2002; OMAR et al., 2009), na destruição da membrana basal e presença de mastócitos associados a essa destruição (ZHOU et al., 2002;

LODI et al., 2005; JAHANSHAHI e AMINZADEH, 2010), na presença de células de Langerhans (HASSÉUS et al., 2001; SANTORO et al., 2005; GUSTAFSON et al., 2007) e nos mecanismos de regulação da apoptose (SKLAVOUNOU et al., 2000; SKLAVOUNOU-ANDRIKOPOULOU et al., 2004; BASCONES-ILUDAIN et al., 2008; ABDEL-LATIF et al., 2009). Estudos imunoistoquímicos também têm quantificado células T e B, grau de apoptose e células de Langerhans no sangue circulante de pacientes com lúpus eritematoso (FUNAUCHI et al., 2001; ROBAK et al., 2004; WOUTERS et al., 2004; HAO et al., 2006), assim como em espécimes de biópsias de pele (BAIMA e STICHERLING, 2001; KUHN et al., 2006). Entretanto, as alterações em lesões orais da doença têm sido pouco relatadas na literatura (LOURENÇO et al., 2007).

O quadro histológico de qualquer tipo de lúpus eritematoso não é patognomônico; certamente, porém, é sugestivo da doença. O mesmo acontece com as lesões estriadas em mucosa jugal bilateral do líquen plano oral. Considerando-se a dificuldade de um diagnóstico diferencial preciso e as peculiaridades técnicas da imunofluorescência direta, o presente trabalho teve por objetivo investigar critérios de diagnóstico diferencial entre lesões orais de líquen plano e lúpus eritematoso por meio de exame imunoistoquímico e PAS.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LÍQUEN PLANO

O líquen plano é uma doença inflamatória mucocutânea crônica de etiologia desconhecida, que acomete adultos de meia idade à prevalência de 0,2% a 2%, sendo as mulheres afetadas em uma proporção de 3:2 em relação aos homens (NEVILLE et al., 2004). Caracteriza-se como um processo imunológico mediado por linfócitos, em que as células basais do epitélio tornam-se alvo dos linfócitos T (SKLAVOUNOU et al., 2000). O fator desencadeante é desconhecido, entretanto é evidente que recrutamento e retenção de linfócitos são requisitos do processo (REGEZI et al., 2008).

Existem várias formas clínicas de líquen plano oral, sendo a reticular a mais prevalente e caracterizada por numerosas linhas ceratóticas brancas entrelaçadas, denominadas estrias de Wickham. O líquen reticular ocorre tipicamente em padrão simétrico e acomete mais frequentemente a mucosa jugal. Lesões estriadas podem, também, ocorrer na língua e, menos comumente, na gengiva e nos lábios. O líquen em placa assemelha-se à leucoplasia, mas tem distribuição multifocal, e os sítios mais afetados são o dorso da língua e a mucosa jugal. A forma atrófica apresenta-se como lesões avermelhadas com estrias brancas muito finas, mais frequentes em gengiva inserida; pode envolver os quatro quadrantes e ser acompanhada das formas reticular e erosiva. No líquen erosivo, as lesões têm área central ulcerada coberta por placa fibrinosa ou pseudomembrana (REGEZI et al., 2008).

As características histopatológicas do líquen plano oral são típicas, porém inespecíficas, pois outras lesões, como reação liquenoide a medicamentos e ao amálgama e lúpus eritematoso podem mostrar padrão histológico semelhante. Graus variáveis de ortoceratose e paraceratose podem estar presentes na superfície do epitélio, conforme a procedência do espécime de biópsia seja de uma lesão reticular ou erosiva. A espessura da camada espinhosa também pode ser variável. As cristas epiteliais podem estar ausentes ou hiperplásicas, mas, classicamente, são pontiagudas ou têm forma de *dentes de serra*. A destruição da camada basal do epitélio (degeneração hidrópica) é evidente e acompanhada por um intenso infiltrado predominantemente de linfócitos T imediatamente abaixo. Ceratinócitos em degeneração podem ser observados em áreas do epitélio e na interface com o tecido conjuntivo e são denominados corpos coloides, citoides, hialinos ou de

Civatte (VILLARROEL DORREGO et al., 2002; NAVAS-ALFARO et al., 2003; NEVILLE et al., 2004).

A história clínica completa e o exame físico realizado por equipe multidisciplinar, investigando lesões orais, bem como de pele, unhas, couro cabeludo, mucosa genital, esofágica, laríngea e conjuntiva são suficientes para o diagnóstico clínico do líquen plano. Entretanto, a biópsia é necessária para diferenciar o líquen plano oral de outras lesões orais ulceradas ou brancas, que incluem ceratose reativa, candidíase crônica hiperplásica, displasia epitelial, lúpus eritematoso discoide, anemia e neoplasias malignas. A imunofluorescência direta é empregada para auxiliar no diagnóstico diferencial (SUGERMAN e SAVAGE, 2002; SCULLY e CARROZZO, 2008).

2.1.1 Apoptose

Apoptose é a morte celular programada que segue características bioquímicas e aspectos morfológicos específicos. Pode ser induzida por fatores intrínsecos ou extrínsecos, e esses estímulos iniciam a ativação da cascata de caspases. Durante a apoptose, DNA, RNA e proteínas são modificados pela clivagem completa de proteases, caspases e endonucleases. A apoptose ocorre durante vários processos biológicos, e as células mortas são continuamente retiradas dos tecidos por um sistema fagocitário altamente eficiente (MUNOZ et al., 2008).

A apoptose tem surgido nas últimas décadas como um importante processo biológico envolvido na fisiologia e na patogênese de algumas doenças. Os ceratinócitos apoptóticos ou corpos de Civatte do líquen plano oral são rotineiramente observados em microscopia de luz como células *encolhidas* com núcleo condensado e citoplasma eosinofílico, que foram induzidas à apoptose pelos linfócitos T ativados (LORO et al., 2005).

Estudos de microscopia de luz identificam os corpos coloides ou de Civatte como estruturas eosinofílicas presentes no epitélio e na lâmina própria. Tais estruturas localizam-se na junção dermoepitelial e, ocasionalmente, em região intraepitelial, sendo que, no líquen plano, tendem a ocorrer em agrupamentos PAS-positivos nos cortes corados por PAS e exibem fluorescência intensa para IgM na imunofluorescência direta (GRIFFIN et al., 1980).

Tanto em espécimes de líquen plano oral, quanto cutâneo, os corpos de Civatte são mais frequentes nas áreas de infiltrado linfocitário intenso. Em alguns casos, essas

estruturas apresentam-se unidas aos linfócitos, o que sugere que tenham papel importante na sequência de eventos que precedem o desenvolvimento das lesões (SHOUSA e SVIRBELY, 1977).

Considerando a possibilidade de as alterações da diferenciação epitelial observadas no líquen plano estarem associadas ao desequilíbrio entre proliferação e morte celular, Sklavounou et al. (2000) investigaram a expressão imunohistoquímica do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e de proteínas reguladoras da apoptose em espécimes de biópsia de líquen plano oral. Vinte e dois espécimes de biópsia de lesões de líquen e 10 espécimes-controle foram imunomarcados com anti-Bcl-2, anti-Bcl-x e anti-TNF- α . A expressão de Bcl-x no líquen plano foi variável, e as diferenças entre epitélio normal e epitélio da lesão foram discretas. Os ceratinócitos no líquen plano oral não demonstraram imunorreatividade para Bcl-2, o que sugere que esta proteína não esteja envolvida nas alterações epiteliais da doença. Por outro lado, o infiltrado linfocitário subepitelial exibiu intensa marcação para Bcl-2, o que pode justificar a longevidade dos linfócitos e, portanto, a persistência das reações imunológicas no local da lesão. Segundo os autores, a detecção imunohistoquímica de TNF- α no epitélio das lesões de líquen é indicativa do envolvimento da citocina na patogênese da doença.

Neppelberg et al. (2001) investigaram, por meio da expressão imunohistoquímica de FasR e FasL, a ocorrência de apoptose no epitélio e no infiltrado inflamatório de espécimes de biópsia de líquen plano oral. As células apoptóticas foram mais frequentes na região da camada basal e no infiltrado inflamatório subepitelial. Ao considerar-se somente a ocorrência intraepitelial, essas células foram mais frequentes nas áreas de destruição da camada basal. A positividade foi expressa por células pequenas e condensadas, similares aos corpos de Civatte que, sugerem os autores, poderiam ser células linfoides que migraram para a zona de células basais. As áreas de epitélio atrófico exibiram a maior frequência de células apoptóticas, tanto intra quanto subepitelial. Quando comparadas área de lesão e mucosa normal, a frequência de apoptose foi significativamente maior no epitélio das lesões de líquen plano.

Sklavounou-Andrikopoulou et al. (2004) investigaram a associação entre os níveis séricos de moléculas relacionadas à apoptose (TNF- α , sFas e Bcl-2) e a expressão clínica do líquen plano oral. As formas clínicas investigadas foram a reticular e a atrófico-erosiva. Os autores verificaram maiores concentrações de TNF- α sérico nos portadores de líquen plano, se comparados ao grupo-controle, o que sugere a participação dessa molécula como reguladora-chave na iniciação e na progressão da doença, bem como na indução dos

eventos apoptóticos que acometem o epitélio das lesões. Ainda, os níveis de sFas foram significativamente elevados nos pacientes com líquen plano, mas não foi observada sua associação com a expressão clínica da doença. Não houve diferença das concentrações de Bcl-2 entre os pacientes com líquen plano e os controles. Por outro lado, as concentrações de Bcl-2 foram menores no líquen erosivo do que no reticular, o que indica que a hiporregulação dessa molécula antiapoptótica esteja associada à ativação da doença.

Tobón-Arroyave et al. (2004) avaliaram a apoptose em espécimes de líquen plano oral e de mucosa normal por meio das técnicas de HE, imunoistoquímica (caspase-3) e microscopia eletrônica. Os autores observaram que os ceratinócitos apoptóticos em HE e a expressão de caspase-3 ocorreram nas camadas basal e suprabasal do epitélio, o que sugere que as células epiteliais em proliferação sejam alvo de destruição no líquen plano oral. Houve também intensa marcação no infiltrado linfocitário subepitelial e intraepitelial.

Abdel-Latif et al. (2009) investigaram a expressão imunoistoquímica de caspase-3 em lesões cutâneas e orais de líquen plano. A caspase-3 foi mais frequentemente expressada nas células basais e suprabasais da epiderme das lesões de líquen do que no grupo-controle. Tal achado sugere que, no líquen, a cascata de caspases seja ativada dentro das células epiteliais em proliferação. Isso indica que essas células podem ser o alvo da apoptose, embora 48% dos casos tivessem exibido apenas expressão imunoistoquímica de média intensidade. A expressão da caspase-3 foi maior no epitélio do líquen plano oral do que no cutâneo, o que indica maior frequência de células apoptóticas no primeiro. Também houve expressão imunoistoquímica de intensidade fraca da caspase-3 no infiltrado inflamatório, o que sugere baixa frequência de apoptose linfocítica.

2.1.2 Células Dendríticas

Os eventos imunológicos envolvidos na patogenia do líquen plano oral podem iniciar a partir de antígenos internos ou externos que alteram as células basais do epitélio. Estas se tornam, então, suscetíveis à resposta imunológica mediada por células, a qual envolve a ativação das células de Langerhans, os linfócitos T CD4 e T CD8, bem como a produção de citocinas no epitélio e no infiltrado de leucócitos (VILLARROEL DORREGO et al., 2002).

Hasséus et al. (2001) compararam a frequência e a distribuição de células de Langerhans e linfócitos T entre lesões orais de líquen plano e da doença do enxerto versus hospedeiro. A amostra foi constituída por 15 indivíduos, seis deles portadores de líquen,

seis portadores da doença enxerto versus hospedeiro e três controles saudáveis. Todos eles foram submetidos à biópsia de mucosa oral, e a expressão imunohistoquímica de CD1a foi investigada nos tecidos epitelial e conjuntivo dos espécimes. Células positivas para CD1a foram mais abundantes no líquen plano oral do que na doença do enxerto versus hospedeiro. Para os autores, uma vez que o infiltrado inflamatório é mais denso no líquen plano oral do que na doença do enxerto versus hospedeiro, é provável que diferenças nos mecanismos regulatórios do próprio infiltrado contribuam para a semelhança clínica das duas doenças.

Santoro et al. (2005) investigaram diferentes subtipos de células dendríticas, em espécimes de biópsia de líquen plano oral, por meio da expressão imunohistoquímica de CD1a, langerina DC-SIGN, DC-LAMP, CD123 e BDCA-2. Os autores verificaram um número significativamente maior de células CD1a⁺/langerina⁺ no epitélio e no conjuntivo dos espécimes de líquen, quando comparados com mucosa oral normal. O recrutamento de diferentes subtipos de células dendríticas, entre elas as células de Langerhans e as células dendríticas plasmocitoides, associado a um significativo aumento da frequência de células dendríticas maduras, indica que essas células possam ter papel fundamental no processo das reações imunológicas que acontecem nessa doença.

CD83 e langerina são receptores de superfície presentes nas células de Langerhans, que podem estar envolvidos na patogênese do líquen plano. Gustafson et al. (2007) investigaram a expressão imunohistoquímica de CD1a, langerina e CD83 em espécimes biopsiados de sete pacientes com diagnóstico clínico de líquen plano oral e de sete pacientes saudáveis. Embora a expressão de CD1a tenha sido detectada no epitélio e no tecido conjuntivo, tanto dos pacientes com líquen plano quanto dos controles, nos portadores de líquen o número de células marcadas foi significativamente maior. A expressão de langerina também estava presente em ambos os grupos, porém foi significativamente mais prevalente no epitélio e no conjuntivo dos pacientes com líquen plano oral. As células expressando CD83 foram detectadas principalmente no tecido conjuntivo e raramente no epitélio. O número dessas células no tecido conjuntivo foi baixo, mas significativamente maior no líquen plano, se comparado com o grupo de mucosa saudável.

2.1.3 Mastócitos

Mecanismos antígeno-específicos e inespecíficos parecem participar da patogênese do líquen plano oral. Os mecanismos antígeno-específicos incluem a apresentação de antígenos por ceratinócitos basais e a destruição de ceratinócitos por linfócitos T CD8; os inespecíficos incluem degeneração de mastócitos e ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs). Tais mecanismos podem combinar-se causando acúmulo de linfócitos T na superfície da lâmina própria, rompimento da membrana basal, migração intraepitelial de linfócitos T e apoptose de ceratinócitos. A cronicidade do líquen plano oral pode resultar, em parte, da deficiência de imunossuppressores antígeno-específicos TGF- β 2 (SUGERMAN et al., 2002; LODI et al., 2005).

Zhao et al. (1997) mapearam a população de mastócitos em 25 espécimes de biópsias de líquen plano oral e em 13 espécimes de mucosa normal. A distribuição e a densidade dos mastócitos foram avaliadas por meio de imunoistoquímica com o marcador antitriptase nas camadas superficial, média e profunda do epitélio. O número total de mastócitos foi maior no líquen plano, particularmente nas áreas da lâmina própria, sítio onde todos os mastócitos estavam degenerados e com grânulos exteriorizados dispersos. A maior densidade foi observada na camada mais superficial, não havendo diferença significativa entre as camadas média e profunda das lesões. O alvo dos produtos dos mastócitos inclui o epitélio de revestimento e as células endoteliais, que podem ser induzidas a expressar moléculas de adesão. Também tem sido sugerido que a liberação de TNF- α pelos mastócitos levaria à diminuição da espessura do epitélio. Entretanto, os autores não verificaram correlação entre densidade de mastócitos e espessura epitelial, o que implica um processo mais complexo, envolvendo múltiplos mediadores e/ou múltiplos tipos de células no controle da proliferação e destruição epitelial no líquen plano oral.

Zhou et al. (2002) investigaram o envolvimento de mastócitos na destruição da membrana basal e subsequente migração seletiva de linfócitos da lâmina própria para o epitélio em lesões de líquen plano. Espécimes de biópsia de 12 pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de líquen plano oral e de 14 indivíduos saudáveis foram submetidos a exame imunoistoquímico. No líquen plano, a marcação triptase-positiva exibiu maior número de mastócitos nas áreas de destruição do que nas áreas de continuidade da membrana basal, e ambas as regiões exibiram maior número de mastócitos do que a mucosa normal. Os achados sugerem que os mastócitos estejam envolvidos na destruição da membrana basal no líquen plano.

Juneja et al. (2006) quantificaram, por meio de PAS, mastócitos intactos e degenerados em 20 espécimes de líquen plano oral, 20 de lesão liquenoide e cinco controles. As células foram categorizadas com base na metacromasia: mastócitos intactos exibiram metacromasia intensa e grânulos densos ocultando seus núcleos, enquanto mastócitos degenerados tinham cor menos intensa e núcleos com contornos claramente definidos. No líquen plano, as áreas de destruição da membrana basal exibiram frequência de mastócitos em degeneração significativamente maior que a de células intactas.

Jahanshahi e Aminzadeh (2010) investigaram a presença de mastócitos na lâmina própria de espécimes biopsiados de líquen plano oral e de lesão liquenoide, empregando o anticorpo antitriptase. Os mastócitos foram quantificados em número total, número de células degeneradas e razão mastócitos/número total de células. Os mastócitos degenerados marcados com antitriptase não exibiram a diferença significativa esperada entre os dois grupos. Para os autores, o líquen plano oral é uma resposta imunológica aos antígenos endógenos (ceratinócitos) em que os mastócitos são recrutados secundariamente ao tecido lesado por mediadores liberados pelos linfócitos T citotóxicos.

2.1.4 Linfócitos T CD4 e T CD8

A destruição da camada basal é uma característica importante no diagnóstico histopatológico do líquen plano oral. Zhou et al. (2002) observaram que, nas regiões de continuidade da membrana basal, linfócitos T CD8 ficaram concentrados na lâmina própria e, ocasionalmente, tiveram localização intraepitelial. Entretanto, nos sítios cuja membrana basal estava rompida, a camada basal exibiu aglomerados significativamente mais numerosos dessas células. A frequência de linfócitos T CD4 não diferiu significativamente entre as áreas de destruição e de continuidade da membrana basal, o que sugere que essas células não migrem através da membrana. Entretanto, o rompimento desta última facilita a migração de linfócitos T CD8 para o interior do epitélio.

Villarroel Dorrego et al. (2002) verificaram elevadas contagens de linfócitos T CD4 e CD8 em lesões de líquen plano oral. O infiltrado dessas células era associado à membrana basal, com uma relação CD4/CD8 de 0,9, o que indica maior proporção de linfócitos T citotóxicos. Essa proporção pode estar associada à progressão da doença, uma vez que lesões recentes exibem maior concentração de linfócitos T CD4 que, por sua vez, promovem o afluxo de linfócitos T CD8 observados nas lesões mais antigas.

2.1.5 Linfócitos B

Omar et al. (2009) investigaram a expressão imunoistoquímica de CD20 em dez espécimes de lesões orais de líquen plano e em dez espécimes de estomatite juncional crônica. A imunomarcagem positiva para CD20 foi aproximadamente três vezes mais intensa na estomatite juncional crônica do que no líquen plano. Segundo os autores, enquanto o líquen plano é uma reação inflamatória mediada por linfócitos T, a estomatite juncional crônica mostrou abundância de linfócitos B. As diferenças do padrão de composição e distribuição do infiltrado linfocitário sugerem que as duas doenças sejam entidades distintas.

2.1.6 Membrana Basal

Os ceratinócitos contribuem para a estrutura da membrana basal do epitélio pela secreção de colágeno IV e laminina V, sendo que sua apoptose e a destruição da membrana basal parecem estar envolvidas na patogênese do líquen plano. Isto é, a destruição da membrana basal pode provocar a apoptose dos ceratinócitos, e os ceratinócitos apoptóticos parecem incapazes de reparar o dano à membrana basal. Assim, esse mecanismo cíclico torna-se o responsável pela cronicidade da doença (ROOPASHREE et al., 2010). Uma vez destruídos, os ceratinócitos da camada basal perdem sua continuidade, o que configura a degeneração da camada basal e facilita a invasão de células inflamatórias no epitélio, principalmente linfócitos T CD8 (RIBEIRO et al., 2010).

Juneja et al. (2006) avaliaram, por meio de HE e PAS, a espessura e a vascularização da membrana basal em 20 casos de líquen plano oral e 20 lesões liquenoides orais. A coloração por PAS exibiu, com clareza, no líquen plano oral, áreas de membrana basal como banda linear contínua e delgada com ocasionais falhas e numerosos cordões estendendo-se, em alguns casos, para dentro do tecido conjuntivo. Entretanto, em outros, mostrou espessamento focal ou descontinuidade da membrana basal. Essas alterações também foram observadas em alguns casos do grupo de lesões liquenoides, mas distribuídas de forma focal. A espessura da membrana basal foi significativamente maior no grupo do líquen plano oral do que nas lesões liquenoides. A frequência de vascularização no infiltrado subepitelial em áreas de ruptura da membrana basal foi significativamente maior no grupo líquen plano.

2.1.7 Imunofluorescência Direta

Para Firth et al. (1990), a imunofluorescência direta tem facilitado o diagnóstico de algumas doenças dermatológicas com manifestação oral, como o líquen plano, porém seu uso é pouco documentado. Com o objetivo de reforçar a importância desse exame no diagnóstico do líquen plano oral, os autores compararam características clínicas, histopatológicas e achados de imunofluorescência direta em 165 espécimes com diagnóstico clínico de líquen plano oral. O critério diagnóstico definidor de líquen plano na imunofluorescência direta foi a presença de fibrinogênio em padrão fibrilar na zona da membrana basal e a ausência de C1q, IgA, IgG e IgM, exceto nos corpos de Civatte. Houve marcação ocasional com C3, mas este não foi considerado critério definidor. Nesse estudo, 138 biópsias (84%) com diagnóstico de líquen plano oral por HE tiveram confirmação pela imunofluorescência direta. Em nove casos (5,9%) cujo diagnóstico por HE foi inconclusivo, o diagnóstico de líquen foi confirmado pela imunofluorescência associada às características clínicas, e, em outros nove casos, o diagnóstico de líquen foi excluído mediante achados histopatológicos duvidosos e negatividade da imunofluorescência direta. Em 11,5% dos casos, a imunofluorescência direta proporcionou informações adicionais essenciais para a definição diagnóstica. Segundo os autores, é recomendável que essa técnica seja incluída nos exames de rotina usados para diagnóstico do líquen plano oral.

Kulthanan et al. (2007) submeteram espécimes de biópsia de líquen plano oral e cutâneo de 72 pacientes à imunofluorescência direta. Os autores observaram depósitos imunorreagentes na junção dermoepitelial e nos corpos de Civatte, respectivamente, em 53% e 60% dos casos. Cem por cento dos casos foram positivos para fibrinogênio na junção dermoepitelial. Os imunorreagentes para C3, IgG, IgM e IgA, em ordem decrescente de significância, também foram expressados na junção dermoepitelial. IgM foi observada em 93% dos corpos citoides, seguida de C3, fibrinogênio, IgA e IgG. De acordo com os resultados, a taxa de positividade da imunofluorescência direta no líquen plano é de 75%, e a deposição de fibrinogênio na junção dermoepitelial, que é o melhor indicador isolado do diagnóstico de líquen plano, foi verificada em 53% dos casos avaliados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os achados histopatológicos de pele e mucosa oral.

2.2 LÚPUS ERITEMATOSO

O lúpus eritematoso manifesta-se sob duas formas reconhecidas: a sistêmica, que é a forma aguda, e a discoide, que é a forma crônica, sendo que ambas podem ter manifestações orais. O lúpus eritematoso sistêmico é de particular importância em função do profundo impacto que tem em vários órgãos. O lúpus eritematoso discoide é a forma menos agressiva, afeta predominantemente a pele e, raramente, progride à forma sistêmica (REGEZI et al., 2008).

2.2.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico é o protótipo da doença autoimune, caracterizado pela produção de autoanticorpos aos componentes nucleares das células (HAO et al., 2006). Sua causa é desconhecida, e o diagnóstico difícil em estágio precoce, porque, frequentemente, o quadro clínico é vago e inespecífico, com períodos de remissão ou inatividade. Podem ser necessários de alguns meses a vários anos para que o diagnóstico seja definido. É uma doença grave que acomete, além da mucosa oral, também o fígado, as articulações, a pele e os sistemas cardiovascular, nervoso e gastrointestinal. As mulheres são afetadas de oito a dez vezes mais que os homens (MOREIRA e CARVALHO, 2001; NEVILLE et al., 2004; POWERS, 2008).

As lesões orais do lúpus eritematoso sistêmico desenvolvem-se em 9% a 45% dos pacientes e afetam, geralmente, palato, mucosa jugal e gengiva. Manifestam-se, algumas vezes, como áreas liquenoides, não patognomônicas, e o diagnóstico deve ser definido por exames laboratoriais. Ao exame físico, as lesões apresentam-se como áreas de erosão extensas e dolorosas ou úlceras circundadas por zonas avermelhadas ou esbranquiçadas. O envolvimento do vermelhão do lábio inferior, denominado *queilite por lúpus*, é observado em alguns casos. A média de idade, por ocasião do diagnóstico, é de 31 anos. Os achados comuns incluem febre, perda de peso, artrite, fadiga e mal-estar geral. Em 40% a 50% dos pacientes afetados, desenvolve-se um exantema característico com aspecto de asa de borboleta nas regiões zigomática e nasal. Também são envolvidos pescoço, ombros, braços e dedos. As lesões podem apresentar prurido ou ardência, bem como áreas de hiperpigmentação, que são intensificadas pela exposição à luz solar. As manifestações generalizadas da doença sistêmica são atribuíveis ao comprometimento de vários órgãos, incluindo rim e coração. Os rins são afetados em 40% a 50% dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Essa complicação pode levar à falência renal e constitui o aspecto

mais significativo da doença. No envolvimento cardíaco, a pericardite é a complicação mais frequente. O envolvimento tecidual extenso e a natureza das lesões levaram à inclusão do lúpus eritematoso sistêmico no grupo das *doenças do colágeno*, que inclui também a febre reumática, a artrite reumatoide, a poliarterite nodosa, a esclerodermia e a dermatomiosite (MOREIRA e CARVALHO, 2001; NEVILLE et al., 2004; LOURENÇO et al., 2006; POWERS, 2008).

2.2.2 Lúpus Eritematoso Discoide

O lúpus eritematoso discoide é caracteristicamente observado em mulheres de meia-idade. As lesões aparecem na pele, mais comumente na face e no couro cabeludo, e exacerbam à exposição solar. Com o tempo, podem cicatrizar espontaneamente e aparecer em outro local. Geralmente, o processo de cicatrização resulta em atrofia cutânea com formação de cicatrizes e hipo ou hiperpigmentação. Lesões orais também são frequentes e, ao exame clínico, assemelham-se às lesões do líquen plano oral, porém são usualmente acompanhadas de lesões cutâneas e afetam aproximadamente 25% dos pacientes. A mucosa jugal, o vermelhão dos lábios e a gengiva são os locais mais frequentemente afetados. Ao exame clínico, observam-se áreas eritematosas ou ulceradas com estrias brancas irradiadas na periferia. O diagnóstico com base na aparência clínica das lesões orais pode não ser evidente, e a progressão do lúpus discoide para o sistêmico, embora pouco provável, é possível (NEVILLE et al., 2004; REGEZI et al., 2008).

2.2.3 Lesões Orais no Lúpus Eritematoso

As lesões de mucosa oral podem ocorrer tanto no lúpus eritematoso sistêmico como no lúpus eritematoso discoide. As lesões típicas do discoide exibem atrofia central, pequenas placas ceratóticas com bordas elevadas, estrias irradiadas e telangiectasias. Podem ocorrer primariamente na mucosa jugal e labial, na mucosa alveolar e no vermelhão do lábio, porém o espectro de apresentação é amplo e algumas lesões podem assemelhar-se ao líquen plano e mostrar estrias e erosões. Portanto, o diagnóstico de lúpus eritematoso discoide pode ser difícil, principalmente se o envolvimento sistêmico é limitado. As características histopatológicas das lesões orais são variáveis e de difícil distinção do líquen plano. As lesões são caracterizadas por hiperkeratose com tampões de ceratina, atrofia epitelial ou alternância de atrofia com hiperplasia e hiperplasia

pseudoepiteliomatosa, células epiteliais multinucleadas com três ou mais núcleos, degeneração hidrópica da camada basal, infiltrado linfocitário no tecido conjuntivo, profundo e/ou perivascular, e zona de membrana basal com depósitos PAS-positivos (SCHIÖDT, 1984; FARTHING e SPEIGHT, 2006).

As lesões orais do lúpus eritematoso têm sido amplamente descritas, porém sem unanimidade sobre sua exata natureza e correta classificação (SCHIÖDT et al., 1978). A apresentação mais frequente do lúpus eritematoso crônico é a lesão oral discoide, com área bem-delimitada, arredondada ou irregular e avermelhada, que pode ser atrófica ou ulcerada, com estrias ceratóticas irradiadas e telangiectasias. Muitos pacientes apresentam lesões cutâneas simultaneamente, porém não são raras as manifestações exclusivamente mucosas, bem como lesões isoladas no palato. As lesões de lúpus eritematoso discoide têm distribuição assimétrica na cavidade oral, que pode ser uma característica importante no diagnóstico diferencial de outras lesões similares ao exame clínico, como as do líquen plano, que são, quase sempre, simétricas. O lábio é envolvido frequentemente, e as lesões tendem a expandir-se do vermelhão do lábio para a pele perioral, o que dificulta a definição do limite entre essas estruturas anatômicas. Tal característica é muito útil na diferenciação entre lúpus eritematoso e líquen plano (NICO et al., 2008).

2.2.4 Apoptose

Em condições normais, as células apoptóticas são rapidamente removidas pelos fagócitos, entretanto, no lúpus, o processo de apoptose e/ou remoção do material apoptótico pode estar desregulado. A apoptose altera os autoantígenos nucleares que são expostos ao sistema imunológico e reconhecidos como antígenos não-próprios, atuando como um sinal de perigo. Juntas, a apoptose e a remoção do material apoptótico são processos-chave na etiologia do lúpus eritematoso sistêmico. Dependendo do contexto, a fagocitose de células apoptóticas pode liderar uma resposta pró-inflamatória ou anti-inflamatória, que é decisiva no desenvolvimento da autoimunidade (MUNOZ et al., 2008).

Baima e Sticherling (2001) investigaram o envolvimento da apoptose na patogênese do lúpus eritematoso cutâneo. A expressão imunoistoquímica dos antígenos Fas, Bcl-2 e Bax foi avaliada em 31 espécimes cutâneos de lúpus eritematoso e em espécimes de pele normal. Segundo os autores, a expressão diminuída de Bcl-2 e a subsequente apoptose dos ceratinócitos representam o início da formação das lesões específicas do lúpus eritematoso. O estudo não demonstrou associação entre a expressão de Bax nos ceratinócitos da

epiderme e o lúpus. Na tentativa de explicar a patogênese do lúpus eritematoso cutâneo, os autores sugerem que, após a irradiação ultravioleta ou outra agressão à pele em indivíduos geneticamente predispostos, ocorre inflamação local com liberação de citocinas, TNF, INF- γ , aumento de antígenos ICAM-1 e Fas nos ceratinócitos, vasodilatação, acúmulo de linfócitos T e macrófagos na derme e intensa apoptose na derme e na epiderme. O evento central nesse estágio poderia ser a diminuição da expressão de Bcl-2 na camada basal da epiderme, que torna os ceratinócitos suscetíveis à apoptose dependente de Fas. A pesquisa mostrou que células apoptóticas expressam antígenos endoplásmico e endonuclear em sua superfície, os quais poderiam induzir a produção de autoanticorpos, formação de depósitos de imunoglobulinas e, finalmente, liderar a perpetuação da inflamação local e o dano da epiderme por apoptose.

Funauchi et al. (2001) avaliaram a apoptose dos linfócitos T *helper* no sangue periférico de 38 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, sendo 26 deles portadores de lúpus inativo e 12 com a doença em atividade. Os resultados foram comparados aos do grupo-controle composto por 11 indivíduos saudáveis. A atividade da doença foi verificada de acordo com critérios recomendados pelo Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-estar do Japão, e pelo índice SLEDAI (*systemic lupus erythematosus disease activity index* / índice de atividade da doença lúpus eritematoso sistêmico). Para os autores, as células apoptóticas ocorrem em maior quantidade no sangue periférico dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, sendo os linfócitos B e os linfócitos T CD4 as mais propensas a sofrer apoptose. Tal achado poderia estar associado com a ativação dos linfócitos T, com a disfunção de células Th1 como a redução da produção de IL-2 ou INF- γ . Além disso, a remoção por apoptose dessas células ativadas pode prevenir a superativação ou a autorreação dos linfócitos T no lúpus eritematoso.

Hao et al. (2006) investigaram a relação do antígeno Fas solúvel (sFas) com o dano causado aos órgãos e tecidos no lúpus eritematoso sistêmico. Os níveis de sFas foram quantificados por meio de ELISA em 40 pacientes com lúpus eritematoso em diferentes estágios de dano aos órgãos e tecidos e comparados a 15 controles. O SLEDAI também foi avaliado. O nível de sFas foi significativamente maior tanto nos pacientes com menor quanto naqueles com maior atividade da doença do que no grupo-controle. O grupo com maior atividade do lúpus também teve valor significativamente mais alto quando comparado com o grupo de menor atividade. O estudo indica que o nível elevado de sFas no soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico pode estar fortemente associado aos danos causados aos rins, sistema nervoso central e serosa.

Dhir et al. (2009) avaliaram, por meio de citometria de fluxo, a apoptose de linfócitos T em 41 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e em 20 controles. Os pacientes com lúpus eritematoso tiveram proporção significativamente maior de linfócitos T apoptóticos e menor frequência de linfócitos T que o grupo-controle. Já os pacientes com doença ativa tiveram maior índice de apoptose das células T do que os pacientes com a doença inativa. Os portadores de lúpus tiveram frequência reduzida de linfócitos T, sendo que houve correlação negativa entre frequência e apoptose dessas células. Segundo os autores, os achados sugerem evidências de uma relação causal entre apoptose de linfócitos e lúpus eritematoso sistêmico.

2.2.5 Células Dendríticas

As células dendríticas induzem e regulam a resposta imunológica (PALUCKA et al., 2002) e também exercem papel importante na indução de doenças autoimunes (ROBAK et al., 2004). As alterações imunológicas sistêmicas e a presença de linfócitos T e B autorreativos sugerem que o lúpus eritematoso seja conduzido por alterações das células dendríticas (PALUCKA et al., 2002).

Robak et al. (2004) quantificaram as células dendríticas e seus subtipos mielóide (1 e 2) e plasmocitóide, bem como linfócitos T CD4, T CD8, linfócitos B (CD19) e células *natural killers* CD56 em 53 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e em 33 indivíduos sem a doença. Para tanto, os autores empregaram imunofenotipagem por citometria de fluxo em amostras de sangue circulante. Os subtipos foram comparados também com o grau de atividade do lúpus eritematoso sistêmico. O número de células dendríticas, tanto mielóides quanto plasmocitóides, foi significativamente menor nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico do que no grupo-controle. A contagem de células dendríticas plasmocitóides foi menor nos pacientes com lúpus em atividade do que no grupo de pacientes com doença inativa. Ambos os grupos de pacientes exibiram número similar tanto para as células dendríticas mielóides do subtipo 1 quanto para o subtipo 2. Entre os portadores de lúpus, a flutuação na contagem foi mais significativa nas células dendríticas plasmocitóides que nas mielóides. Para os autores, o número reduzido de células dendríticas no sangue circulante dos pacientes com lúpus eritematoso poderia ser causado pela migração acelerada dessas células para os locais de inflamação. Outras justificativas para tal achado seriam o tratamento prolongado com prednisona, administrada na maioria dos pacientes com lúpus ou, ainda, o aumento dos índices de apoptose entre as células

dendríticas. Segundo os autores, a correlação positiva entre o número de células dendríticas e de linfócitos T CD4 e CD8 e linfócitos B CD19 comprova a interação dessas células e sua influência na patogênese do lúpus eritematoso sistêmico.

2.2.6 Mastócitos

O lúpus eritematoso sistêmico é uma doença do tecido conjuntivo em que ocorre a deposição de imunocomplexos. A urticária é uma manifestação cutânea relativamente comum nos pacientes com lúpus, o que poderia sugerir o envolvimento dos mastócitos na patogênese da doença. Como os mastócitos situam-se em posição adjacente às células endoteliais e são conhecidos por serem ativadas por imunocomplexos, teoricamente poderiam ser os mediadores do dano aos tecidos por autoanticorpos e imunocomplexos. Embora considerações teóricas suportem a ideia de que os mastócitos contribuam para as lesões teciduais no lúpus eritematoso, as evidências clínicas para tal ainda são deficientes (EKLUND, 2007).

2.2.7 Linfócitos T CD4 e T CD8

Wouters et al. (2004) compararam, por meio de citometria de fluxo, a distribuição de linfócitos no sangue circulante de 23 pacientes com lúpus eritematoso discoide, 25 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e 38 pacientes-controle saudáveis. Os valores de linfócitos T CD4 foram similares nos pacientes com lúpus e nos controles, mas os linfócitos T CD8 estavam diminuídos em ambos, tanto em valores absolutos quanto relativos. Os autores acreditam que a migração de linfócitos do sangue periférico para as lesões inflamatórias da pele explicam as contagens de linfócitos verificadas no sangue circulante. Tanto no lúpus eritematoso sistêmico como no lúpus eritematoso discoide houve diminuição da contagem de linfócitos T CD8. Entretanto, em função da significativa diminuição de células T CD4 no lúpus eritematoso sistêmico, a proporção das T CD8 foi maior neste do que no discoide. Para os autores, tais achados fornecem evidência da ativação sistêmica da imunidade celular no lúpus eritematoso discoide. Enquanto no lúpus sistêmico a ativação do sistema imunológico resulta no aumento do nível de autoanticorpos circulantes e de imunocomplexos com doença inflamatória sistêmica grave, no lúpus eritematoso discoide mecanismos efetores inflamatórios são confinados à pele e mediados por células *natural killers* e linfócitos T citotóxicos que podem migrar da circulação para o local da inflamação.

2.2.8 Linfócitos B

A clássica concepção de que, na biologia da resposta imunológica a infecções e antígenos próprios, os linfócitos B promovem a imunidade primariamente pela produção de anticorpos está longe de ser definitiva. Muitos estudos sugerem que os linfócitos B têm outras funções, além da produção de anticorpos, que contribuem com a autoimunidade. Essas células participam da ativação das células T e do desenvolvimento da arquitetura linfóide, regulando as células dendríticas e a função de algumas linhagens de células T por meio da produção de citocinas. Embora a lesão imunológica específica responsável pela autoimunidade do lúpus permaneça desconhecida, estudos sugerem que a hiperatividade dos linfócitos B seja a explicação para o processo da doença (RENAUDINEAU et al., 2004).

Em meio às complexas alterações da resposta imunológica na autoimunidade sistêmica, é importante lembrar que algumas alterações-chave dos linfócitos B parecem contribuir para o processo, ou de forma causal, ou como um intensificador da doença. Neste sentido, não está claro se as alterações dos linfócitos B no lúpus eritematoso são intrínsecas à doença ou secundárias ao ambiente desregulado que lhe é característico (DÖRNER et al., 2009).

2.2.9 Membrana Basal

O lúpus eritematoso discoide exhibe, ao exame histológico, espessamento da membrana basal visível nas secções coradas por HE, mas que pode ser visualizado de forma mais adequada na coloração por PAS (AL-REFU e GOODFIELD, 2011).

Karjalainen e Tomich (1989) investigaram critérios histopatológicos diferenciais entre lúpus eritematoso e líquen plano oral, por meio das colorações HE, PAS e método aldeído-fucsina de Gomori. Na coloração de PAS, os autores analisaram a espessura da membrana basal e verificaram que o lúpus eritematoso apresentava depósitos espessos e irregulares que se estendiam ao tecido conjuntivo, enquanto no líquen plano a zona de membrana basal era bem-definida, fina, contínua e de cor magenta brilhante.

Shahidullah et al. (1995) avaliaram a espessura da zona de membrana basal de espécimes de pele de pacientes com lúpus eritematoso discoide. Dos 100 casos estudados, 66 apresentaram espessamento da membrana basal, e a deposição de imunorreagentes, avaliada por imunofluorescência direta, ocorreu em 62,1%, mas não diferiu

significativamente entre as lesões com e sem espessamento. Foram analisados seis casos em microscopia eletrônica e todos mostraram duplicação da lâmina basal.

2.2.10 Imunofluorescência Direta

Jonsson et al. (1984) observaram que 100% dos espécimes de lesões orais de lúpus eritematoso sistêmico exibiram positividade para IgM, e 70%, para IgG e fibrinogênio. A marcação imunofluorescente positiva nos corpos de Civatte foi a menos frequente. Os depósitos imunofluorescentes tiveram um padrão granular ou levemente homogêneo na zona da membrana basal.

Opiniões divergentes são relatadas na literatura no que diz respeito à sensibilidade do teste da banda lúpica (*lupus band test*) e o tipo de imunorreagentes que podem estar envolvidos nas lesões de lúpus eritematoso discoide. Com o objetivo de verificar a aplicabilidade da imunofluorescência direta, bem como a prevalência dos depósitos imunorreagentes e sua comparação com achados histopatológicos, Shahidullah et al. (1995) avaliaram 100 pacientes com lúpus eritematoso discoide. Os pacientes eram portadores de lesões não tratadas com mais de quatro semanas de duração, sem evidência de envolvimento sistêmico, e o diagnóstico foi feito pelas características clínicas. Todos os pacientes foram submetidos à pesquisa de fator antinuclear (FAN) no momento do diagnóstico, sendo que 25% tiveram resultado reagente. Os autores não encontraram relação significativa entre a positividade da imunofluorescência direta e a duração das lesões. Três ou mais características histopatológicas foram observadas em 71% dos casos, dos quais 47% apresentaram positividade na imunofluorescência direta. Os 29% restantes apresentaram menos de três características, sendo que 42% tiveram positividade na imunofluorescência. Das lesões com positividade na imunofluorescência direta, as de couro cabeludo foram as que tiveram maior prevalência de imunomarcção (82,6%), seguidas pelas de face (56,4%), braço (55,6%), antebraço (50%) e outras partes do corpo (22%). C1q foi o imunorreagente mais prevalente na zona da membrana basal (71,7%), seguido por IgM (62,1%), IgG (50,3%), C3 (48,7%), fibrinogênio (30,6%) e IgA (10,3%). Os autores verificaram positividade em 58% dos casos analisados por imunofluorescência. Segundo eles, o assunto requer novas pesquisas que empreguem critérios uniformes na seleção da amostra e levem em consideração diferenças raciais, exposição solar e fatores genéticos dos pacientes.

O padrão de fluorescência do tipo *poeira* foi descrito por Lipsker et al. (1998), que avaliaram, por imunofluorescência direta, 4.374 espécimes de biópsia de pele coletados em um período de sete anos. O referido padrão foi observado em 66 espécimes de biópsia de 60 pacientes, que foram chamados e reavaliados. Entre os pacientes reavaliados, 44 tinham lúpus eritematoso (32 com lúpus eritematoso cutâneo subagudo, 10 com lúpus eritematoso sistêmico e dois com lúpus eritematoso discoide), sete pacientes tinham doença do tecido conjuntivo (dois, esclerose sistêmica; um, dermatomiosite; um, doença mista do tecido conjuntivo; um, síndrome de Sjögren; e dois, doença inespecífica do tecido conjuntivo). Os outros nove pacientes tinham vasculite leucocitoclástica (dois), líquen plano (um), doença de Waldenstrom's (um), eczema (um), prurido (um), urticária (um), erupção por uso de drogas (um) e um com diagnóstico inconclusivo. Para os autores, a marcação tipo *poeira* consiste em uma fluorescência muito fina e granular de imunoglobulina e/ou componentes de complemento dispersa por toda a epiderme e no infiltrado celular. Esse padrão recebe pouca atenção, porque raramente é percebido, sendo, muitas vezes, classificado como artefato. Ainda, os estudos de imunofluorescência direta no lúpus eritematoso são focados na deposição de imunoglobulinas na junção dermoepidérmica. O padrão fluorescente das partículas tipo *poeira* é altamente sugestivo de doenças do tecido conjuntivo, porém não é específico para lúpus eritematoso cutâneo subagudo (LIPSKER et al., 1998).

Berbert e Mantese (2005) descreveram as variadas formas de manifestação clínica do lúpus eritematoso cutâneo, relacionando-as a achados histopatológicos de imunofluorescência direta e sorológicos. Os autores revisaram a literatura e compararam os achados de imunofluorescência dos diferentes tipos de lúpus eritematoso descritos. Os doentes com colagenoses têm um fenômeno autoimune que resulta na produção de anticorpos contra diversos antígenos encontrados em todos os componentes celulares (nucleares, citoplasmáticos e de moléculas da membrana celular). Para os autores, a eficácia do diagnóstico de lúpus eritematoso depende da avaliação de quatro critérios: clínico, histopatológico, imunofluorescência direta e reações sorológicas.

Lourenço et al. (2006) investigaram as lesões orais em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e cutâneo crônico. Os autores descreveram os aspectos clínicos, as principais características histopatológicas das lesões biopsiadas e o estágio de maturação do epitélio por meio do padrão de expressão de citoqueratinas (CK). Ao exame histológico, as lesões exibiram mucosite liquenoide com infiltrado perivascular e espessamento da camada basal. O perfil de citoqueratina mostrou epitélio hiperproliferativo, com expressão de CK5/6 e CK14 em todas as camadas de epitélio, CK16 em toda a suprabasal e CK10

apenas na camada de células espinhosas nas lesões orais de lúpus eritematoso. Segundo os autores, os achados devem ser investigados em relação às citocinas inflamatórias para melhor entendimento das interações de ceratinócitos e da resposta inflamatória dessa complexa doença.

2.3 LÍQUEN PLANO VERSUS LÚPUS ERITEMATOSO

Ao exame clínico, as lesões orais do líquen plano são características, mas em alguns casos as lesões em placa podem assemelhar-se à leucoplasia, principalmente a verrucosa proliferativa; e as lesões estriadas, com ou sem áreas erosivas, podem confundir-se com lúpus eritematoso (SCULLY e CARROZZO, 2008).

Ao exame histológico, as lesões de lúpus eritematoso têm características similares às do líquen plano e podem apresentar acantose, paraceratose, ortoceratose, degeneração liquefativa da camada basal, hialinização subepitelial e infiltrado inflamatório crônico. Estudos de imunofluorescência direta podem fornecer informações adicionais ao diagnóstico, sendo que IgG e IgM são as imunoglobulinas mais prevalentes na zona de membrana basal no lúpus eritematoso (JONSSON et al., 1984; BRENNAN et al., 2005).

Hiperortoceratose e hiperparaceratose ocorrem tanto no lúpus eritematoso discoide quanto no líquen plano, e o padrão de ceratinização não tem valor no diagnóstico diferencial das duas doenças. Entretanto, tampões de ceratina e pérolas ceratóticas estão associados ao diagnóstico do lúpus eritematoso discoide. A distribuição do infiltrado inflamatório também pode ser importante no diagnóstico diferencial. Enquanto no lúpus discoide o infiltrado apresenta-se focal e profundo e de localização perivascular, no líquen plano ocorre em banda subepitelial (SCHIÖDT, 1984).

Karjalainen e Tomich (1989) investigaram critérios histopatológicos diferenciais entre lúpus eritematoso e líquen plano oral. Dezessete espécimes de biópsias de lesões orais de cada uma das enfermidades foram avaliados à microscopia de luz. Os achados histopatológicos diferiram significativamente entre lúpus eritematoso e líquen plano. No lúpus eritematoso foram observados: vacuolação de ceratinócitos, depósitos subepiteliais PAS-positivos, edema na lâmina própria, espessamento PAS-positivo das paredes dos vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório. No líquen plano, as características mais prevalentes foram anisocitose e anisonucleose das células epiteliais, atrofia das cristas epiteliais, hipercromatismo nuclear das células epiteliais e perda da aderência intercelular no epitélio. As características histopatológicas prevalentes nas duas doenças consistem em

infiltrado linfocitário na lâmina própria, degeneração hidrópica das células da camada basal, transmigração de leucócitos no epitélio e deposição de material PAS-positivo nas paredes dos vasos sanguíneos.

Hussein et al. (2008) avaliaram o infiltrado inflamatório em 19 casos de líquen plano, 12 casos de lúpus eritematoso discoide e 20 espécimes de pele normal por meio de imunistoquímica, empregando os anticorpos CD68, CD3, CD20, granzima-B e TIA-1. Houve número significativamente maior de células inflamatórias (linfócitos, histiócitos e plasmócitos) no líquen e no lúpus do que na pele normal. A densidade de células CD20-positivas foi maior nas áreas perivasculares do que na junção dermoepitelial. Os autores encontraram variação na composição e distribuição do infiltrado imunológico entre líquen e lúpus, com maior densidade de CD3 e granzima-B no líquen plano, quando comparado com o lúpus eritematoso discoide; e alta densidade de imunomarcagem de CD20 no lúpus discoide, se comparado com o líquen plano, tanto em localização perivascular como na junção dermoepitelial. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa na distribuição e densidade de células CD68 entre líquen e lúpus. No lúpus eritematoso discoide, o infiltrado de células inflamatórias teve distribuição perivascular com adenocentricidade.

Segundo Daniels e Quadra-White (1981), a imunofluorescência direta pode ser um critério adicional no diagnóstico das lesões ulcerativas crônicas ou erosivas da mucosa oral, como líquen plano e lúpus eritematoso. Em seu trabalho, dos 31 espécimes de líquen plano oral que reagiram com antifibrinogênio, 30 apresentaram fluorescência positiva intensa na zona da membrana basal e numerosas extensões irregulares na lâmina própria superficial. Todos os seis pacientes com lesões orais de lúpus eritematoso apresentaram uma faixa fluorescente contínua, espessa e granular na região da membrana basal com anti-C3, isolado ou associado a uma ou mais anti-imunoglobulinas. Porém, duas amostras tiveram fluorescência positiva para fibrinogênio, sendo uma com a mesma intensidade de fluorescência do líquen plano oral.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar critérios de diagnóstico diferencial entre lúpus eritematoso e líquen plano oral por meio de imunoistoquímica e PAS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Comparar a expressão imunoistoquímica dos marcadores antígeno-específicos CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase-3 e triptase entre lesões orais de líquen plano e de lúpus eritematoso.

3.2.2 Comparar a espessura da membrana basal entre os espécimes orais de líquen plano e de lúpus eritematoso, por meio de PAS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O presente estudo classifica-se como descritivo comparativo sob o paradigma quantitativo (CAMPBELL e STANLEY, 1979).

4.2 APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

O protocolo da presente pesquisa foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob o protocolo 0056/08 (Anexo A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da mesma Universidade, sob o protocolo 08/4400 (Anexo B).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi composta por pacientes do sexo feminino, adultas, com idades entre 26 e 85 anos, portadoras de lúpus eritematoso ou de líquen plano oral, cadastradas no Serviço de Estomatologia e no Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas-PUCRS, que foram distribuídas em dois grupos:

- a) Grupo 1: 21 pacientes com diagnóstico de líquen plano oral confirmado por HE e imunofluorescência direta;
- b) Grupo 2: 23 pacientes com diagnóstico de lesões orais de lúpus eritematoso confirmado por HE e imunofluorescência direta.

O cálculo da amostra foi obtido pelo software WinPepi, versão 5.6, baseado em Hasséus et al. (2001) e Robak et al. (2004), com poder estatístico de 80% e nível de significância de 5% e indicou a necessidade de um “n” de 18 pacientes para cada grupo.

4.3.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídas na amostra as pacientes que preencheram os critérios diagnósticos de líquen plano e de lúpus eritematoso (EISEN et al. 2005; SCULLY e CARROZZO, 2008; BALTACI e FRITSCH, 2009; TSUCHIDA, 2009). O diagnóstico clínico foi confirmado pelo exame histopatológico na coloração de HE e por imunofluorescência direta.

Os critérios clínicos para inclusão das pacientes com líquen plano oral foram a presença de lesões reticulares de cor branca (estrias de Wickham) em mucosa jugal bilateral, bem como sorologia negativa para autoanticorpos antinúcleo (FAN), anti-DNA, anti-SSA, anti-SSB, anticardiolipinas (IgG e IgM) e VDRL.

Os critérios clínicos para inclusão das pacientes com lúpus eritematoso discoide foram lesões com área central eritematosa ulcerada ou atrófica, circundada por finas estrias brancas irradiadas, apresentando distribuição assimétrica na cavidade oral (NICO et al., 2008) em pacientes que não satisfizessem os critérios diagnósticos de lúpus eritematoso sistêmico e de líquen plano oral.

O diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico foi estabelecido quando as lesões orais eram acompanhadas de quatro ou mais critérios determinados pela Associação Americana de Reumatologia, simultânea ou periodicamente, durante qualquer intervalo de observação (critérios revisados para a classificação de lúpus eritematoso sistêmico - 1982 e 1997) (Anexo C) (TAN et al., 1982; HOCHBERG, 1997) e foi confirmado por avaliação de médico reumatologista.

4.3.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídas da amostra: (a) pacientes com lesões reticulares em contato com restaurações de amálgama pela possibilidade de confusão com reação liquenoide ao material restaurador; (b) pacientes cujas biópsias não preenchiam os critérios de diagnóstico histopatológico por HE e/ou imunofluorescência direta.

4.4 PROCEDIMENTOS

Após avaliação clínica, as pacientes com líquen plano oral e lúpus eritematoso que preencheram os critérios diagnósticos clínicos para as duas doenças foram esclarecidas sobre os objetivos e procedimentos do estudo e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Na sequência, suas lesões orais foram biopsiadas no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas, PUCRS (Figura 1). O espécime biopsiado foi imediatamente dividido em dois fragmentos, sendo um deles armazenado em isopentano 99% P.A. para posterior congelamento e processamento por imunofluorescência direta, e o outro, em formalina tamponada a 10% por 24 horas para posterior processamento pela técnica da parafina (Figura 2).

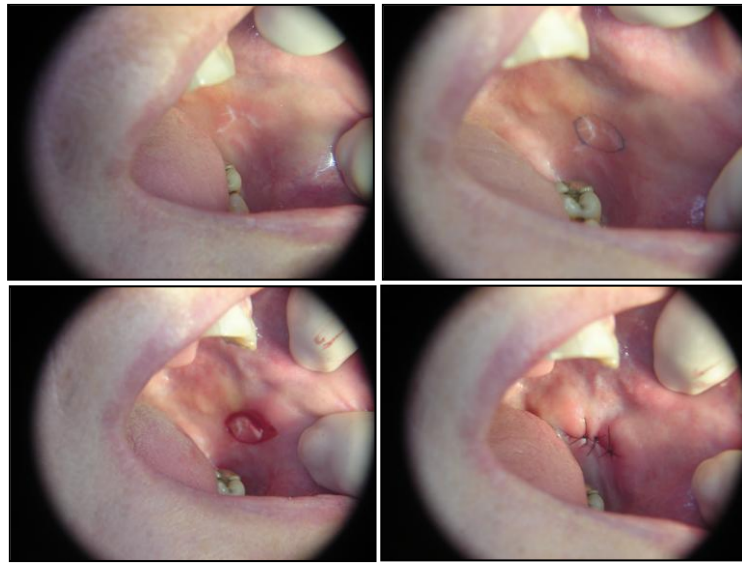


Figura 1: Biópsia incisional de lesão em mucosa jugal esquerda

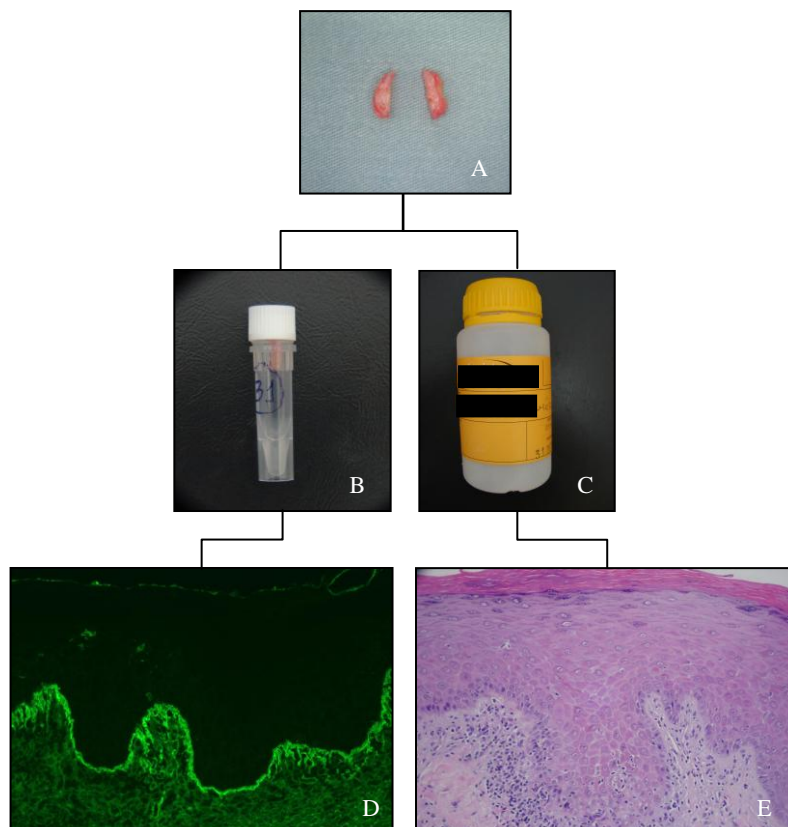


Figura 2: Processamento dos espécimes: (A) Espécime biopsiado dividido em dois fragmentos, sendo um fragmento armazenado em isopentano 99% P.A. (B) e o outro em formalina tamponada a 10% (C) para posterior processamento por imunofluorescência direta (D) e HE (E)

4.4.1 Confirmação Diagnóstica

Com o objetivo de confirmar o diagnóstico clínico, foram obtidas lâminas coradas por HE a partir do material incluído em parafina, e lâminas processadas por imunofluorescência direta a partir dos espécimes congelados. As referidas lâminas foram avaliadas três vezes, em três momentos distintos por um examinador cegado e calibrado.

4.4.1.1 Hematoxilina e Eosina

Foram realizados cortes histológicos de 4 µm de espessura, submetidos à coloração por HE (Figura 3), e as respectivas lâminas, analisadas para confirmação diagnóstica respeitando-se os critérios histopatológicos para as duas enfermidades. O diagnóstico de líquen plano considerou os seguintes critérios: (1) cristas epiteliais pontiagudas, (2) degeneração da camada basal, (3) infiltrado subepitelial de linfócitos em banda (SCHIÖDT, 1984; EISEN et al., 2005). O diagnóstico de lúpus eritematoso discoide considerou: (1) degeneração da camada basal, (2) hiperplasia pseudoepiteliomatosa e/ou atrofia epitelial, (3) infiltrado linfocitário denso focal ou difuso e/ou perivascular, com presença de células inflamatórias crônicas (SCHIÖDT, 1984; SHAFER et al., 1987; NICO et al., 2008; BALTACI e FRITSCH, 2009). O diagnóstico histopatológico de lúpus eritematoso sistêmico considerou: (1) hiperkeratose, (2) atrofia epitelial ou atrofia alternando-se com hiperplasia, (3) degeneração da camada basal, (4) infiltrado linfocitário subepitelial e perivascular profundo (FARTHING e SPEIGHT, 2006; LÓPEZ-LABADY et al., 2007; SEPEHER et al., 2010).

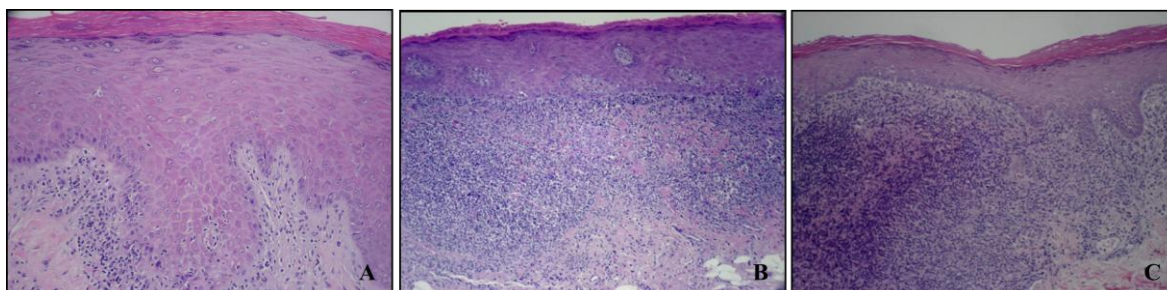


Figura 3: Exame histopatológico em HE: (A) Líquen plano; (B) lúpus eritematoso discoide; (C) lúpus eritematoso sistêmico

4.4.1.2 Imunofluorescência Direta

O espécime em isopentano 99% P.A. foi acondicionado em nitrogênio líquido a 20°C negativos imediatamente após a biópsia. Após, foi incluído em meio de inclusão para congelação (OCT) (tissue freezing medium Jung, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) na base do criostato. Quatro cortes com 8 µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas e deixados em temperatura ambiente por 30 minutos. Os cortes foram fixados em acetona P.A. por 10 minutos à temperatura de 20°C negativos e lavados com água destilada para remoção do gel de OCT. Foi realizada lavagem com *tris-buffered-saline* (TBS) e secagem em temperatura ambiente. A diluição dos anticorpos foi feita com *phosphate-buffered-saline* (PBS), pH 7,2, sendo empregada a diluição 1:40 nos anticorpos conjugados IgA (Rabbit anti-humano IgA/FITC, Dako, Copenhagen, Denmark), IgM (Rabbit anti-humano IgM/FITC, Dako, Copenhagen, Denmark), C1q (Rabbit anti-humano C1q/FITC, Dako, Copenhagen, Denmark), C3 (Rabbit anti-humano C3/FITC, Dako, Copenhagen, Denmark) e fibrinogênio (Rabbit anti-humano fibrinogênio/FITC, Dako, Copenhagen, Denmark), e diluição 1:100 para o anticorpo IgG (Rabbit anti-humano IgG/FITC, Dako, Copenhagen, Denmark). Depois de distendidos nas lâminas, os cortes foram circundados com caneta hidrofóbica, e os anticorpos pipetados sobre eles, sendo, então, incubados em câmara úmida e escura por 2 horas. A remoção dos anticorpos foi realizada com jato de PBS, as lâminas foram colocadas e mantidas de molho em cuba de PBS por 5 minutos, sendo, após, removidas e mantidas no escuro até a secagem. As lamínulas foram montadas com uma gota de meio de montagem para fluorescência (Prolong Gold antifade reagent, Invitrogen, Eugene, OR, USA) em cada corte.

O quadro 1 exhibe os critérios diagnósticos empregados para a imunofluorescência direta. O diagnóstico de líquen plano foi considerado quando as lâminas apresentaram imunofluorescência para fibrinogênio isoladamente ou associada a C3 na zona da membrana basal (DANIELS e QUADRA-WHITE, 1981; FIRTH et al., 1990). O diagnóstico de lúpus eritematoso foi considerado quando a imunofluorescência foi positiva para IgM, isoladamente ou associada a IgG e/ou C3 em banda contínua, desalinhada ou granular na região da membrana basal e fibrinogênio negativo (Figura 4) (JONSSON et al., 1984; FIRTH et al., 1990; KONTOS et al., 2005). Para fins de inclusão e validade foram consideradas somente as marcações de intensidade positiva média (++) ou superior.

Diagnóstico	Anticorpo					
	C1	C3	Fibrinogênio	IgG	IgA	IgM
Líquen plano	+ ou -	+ ou -	+	-	+ ou -	-
Lupus eritematoso	+ ou -	+ ou -	-	+ ou -	+ ou -	+

Quadro 1: Critérios diagnósticos de imunofluorescência direta para líquen plano e lúpus eritematoso

+ = positivo
- = negativo

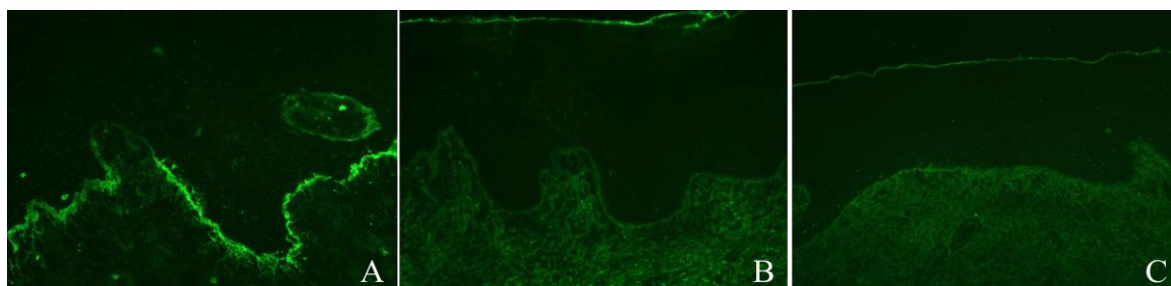


Figura 4: Análise por imunofluorescência direta: positividade para fibrinogênio em amostra de líquen plano (A); positividade para IgM em amostra de lúpus eritematoso sistêmico (B) e lúpus eritematoso discoide (C)

4.4.2 Processamento Imunoistoquímico e PAS

Após a confirmação diagnóstica, os espécimes foram submetidos ao processamento imunoistoquímico e à coloração por PAS. No processamento imunoistoquímico, foram empregados os anticorpos anti-CD1a, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD20, anticaspase-3 e antitriptase nas diluições apresentadas no quadro 2.

Variável	Anticorpo	Diluição	Fabricante
Células dendríticas	Anti-CD1a	1:100	Bio SB ¹
Linfócitos T <i>helper</i>	Anti-CD4	1:100	Bio SB ¹
Linfócitos T citotóxicos	Anti-CD8	1:100	Bio SB ¹
Linfócitos B	Anti-CD20	1:3000	Bio SB ¹
Apoptose	Anticaspase-3	1:500	Novocastra, Leica ²
Mastócitos	Antitriptase	1:200	Novocastra, Leica ²

Quadro 2: Anticorpos primários empregados, respectiva diluição e fabricante

¹ Bio SB. Inc., Santa Barbara, CA, USA

² Biosystems Newcastle Ltd., Benton Lane, Newcastle, UK

Para o processamento imunistoquímico foram feitos cortes de 4 μm , estando a temperatura do banho-maria entre 45°C e 50°C. Após ficarem em estufa por 30 minutos em temperatura de 56°C, as lâminas foram desparafinizadas em três séries de xilol e em uma série decrescente de alcoois (99%, 95%, 80%, 70%, 50%) durante 5 minutos cada e lavadas três vezes em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria e, após, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% em álcool metílico (30 minutos). Depois de lavadas duas vezes em água destilada, as lâminas foram colocadas em soro normal (solução a 5%) durante 15 minutos, lavadas novamente e deixadas em PBS. Neste momento, foram incubadas com os anticorpos primários, lavadas com PBS (*flush*) e secas cuidadosamente. Foi, então, incubado o anticorpo secundário por 15 minutos. Após nova lavagem e secagem, as lâminas foram incubadas com o anticorpo terciário por 15 minutos e submetidas à revelação com cromógeno e à contracoloração com hematoxilina de Harris por um minuto, seguida de lavagem em água corrente e em água destilada. As lâminas foram azuladas com água amoniacal a 2%, lavadas em água corrente e em água destilada, desidratadas, clareadas e montadas.

No processamento por PAS, foram feitos cortes de 4 μm que foram desparafinizados, hidratados em água deionizada e imersos em solução de ácido periódico a 0,5% durante 15 minutos à temperatura ambiente (18°C a 26°C). As lâminas foram, então, lavadas com vários banhos de água deionizada e imersas em reagente de Schiff durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após, foram lavadas em água corrente por 5 minutos e realizada a contracoloração com hematoxilina de Harris durante 5 segundos e lavadas em água corrente por 5 minutos. Após, as lamínulas foram montadas com meio de montagem à base de xilol.

4.4.3 Captura e Análise das Imagens

A captura das imagens histológicas foi realizada por meio de microscópio de luz Zeiss Axioskop 40 (Zeiss, Goettingen, Germany), conectado por videocâmera Roper Scientific (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) a um microcomputador Pentium IV 2.2 GHz com 512 MB de memória RAM, disco rígido de 160 GB e placa de captura Image Pro Capture Kit. Para a análise das imagens, foi empregado o programa Image Pro Plus versão 4.5.1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). O programa permite a captura da imagem digital com possibilidade de inserção de grade de correção, marcação e contagem

das áreas de interesse. As imagens capturadas foram armazenadas no formato JPEG (Joint Photographic Experts Group). A análise histológica foi realizada por um observador calibrado e cegado.

4.4.3.1 Imunoistoquímica

As imagens foram capturadas em objetiva de 10x totalizando três campos para cada lâmina, selecionados de forma padronizada (extremidade esquerda, centro e extremidade direita) (Figura 5). A quantificação da expressão imunoistoquímica de cada marcador (CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase-3 e triptase) foi feita por meio da técnica da segmentação semiautomatizada, no programa Image Pro-plus e discriminou as áreas de epitélio e conjuntivo nos campos selecionados. Para tanto, as áreas de epitélio e conjuntivo sofreram recorte no programa Adobe Photoshop Elements, versão 7.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) (Figuras 6 e 7).

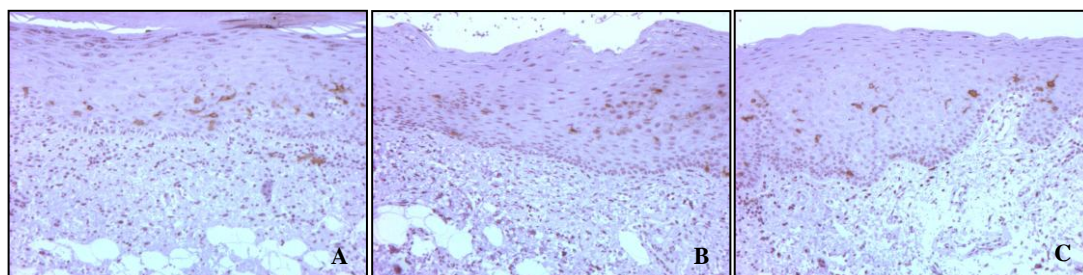


Figura 5: Análise imunoistoquímica: marcação do anticorpo CD1a nos campos selecionados. (A) Extremidade esquerda, (B) centro e (C) extremidade direita

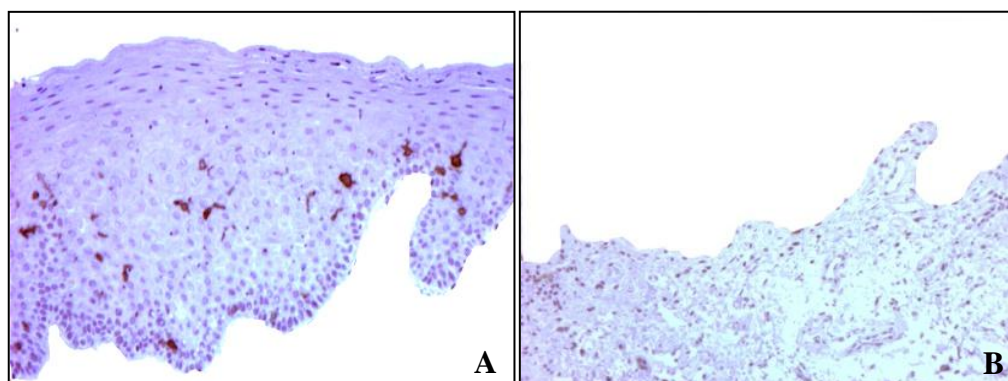


Figura 6: Recorte das áreas de epitélio e conjuntivo no programa Adobe Photoshop Elements versão 7.0 (Adobe Systems Inc, San Jose, CA, USA) para posterior quantificação. (A) Área de epitélio a ser analisada; (B) área de tecido conjuntivo

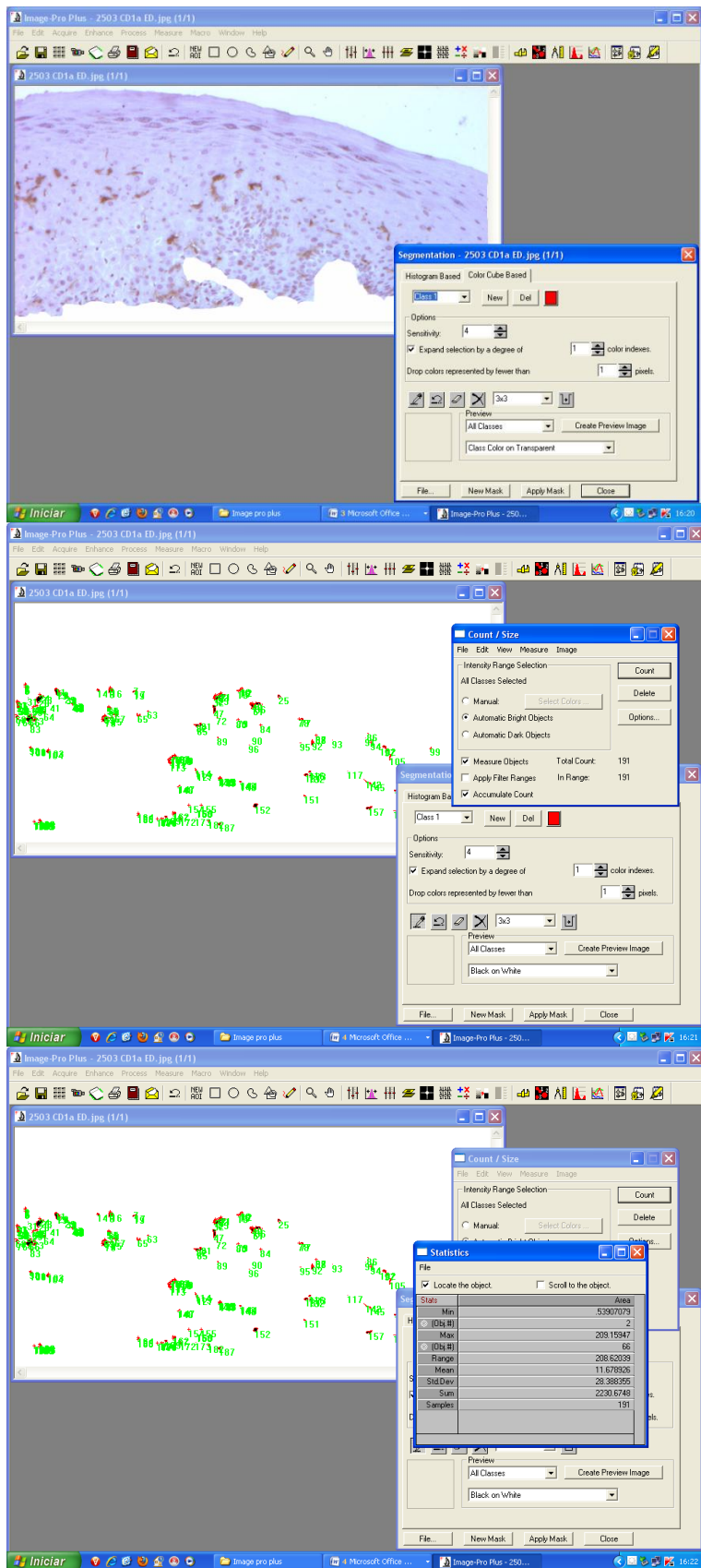


Figura 7: Quantificação da expressão imunohistoquímica pela técnica da segmentação semiautomatizada no Programa Image Proplus, versão 4.5.1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA)

4.4.3.2 PAS

As imagens de PAS foram capturadas em objetiva de 20x, totalizando três campos para cada lâmina (extremidade esquerda, centro e extremidade direita), que foram selecionados de forma padronizada. A medição da espessura da membrana basal, em μm , da região central de cada imagem histológica (Figura 8) foi realizada aplicando-se a ferramenta específica do programa Image Proplus, versão 4.5.1 (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA) (Figura 9).

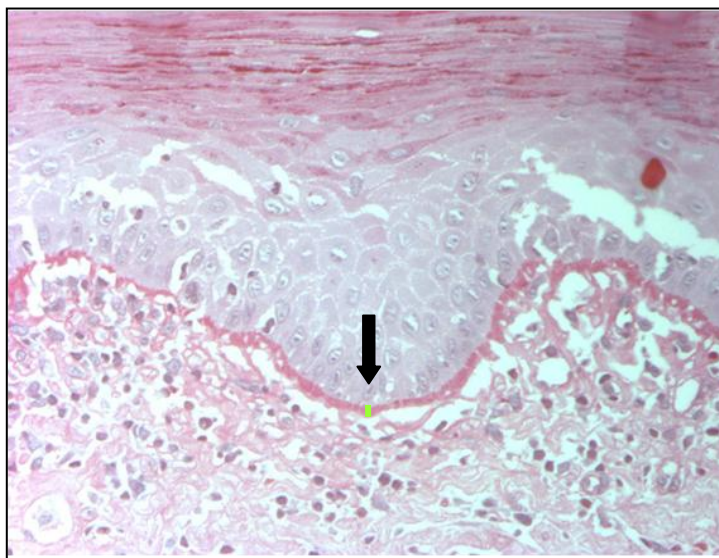


Figura 8: Sítio de mensuração da espessura da membrana basal, PAS, objetiva 20X

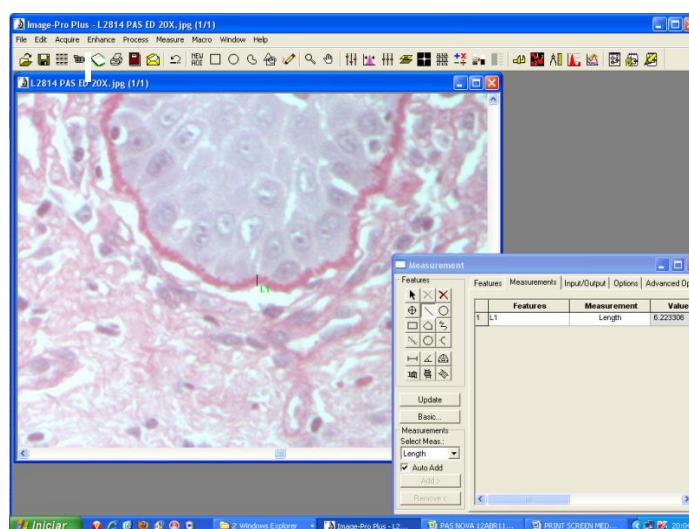


Figura 9: Medida da espessura da membrana basal no programa Image Proplus versão 4.5.1 (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA). PAS, objetiva 20X

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados por meio de estatística descritiva (mediana, percentil 25, percentil 75, tabelas e gráficos), e a expressão imunoistoquímica de CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase-3 e triptase foi comparada entre os grupos líquen plano e lúpus eritematoso por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney. A comparação dos subgrupos líquen plano, lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide foi feita por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Na comparação da espessura da membrana basal entre os grupos líquen plano e lúpus eritematoso, foi empregado o teste T de Student e, entre os grupos líquen plano, lúpus eritematoso discoide e lúpus eritematoso sistêmico, o teste ANOVA. O processamento estatístico foi realizado no programa SPSS versão 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA) considerando-se o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 CONFIRMAÇÃO DIAGNÓSTICA

Um total de 56 pacientes portadoras de lesões orais com diagnóstico clínico de líquen plano ou lúpus eritematoso, todas do sexo feminino, foi submetido à biópsia, cujos diagnósticos são apresentados na tabela 1. Por meio de exame clínico, histopatológico em HE e imunofluorescência direta, 21 pacientes tiveram diagnóstico de líquen plano oral confirmado, 14 pacientes tiveram confirmação de lúpus eritematoso discoide e 9 de lúpus eritematoso sistêmico. Nove pacientes tiveram diagnóstico inconclusivo, sendo 4 desses casos compatíveis com líquen plano e outros 5 compatíveis com lúpus eritematoso discoide. Três casos tiveram diagnóstico não compatível com líquen ou lúpus. Apenas os 44 casos que satisfizeram todos os critérios histopatológicos compuseram a amostra final para exame imunoistoquímico e PAS; os casos inconclusivos e os casos não compatíveis com líquen ou lúpus foram excluídos da amostra.

Tabela 1 - Distribuição da amostra de acordo com os diagnósticos obtidos por exame clínico, HE e imunofluorescência direta, Porto Alegre, 2011

Diagnóstico	Nº de casos	
	Amostra	Excluídos
Líquén plano	21	-
Lúpus eritematoso discoide	14	-
Lúpus eritematoso sistêmico	9	-
Inconclusivo (compatível com líquen plano)	-	4
Inconclusivo (compatível com lúpus eritematoso discoide)	-	5
Outro (não compatível com líquen ou lúpus)	-	3
Total	44	12

5.2 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

5.2.1 CD1a

A expressão imunoistoquímica de CD1a foi significativamente maior no grupo líquen plano, tanto para epitélio, quanto para conjuntivo (Tabela 2, Mann-Whitney, $\alpha=0,05$).

Tabela 2 – Expressão imunoistoquímica de CD1a (μm^2) em epitélio e conjuntivo para os grupos líquen plano e lúpus eritematoso, Porto Alegre, 2011

Sítio	Líquen plano			Lúpus Eritematoso			P*
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
Epitélio	1.797,6	941,4	2.716,6	867,0	332,1	1.702,2	0,005
Conjuntivo	2.649,5	1.623,3	4.813,5	1.308,7	419,6	2.653,8	0,030
Percentual total	6,1	4,6	8,3	3,4	1,7	5,4	<0,001

*Teste Mann-Whitney
P25=percentil 25; P75= percentil 75

5.2.2 CD4

A expressão imunoistoquímica de CD4 em epitélio não diferiu significativamente entre líquen plano e lúpus eritematoso, entretanto, no tecido conjuntivo foi maior para o grupo líquen plano (Tabela 3, Mann-Whitney, $\alpha=0,05$).

Tabela 3 – Expressão imunoistoquímica de CD4 (μm^2) em epitélio e conjuntivo para os grupos líquen plano e lúpus eritematoso, Porto Alegre, 2011

Sítio	Líquen plano			Lúpus Eritematoso			P*
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
Epitélio	2.155,7	1.187,0	5.600,2	2.040,0	1.227,1	3.435,9	0,503
Conjuntivo	11.023,3	8.355,9	32.030,5	6.721,7	2.624,6	13.887,4	0,008
Percentual total	19,5	12,3	46,6	15,2	6,8	22,0	0,015

*Teste Mann-Whitney
P25=percentil 25; P75= percentil 75

5.2.3 CD8

A expressão imunoistoquímica de CD8 foi significativamente maior no grupo líquen plano, tanto para a análise em epitélio, quanto para tecido conjuntivo (Tabela 4, Mann-Whitney, $\alpha=0,05$).

Tabela 4 – Expressão imunoistoquímica de CD8 (μm^2) em epitélio e conjuntivo para os grupos líquen plano e lúpus eritematoso, Porto Alegre, 2011

Sítio	Líquen plano			Lúpus Eritematoso			P*
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
Epitélio	2.245,4	1.513,4	4.288,8	1.176,3	697,9	2.298,6	0,047
Conjuntivo	21.463,5	11.110,0	44.408,5	11.380,9	1.671,7	26.794,7	0,038
Percentual total	30,4	17,6	64,9	16,1	2,7	36,9	0,026

*Teste Mann-Whitney

P25=percentil 25; P75= percentil 75

5.2.4 CD20

A expressão imunoistoquímica de CD20 em epitélio não diferiu significativamente entre líquen plano e lúpus eritematoso, entretanto, no tecido conjuntivo, foi significativamente maior para o grupo líquen plano (Tabela 5, Mann-Whitney, $\alpha=0,05$).

Tabela 5 – Expressão imunoistoquímica de CD20 (μm^2) em epitélio e conjuntivo para os grupos líquen plano e lúpus eritematoso, Porto Alegre, 2011

Sítio	Líquen plano			Lúpus Eritematoso			P*
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
Epitélio	273,8	148,6	438,7	204,3	74,6	388,0	0,404
Conjuntivo	7.821,6	1.651,8	13.503,9	783,1	260,4	8.945,2	0,006
Percentual total	10,0	2,4	17,9	1,3	0,6	11,8	0,007

*Teste Mann-Whitney

P25=percentil 25; P75= percentil 75

5.2.5 Caspase-3

A expressão imunoistoquímica da caspase-3 não diferiu significativamente entre os grupos líquen plano e lúpus eritematoso, nem em epitélio, nem em conjuntivo (Tabela 6, Mann-Whitney, $\alpha=0,05$).

Tabela 6 – Expressão imunoistoquímica da caspase-3 (μm^2) em epitélio e conjuntivo para os grupos líquen plano e lúpus eritematoso, Porto Alegre, 2011

Sítio	Líquen plano			Lúpus Eritematoso			P*
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
Epitélio	1.063,8	458,2	2.820,5	1.082,5	273,7	1.952,0	0,534
Conjuntivo	4.335,9	1.838,3	8.807,2	1.949,8	1.359,9	5.036,4	0,098
Percentual total	8,1	4,1	13,3	4,0	1,9	12,7	0,169

*Teste Mann-Whitney

P25=percentil 25; P75= percentil 75

5.2.6 Triptase

A expressão imunoistoquímica da triptase foi significativamente maior no epitélio das lesões de lúpus eritematoso do que no líquen plano. Entretanto, os grupos não diferiram significativamente para a análise do tecido conjuntivo (Tabela 7, Mann-Whitney, $\alpha=0,05$).

Tabela 7 – Expressão imunoistoquímica da triptase (μm^2) em epitélio e conjuntivo para os grupos líquen plano e lúpus eritematoso, Porto Alegre, 2011

Sítio	Líquen plano			Lúpus Eritematoso			P*
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
Epitélio	22,3	16,5	54,3	55,7	34,3	123,1	0,012
Conjuntivo	272,8	131,7	380,8	346	199,5	560,1	0,198
Percentual total	0,4	0,2	0,6	0,5	0,3	0,8	0,124

*Teste Mann-Whitney

P25=percentil 25; P75= percentil 75

5.2.7 Comparação entre Líquen Plano, Lúpus Eritematoso Sistêmico e Lúpus Eritematoso Discoide

A tabela 8 e a figura 10 exibem os resultados da análise imunoistoquímica verificados para a comparação do grupo líquen plano com os subgrupos lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide em epitélio, enquanto a tabela 9 e a figura 11 exibem essa comparação para tecido conjuntivo.

Tabela 8 - Expressão imunoistoquímica (μm^2) de CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase-3 e triptase em tecido epitelial das lesões orais de líquen plano, lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide, Porto Alegre, 2011

Marcador	Grupo								
	Líquen plano			Lúpus eritematoso sistêmico			Lúpus eritematoso discoide		
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75
CD1a	1797,6 ^A	941,4	2716,6	1493,6 ^{AB}	424,5	2047,0	730,6 ^B	310,2	1385,6
CD4	2155,7 ^A	1187,0	5600,2	3391,5 ^A	1979,4	4808,3	1648,0 ^A	981,3	2815,3
CD8	2245,4 ^A	1513,4	4288,8	1447,9 ^A	654,6	2576,6	1109,2 ^A	812,6	2302,2
CD20	273,8 ^A	148,6	438,7	187,8 ^A	85,2	396,1	230,5 ^A	72,5	404,3
Caspase-3	1063,8 ^A	458,2	2820,5	296,8 ^A	177,6	1794,8	1386,0 ^A	501,5	1964,2
Triptase	22,3 ^B	16,5	54,3	54,1 ^{AB}	30,5	87,4	69,1 ^A	38,9	138,0

Medianas seguidas de letras distintas correspondem aos grupos que diferem significativamente. Teste de Kruskal-Wallis complementado pelo seu Teste de Comparações Múltiplas, ao nível de significância de 5%

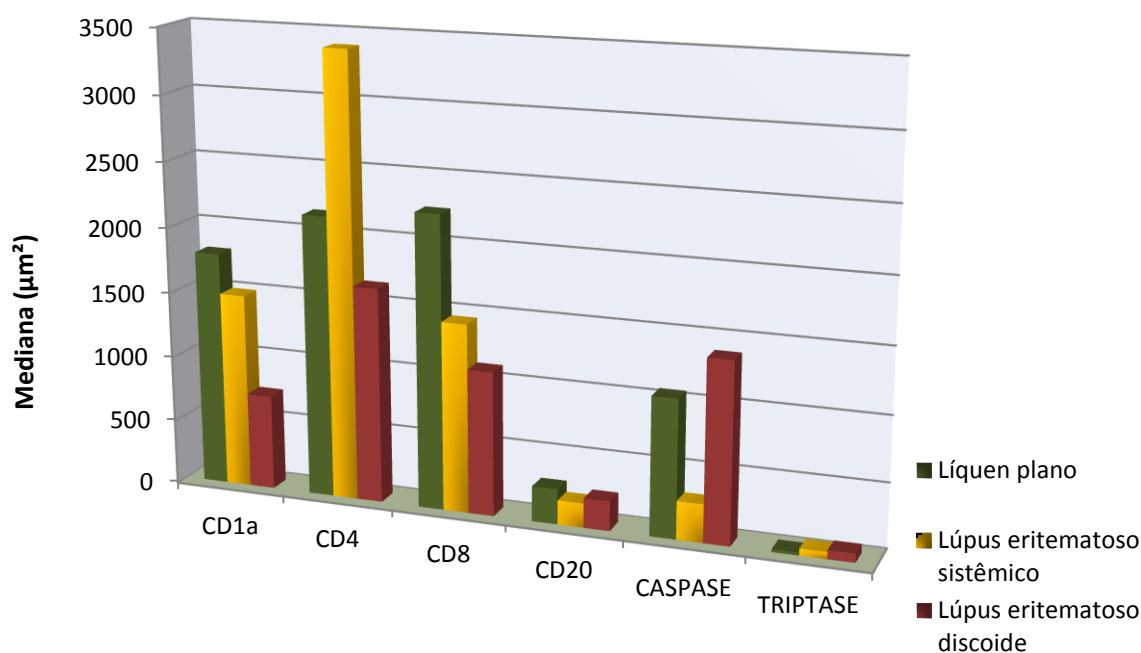


Figura 10: Expressão imunoistoquímica (μm^2) de CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase-3 e triptase em tecido epitelial das lesões orais de líquen plano, lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide, Porto Alegre, 2011

Tabela 9 - Expressão imunoistoquímica (μm^2) de CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase 3 e triptase em tecido conjuntivo das lesões orais de líquen plano, lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide, Porto Alegre, 2011

Marcador	Grupo								
	Líquen plano			Lúpus eritematoso sistêmico			Lúpus eritematoso discóide		
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75
CD1a	2649,5 ^A	1623,3	4813,5	862,0 ^A	382,6	1926,6	1875,4 ^A	676,0	3360,8
CD4	11023,3 ^A	8355,9	32030,5	8081,7 ^{AB}	2698,7	13575,7	6191,0 ^B	2172,3	13994,3
CD8	21463,5 ^A	11110,0	44408,5	7327,2 ^B	541,9	14706,7	17814,3 ^A	2360,3	39243,6
CD20	7821,6 ^A	1651,8	13503,9	357,0 ^B	151,6	3415,5	971,4 ^B	372,8	10301,1
Caspase-3	4335,9 ^A	1838,3	8807,2	1650,8 ^A	1361,1	5047,4	2128,8 ^A	1143,4	5281,3
Triptase	272,8 ^A	131,7	380,8	396,2 ^A	128,5	610,7	333,7 ^A	194,3	589,8

Medianas seguidas de letras distintas correspondem aos grupos que diferem significativamente. Teste de Kruskal-Wallis complementado pelo seu Teste de Comparações Múltiplas, ao nível de significância de 5%

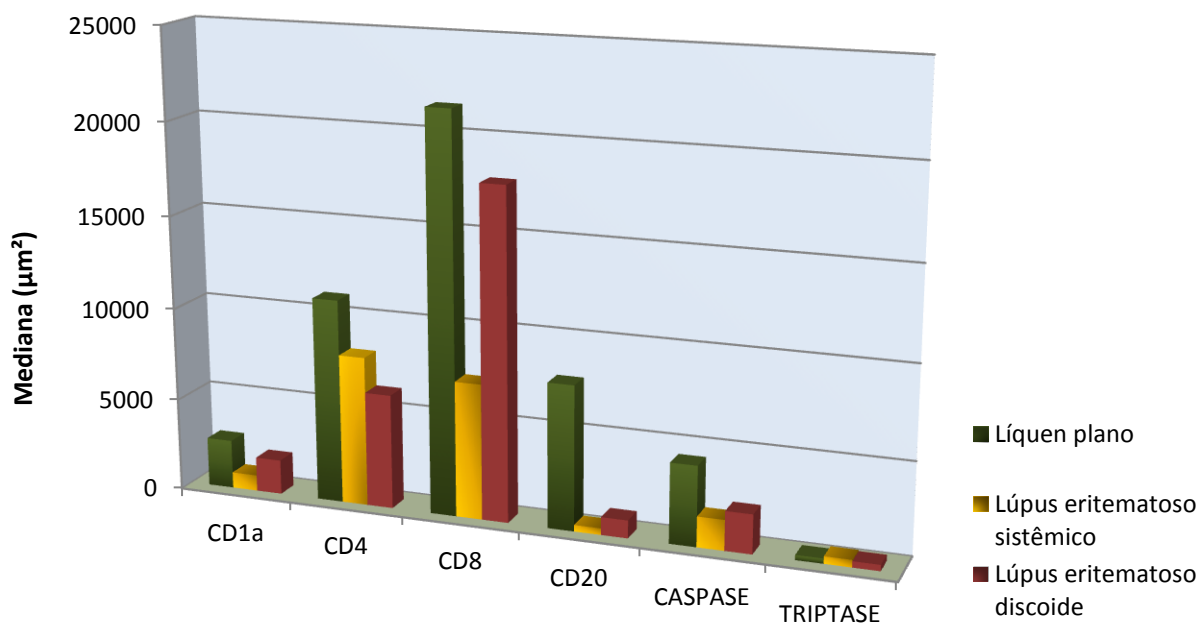


Figura 11: Expressão imunoistoquímica (μm^2) de CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase-3 e triptase em tecido conjuntivo das lesões orais de líquen plano, lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide, Porto Alegre, 2011

5.3 PAS – ESPESSURA DA MEMBRANA BASAL

A espessura da membrana basal não diferiu significativamente entre os grupos líquen plano e lúpus eritematoso (Teste T de Student, $P=0,629$, $\alpha=0,05$). Também na comparação dos grupos líquen plano, lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide, essa variável não diferiu significativamente (ANOVA, $P=0,271$, $\alpha=0,05$).

Tabela 10 – Espessura (μm) da membrana basal nas lesões orais de líquen plano e lúpus eritematoso, Porto Alegre, 2011

Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Líquén plano	21	6,34	1,16	3,86	8,99
Lúpus eritematoso	23	6,77	3,98	2,53	17,75

Teste T: $P=0,629$

n=número de pacientes

Tabela 11 – Espessura (μm) da membrana basal nas lesões orais de líquen plano, lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide, Porto Alegre, 2011

Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Líquen plano	21	6,34	1,16	3,86	8,99
Lúpus eritematoso sistêmico	9	5,57	2,59	2,53	9,17
Lúpus eritematoso discóide	14	7,54	4,58	2,72	17,75

Análise de Variância: $P=0,271$
n=número de pacientes

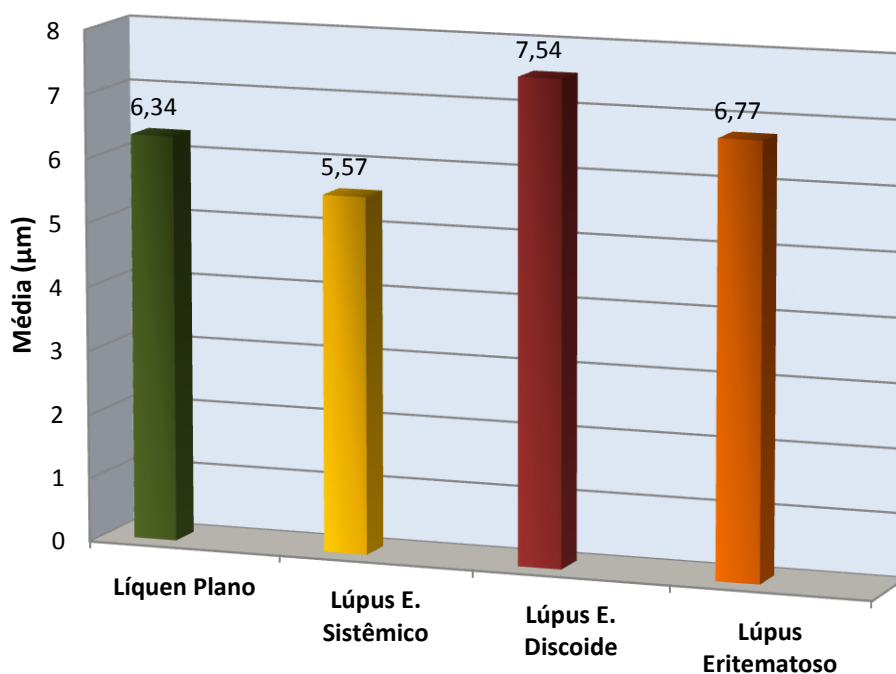


Figura 12: Espessura (μm) da membrana basal nas lesões orais de líquen plano, lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide, Porto Alegre, 2011

6 DISCUSSÃO

A expressão de CD1a foi significativamente maior nas lesões orais de líquen plano do que nas de lúpus, tanto em epitélio quanto em conjuntivo. O papel das células dendríticas na etiopatogenia do líquen plano tem sido relatado na literatura (HASSÉUS et al., 2001; SANTORO et al., 2005; GUSTAFSON et al., 2007). A presença dessas células em maior número no epitélio das lesões de líquen está de acordo com a ocorrência de uma resposta imunológica aos antígenos endógenos e/ou exógenos encontrados nos ceratinócitos da camada basal, que seriam os responsáveis por sua ativação (VILLARROEL DORREGO et al., 2002). No presente estudo, essas células foram significativamente mais frequentes também no conjuntivo das lesões de líquen em comparação ao lúpus, o que evidencia sua participação primária no processo. A literatura relata expressão de CD1a mais prevalente no epitélio e no conjuntivo de lesões de líquen plano oral, se comparadas com mucosa normal (GUSTAFSON et al., 2007; SANTORO et al., 2005; SATO et al., 2006), o que, segundo os autores, indica que as células dendríticas, entre elas as células de Langerhans, têm papel importante no líquen plano promovendo o processo da reação imunológica ao ativarem os linfócitos T. Ainda, ao considerar-se a área de expressão de CD1a, a diferença entre líquen e lúpus foi mais significativa para tecido epitelial do que para conjuntivo, o que sugere sua maior atividade no epitélio do líquen e, portanto, corrobora a ideia de um antígeno epitelial local como responsável pela resposta imunológica dessa enfermidade (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998; HASSÉUS et al., 2001).

Nas lesões orais de lúpus, embora presente, a expressão de CD1a foi significativamente menor que no líquen. É possível que, no lúpus, as células dendríticas tenham um papel distinto daquele exercido no líquen plano. Essas células apresentadoras de antígeno são capazes não apenas de induzir a ativação dos linfócitos T, mas também de estimular o crescimento e a diferenciação dos linfócitos B (FAYETTE et al., 1998; BLANCO et al., 2001). Sendo o lúpus uma doença comprovadamente autoimune, em que ocorrem inúmeros autoanticorpos, é possível que o papel das células dendríticas esteja, aqui, voltado à diferenciação dos linfócitos B e não propriamente à apresentação de antígenos, daí sua menor expressão no epitélio (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998). Tal achado sugere também que, embora com manifestação clínica semelhante, as lesões orais dessas duas doenças sejam resultado de processos imunológicos distintos: no caso do

líquen, as células dendríticas seriam iniciadoras de um processo local desencadeado por antígenos epiteliais, capturando-os e apresentando-os aos linfócitos T; no caso do lúpus, teriam papel secundário às reações imunológicas já instaladas, induzindo crescimento de células B e produção de anticorpos, ou mesmo atuando na tentativa de indução de tolerância aos antígenos próprios por parte das células T. É importante lembrar que os linfócitos T e B são os mediadores da imunidade, mas sua função está sob o controle das células dendríticas. Estas últimas controlam a imunidade das mucosas não apenas por meio da ativação de linfócitos, mas também tornando as células T tolerantes aos autoantígenos, o que minimiza as reações autoimunes. Esse efeito ocorre não apenas no timo, mas também em órgãos periféricos (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998). Assim, uma disfunção dessas células na indução da autotolerância poderia estar envolvida na etiopatogenia da enfermidade em questão.

A expressão significativamente maior de CD4, CD8 e CD20 no líquen plano, principalmente em tecido conjuntivo, expressa o papel fundamental dos linfócitos e seu predomínio no infiltrado inflamatório dessa enfermidade (PORTER et al., 1997; VILLARROEL DORREGO et al., 2002; ZHOU et al., 2002). Tal achado sugere que o comparecimento de outras células inflamatórias como neutrófilos, eosinófilos, plasmócitos e macrófagos no infiltrado inflamatório do lúpus contribua para que, neste, os linfócitos, tanto T quanto B, sejam menos numerosos do que no líquen (REN et al., 2003; HUSSEIN et al., 2008; LI et al., 2010). Já o fato de as expressões, tanto de CD4 quanto de CD20 em tecido epitelial não terem diferido significativamente entre líquen e lúpus, enquanto a de CD8 foi significativamente maior no epitélio das lesões de líquen evidencia a importância da ação dos linfócitos citotóxicos sobre o epitélio das lesões desta enfermidade, como já descrito na literatura (EVERSOLE, 1997; LODI et al., 2005; SUGERMAN, et al., 2002). Esses linfócitos são a maioria no infiltrado do líquen e se dispõem no epitélio e adjacentes aos ceratinócitos destruídos da camada basal, bem como na camada subepitelial e região intraepitelial e, quando ativados, podem provocar a apoptose dos ceratinócitos (SUGERMAN e SAVAGE, 2002; SUGERMAN et al., 2002). As células T citotóxicas conferem proteção contra patógenos intracelulares (vírus, bactérias e parasitas) que se multiplicam no citoplasma da célula hospedeira, onde se encontram protegidos dos ataques dos anticorpos. Elas conferem essa proteção induzindo a morte da célula infectada antes que os microrganismos possam proliferar, escapar e infectar as células vizinhas. Uma vez ativado por uma célula apresentadora de antígenos infectada, um linfócito T citotóxico

torna-se uma célula efetora, que pode destruir qualquer célula-alvo infectada com o mesmo patógeno (ALBERTS et al., 2006). Assim, o predomínio de células CD8 no líquen pode estar associado a antígenos endógenos das células apoptóticas (BAIMA e STICHERLING, 2001), mas também não permite descartar, na etiopatogenia da doença, entre outros possíveis antígenos, a participação de algum agente viral ou outro microrganismo intracelular que infecte as células epiteliais.

Nas lesões orais de lúpus eritematoso, o componente celular mais prevalente no infiltrado inflamatório é de linfócitos T, predominantemente linfócitos T CD4 (LOURENÇO et al., 2007). Quando um linfócito T CD4 é ativado por uma célula apresentadora de antígenos, torna-se uma célula efetora e pode, então, auxiliar a ativar outras células: macrófagos, linfócitos T CD8 e linfócitos B (ALBERTS et al., 2006). Pacientes com lúpus eritematoso discoide e sistêmico exibem distribuição similar dos subtipos de linfócitos no sangue periférico, porém o número de linfócitos T é menor no lúpus eritematoso sistêmico, o que poderia ser explicado por uma profunda linfopenia de células T CD4, que é um traço característico dessa forma da doença. A população de linfócitos no sangue de pacientes com lúpus eritematoso também exibe menor frequência de linfócitos T CD8 em comparação a indivíduos saudáveis, entretanto as formas discoide e sistêmica não diferem significativamente. A migração de linfócitos do sangue periférico e seu acúmulo nas lesões inflamatórias da pele e mucosas explicariam sua diminuição no sangue circulante, já que os linfócitos citotóxicos são os mediadores do dano à camada de células basais do epitélio (WOUTERS et al., 2004). Assim, é possível que a multiplicidade de sítios-alvo atacados pelo sistema imunológico no lúpus sistêmico contribua para a menor densidade de linfócitos no infiltrado inflamatório de suas lesões orais, quando comparadas às do líquen.

O anticorpo anti-CD20 é um marcador de linfócitos B, que são as células responsáveis pela resposta imunológica mediada por anticorpos. Quando um linfócito B virgem ou de memória é ativado por um antígeno, prolifera e se diferencia em uma célula efetora secretora de anticorpos. Essas células produzem e secretam grande quantidade de anticorpos solúveis. Os linfócitos B efetores podem começar a secretar anticorpos enquanto ainda são pequenos linfócitos, mas no estágio final de sua via de maturação, tornam-se plasmócitos que continuamente secretam anticorpos em número surpreendente. Os plasmócitos parecem ter sua maquinaria de síntese proteica tão comprometida com a produção de anticorpos que são incapazes de promover outros processos de diferenciação

ou de divisão (ALBERTS, 2006). A expressão imunohistoquímica de CD20 em epitélio não diferiu significativamente entre líquen plano e lúpus eritematoso, entretanto, no tecido conjuntivo, foi significativamente maior para o grupo líquen plano. Sendo o lúpus uma doença autoimune clássica, caracterizada pela emissão de múltiplos autoanticorpos, cuja presença, nos casos do presente estudo, foi comprovada pela imunofluorescência direta, esperava-se, assim como já relatado na literatura (BIJL et al., 1998; HUSSEIN et al., 2008), que tivesse maior expressão de CD20, o que não aconteceu. O fato de o CD20 ter sido mais expressado no conjuntivo das lesões de líquen pode estar relacionado à maior densidade de linfócitos nessas lesões. Talvez, o foco da investigação devesse ser dirigido a marcadores de plasmócitos, que representam o linfócito B diferenciado e pronto para secretar imunoglobulinas, ou mesmo à expressão de interleucina-6 (IL-6), que é responsável pela diferenciação do linfócito B em plasmócito (YANAGIDA et al., 1995; RENAUDINEAU et al., 2004).

Com relação ao infiltrado inflamatório, há que se considerar, em ambas as doenças, o tratamento indicado. Para o lúpus sistêmico são empregados, com frequência, fármacos imunossupressores de uso sistêmico (ORTEU et al., 2001; ROTHFIELD et al., 2006; POWERS, 2008), o que diminui significativamente a atuação das células inflamatórias. E, mesmo que, no momento, o paciente não esteja fazendo uso da terapia medicamentosa, pode ainda estar sob seu efeito residual. Nos casos de líquen plano, o uso da corticoterapia ou de outros fármacos sistêmicos é eventual. Portanto, se poderia inferir que este fator teria contribuído para as diferenças observadas para CD4, CD8 e CD20 entre líquen e lúpus. Entretanto, os casos de lúpus discoide, que raramente são tratados com corticoterapia sistêmica (BRENNAN et al., 2005; ROTHFIELD et al., 2006), só diferiram significativamente do lúpus sistêmico para o marcador CD8 em **conjuntivo**, não havendo diferença significativa para os demais. Outro fator a ser considerado é a variabilidade do quadro clínico do lúpus, de acordo com os estágios de classificação clínica (índice SLEDAI), o que contempla pacientes em fases de maior e menor atividade da doença. Na presente pesquisa, as pacientes não foram classificadas pelo índice SLEDAI, tendo-se em vista o tamanho da amostra. É possível que a presença de pacientes em fase de menor atividade do lúpus tenha contribuído para os resultados observados para CD4, CD8 e CD20.

As caspases são cisteínas-proteases da família da enzima conversora da interleucina-1 β , que são necessárias para a morte celular programada e, provavelmente, as

mais claramente associadas com a morte celular (TOBÓN-ARROYAVE et al., 2004). A expressão imunohistoquímica da caspase-3 não diferiu significativamente entre os grupos líquen plano e lúpus eritematoso, nem em epitélio, nem em conjuntivo. O achado de que líquen e lúpus não diferiram para expressão de caspase-3 significa que a apoptose está acontecendo em ambas as doenças na mesma intensidade, tanto para epitélio, quanto para conjuntivo. Isso, somado aos achados para CD1a, CD4 e triptase, permite inferir que as duas doenças diferem nos mecanismos que induzem o processo de apoptose, mas o resultado –apoptose- é similar, daí a semelhança clínica das lesões em ambas as enfermidades. O achado também corrobora a maior gravidade do lúpus que, embora com menor densidade de linfócitos e células dendríticas, é capaz de exibir intensidade de apoptose semelhante.

A ocorrência de apoptose tanto em epitélio quanto em conjuntivo está em concordância com os relatos de Neppelberg et al. (2001), que observaram maior prevalência de células apoptóticas no epitélio e no infiltrado subepitelial de lesões orais de líquen plano, quando comparadas com mucosa oral normal. Essas células concentravam-se mais na camada basal e nas áreas de atrofia epitelial, tanto em região intra como subepitelial. Também no lúpus, as lesões estão associadas à ocorrência de apoptose e correlacionadas diretamente com o volume de apoptose na epiderme. As células apoptóticas expressam antígenos endoplásmico e endonuclear em sua superfície, os quais podem induzir a produção de autoanticorpos, formação de depósitos de imunoglobulinas e, finalmente, liderar a perpetuação da inflamação local e o dano da epiderme por apoptose (BAIMA e STICHERLING, 2001).

A expressão imunohistoquímica da triptase foi significativamente maior no epitélio das lesões orais de lúpus eritematoso do que nas de líquen plano. Entretanto, os grupos não diferiram significativamente para a análise do tecido conjuntivo. O mastócito é uma célula do tecido conjuntivo de origem mesenquimal que contém heparina e histamina em seu interior. Desempenha papel importante em processos alérgicos e também na proteção e defesa contra organismos patogênicos (ALBERTS, 2006). Posiciona-se de forma a ser a primeira célula do sistema imunológico a interagir com antígenos ambientais e alérgenos (GALLI et al., 2008).

O lúpus eritematoso sistêmico é uma doença de tecido conjuntivo cuja patogênese caracteriza-se principalmente pela deposição de imunocomplexos nos tecidos. Como os mastócitos são ativados pelos imunocomplexos, teoricamente, poderiam estar envolvidos

na patogênese da doença. Sua expressão significativamente maior no epitélio das lesões orais de lúpus do que nas de líquen, mesmo quando o infiltrado inflamatório no líquen é mais denso, evidencia a importância da participação dos mastócitos na etiopatogenia do lúpus e pode refletir a ação dos imunocomplexos sobre antígenos presentes no tecido epitelial. A urticária ocorre frequentemente no lúpus eritematoso sistêmico, o que também poderia confirmar o envolvimento dos mastócitos. Embora considerações teóricas sustentem que essas células contribuam para o dano dos tecidos no lúpus, as evidências ainda são deficientes e poucos estudos têm direcionado seu enfoque à investigação da participação dos mastócitos na patogenia do lúpus eritematoso (EKLUND, 2007).

No tecido conjuntivo, não houve diferença significativa da expressão de triptase entre líquen plano e lúpus eritematoso. Alguns estudos mostram aumento de mastócitos nas lesões de líquen (SUGERMAN et al., 2002; ZHAO et al., 2002; JAHANSHAHI e AMINZADEH, 2010), o que têm suscitado pesquisas sobre o potencial papel dos mastócitos e seus mediadores na inflamação crônica, assim como sua relação com a população de células imunocompetentes do líquen (ZHAO et al., 2002). Outros estudos sugerem que a destruição da membrana basal no líquen plano oral resulte do acúmulo de mastócitos nessas áreas, o que propiciaria a migração de linfócitos T CD8 para o epitélio (ZHOU et al., 2002; JUNEJA et al., 2006). No líquen, o papel dos mastócitos estaria relacionado à liberação de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , quimase e triptase. Esses mediadores estariam envolvidos na cronicidade da doença. Ambos TNF- α e quimase estimulariam a secreção de RANTES (*Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*) pelos linfócitos T, os quais, de volta, estimulariam os mastócitos a secretarem TNF- α e quimase. A atividade cíclica resultaria na cronicidade do líquen plano oral (ROOPASHREE et al., 2010). Assim, o líquen plano seria uma resposta imunológica aos antígenos endógenos (ceratinócitos) em que os mastócitos são recrutados secundariamente ao tecido lesado por mediadores liberados pelos linfócitos T citotóxicos (JAHANSHAHI e AMINZADEH, 2010).

Os mastócitos têm sido implicados em muitas doenças caracterizadas pela inflamação crônica, em que se observam mudanças no número ou no fenótipo dessas células no órgão afetado (METZ et al., 2007). Recentemente, os mastócitos têm sido alvo de pesquisas que evidenciam sua atuação em várias outras funções, a depender do ambiente em que estejam envolvidos. Tem sido verificado que regulam respostas imunológicas fisiológicas e patológicas e, portanto, agem na interface entre a imunidade inata e a

adaptativa. Sob condições específicas, exercem o papel de células reguladoras com propriedades anti-inflamatórias e são capazes de afetar as células dendríticas e as funções das células T em órgãos linfoides secundários, o que sugere que desempenhem diferentes papéis na iniciação, no estabelecimento e na progressão de doenças autoimunes (FROSSI et al., 2010).

A angiogênese é fator crucial para a perpetuação da inflamação crônica, porque promove a migração de células inflamatórias para o sítio inflamado. Os mastócitos são capazes de produzir fatores pró-angiogênicos como prostaglandinas E1 e E2, interleucina-8 (IL-8), heparina, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), óxido nítrico, fator ativador de plaquetas e TGF- β 1 (BACHELET et al., 2006). Além disso, muitos produtos derivados de mastócitos têm efeitos que podem influenciar significativamente a sobrevivência, a proliferação, o fenótipo e a função de muitas outras células que participam da inflamação crônica e remodelação do tecido (METZ et al., 2007).

A questão aqui seria definir se o papel dos mastócitos no lúpus é decorrente de sua ativação por antígenos ambientais e alérgenos ou se o seu afluxo aos sítios de lesão é secundário às citocinas liberadas pelos linfócitos, sendo sua permanência no sítio responsável pela cronicidade das lesões. Ou ainda, se seu papel é de célula anti-inflamatória e reguladora da automimunidade, podendo as lesões de lúpus, neste caso, estarem associadas a uma disfunção dos mastócitos.

A espessura da membrana basal, avaliada na coloração de PAS, não diferiu significativamente entre líquen plano e lúpus eritematoso, mesmo quando considerados os subgrupos sistêmico e discoide. Entretanto, ao compararem-se as médias verificadas para os grupos (6,34 μ m; 5,57 μ m; 7,54 μ m) com a espessura normal dessa estrutura histológica, que, para mucosa oral é de 1 a 3 μ m (DI FIORE et al., 1973), verifica-se que ambas as doenças exibem aumento da espessura da membrana basal. Já a média de espessura da membrana basal epitelial normal da mucosa das vias aéreas varia entre 2,3 μ m e 5 μ m (JEFFERY, 2001; 2004; TAGAYA e TAMAOKI, 2007; SOHN et al., 2008; LIESKER et al., 2009; SAMITAS, et al., 2011). Portanto, o espessamento da membrana basal está presente nas lesões orais, tanto de líquen, quanto de lúpus sem diferir em intensidade entre elas. Os resultados do presente estudo diferem daqueles relatados por Karjalainen e Tomich (1989), segundo os quais o lúpus eritematoso apresentou depósitos espessos e irregulares que se estendem ao tecido conjuntivo, enquanto no líquen plano a zona de membrana basal era bem-definida, fina, contínua e de cor magenta brilhante.

O aumento da espessura da membrana basal resulta de processos inflamatórios prolongados e corresponde à deposição de colágeno I, II, V e matriz extracelular, como fibronectina, laminina e tenascina. O mecanismo de deposição de matriz extracelular pode ocorrer por um desequilíbrio entre a síntese e a degradação. A deposição de colágeno nos tecidos é controlada por um balanço entre a degradação de metaloproteases de matriz de colágeno e seus inibidores (TAGAYA e TAMAOKI, 2007). O aumento da expressão de um dos vários componentes da zona de membrana basal e um aumento da expressão dos componentes do colágeno podem estar relacionados ao aumento da espessura da membrana basal no líquen plano e no lúpus eritematoso (AL-REFU e GOODFIELD, 2011).

Na literatura são encontradas várias pesquisas que avaliam, por meio de morfometria, a espessura da membrana basal da mucosa das vias aéreas em doenças respiratórias, uma vez que a espessura aumentada da membrana é característica dessas enfermidades em função dos processos inflamatórios prolongados (TAGAYA e TAMAOKI, 2007). Entretanto, os estudos que relatam essa característica em lesões de mucosa oral fazem avaliações subjetivas, não havendo a efetiva medição da estrutura histológica. Tal fato dificulta a comparação de nossos achados com os demais estudos e pode constituir variável interveniente nas pesquisas que afirmam existir maior espessura da membrana basal em lesões de lúpus eritematoso.

Embora a literatura relate o aumento da espessura da membrana basal como característica das lesões de lúpus (DAVIES e MARKS, 1977; SHAHIDULLAH et al., 1995; BALTACI e FRITSCH, 2009; AL-REFU e GOODFIELD, 2011), os achados do presente estudo sugerem que esta não constitua critério diferencial entre as lesões orais de lúpus eritematoso e líquen plano uma vez que ocorre em ambas as enfermidades.

O diagnóstico diferencial das lesões orais de líquen plano e lúpus eritematoso constitui um processo difícil. As duas doenças sobrepõem-se em vários aspectos clínicos e histopatológicos. Mesmo quando se lança mão da imunofluorescência direta, muitos casos permanecem com diagnóstico inconclusivo e há divergências na literatura quanto aos critérios definidores. É possível que muitas dessas divergências tenham origem na falta de padronização rigorosa na seleção da amostra, havendo o risco de alguns casos não terem certeza diagnóstica. Isso pode ser agravado ainda mais pelo fato de que alguns pacientes podem ser portadores das duas enfermidades simultaneamente (KIM e POMERANZ, 2004; NAGAO e CHEN, 2006). No presente estudo, tentou-se, a partir de uma seleção rigorosa da amostra, em que os casos foram escrutinados por meio de HE e imunofluorescência

direta e somente incluídos se cumprissem completamente os critérios estabelecidos, buscar alguma especificidade nos exames de imunistoquímica e PAS que pudesse auxiliar no diagnóstico diferencial dessas duas doenças. Entretanto, as variáveis avaliadas estiveram presentes nas lesões de ambas as enfermidades, o que sugere que nenhum dos marcadores investigados pode ser empregado como critério definidor de diagnóstico. Por outro lado, o comportamento do CD1a, do CD8 e da triptase fornecem alguns subsídios para a avaliação diagnóstica, evidenciando que células dendríticas e linfócitos T CD8 predominam no epitélio das lesões de líquen plano, enquanto os mastócitos predominam no epitélio do lúpus eritematoso.

A inter-relação de manifestações sob o ponto vista clínico e histopatológico, bem como a dificuldade de diagnóstico e de se estabelecerem critérios definitivos para diferenciar líquen e lúpus nos diversos métodos disponíveis, seja o HE, o PAS, a imunofluorescência direta ou o exame imunistoquímico, faz pensar se essas enfermidades não seriam fases diferentes de um mesmo processo ou mesmo que suas lesões orais não passem de manifestações inespecíficas comuns a vários distúrbios imunológicos de origens distintas. Os relatos da associação de ambas as enfermidades com outras condições autoimunes como hipotireoidismo e síndrome de Sjögren (SCOFIELD et al., 2007) depõem a favor dessa possibilidade.

As lesões parecem, em ambas as doenças, resultar do ataque às células epiteliais, embora o fator específico que desencadeia a resposta inflamatória não esteja definido. A obtenção de um marcador eficaz que, de forma isolada, seja capaz de diferenciar lesões orais de líquen plano e de lúpus eritematoso parece estar na dependência da descoberta de um antígeno específico responsável pela resposta imunológica do líquen. Enquanto isso não acontece, é crucial que pacientes portadores de lesões com aspecto liquenoide sejam avaliados de forma integral, o que contempla avaliação clínica, exames hematológicos, biópsia seguida de HE e imunofluorescência direta, bem como acompanhamento clínico. Os casos que apresentem indícios de lúpus eritematoso devem ser submetidos à avaliação reumatológica. Assim, o ponto crucial nessas doenças é o acompanhamento clínico sistemático dos pacientes, já que as mesmas representam processos dinâmicos que podem evoluir para situações mais graves.

7 CONCLUSÕES

- 7.1 A expressão imunohistoquímica de CD1a, CD4, CD8, CD20, caspase-3 e triptase, bem como a espessura da membrana basal em PAS não constituem critérios definidores para o diagnóstico diferencial entre lesões orais de líquen plano e de lúpus eritematoso.
- 7.2 A expressão imunohistoquímica de CD4, CD8 e CD20 é maior nas lesões orais de líquen plano do que nas de lúpus eritematoso, o que sugere que, no líquen, o infiltrado seja mais rico em linfócitos.
- 7.3 A triptase está mais expressada no epitélio das lesões orais de lúpus eritematoso, enquanto o CD1a prevalece tanto em epitélio quanto em conjuntivo das lesões orais de líquen plano.
- 7.4 As lesões orais de líquen plano e lúpus eritematoso parecem diferir no que se refere ao antígeno que suscita a resposta inflamatória, mas partilham a apoptose de células epiteliais e inflamatórias em sua patogenia.

8 REFERÊNCIAS

- ABDEL-LATIF, A.M.; ABUEL-ELA, H.A., EL-SHOURBAGY, S.H. Increased caspase-3 and altered expression of apoptosis-associated proteins, Bcl-2 and Bax in lichen planus. **Clin Exp Dermatol**, Nottingham, v. 34, n.3, p.390-395, Apr. 2009.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 4.ed., Porto Alegre: Artmed, 2006. 1464 p.
- AL-REFU, K.; GOODFIELD, M. Immunohistochemistry of structural changes in scarring lupus erythematosus. **Clin Exp Dermatol**, Nottingham, v.36, n.1, p.63-68, Jan. 2011.
- ARISAWA, E.A.L. et al. Clinicopathological analysis of oral mucous autoimmune disease: A 27 years study. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v.13, n.2, p.E94-97, Feb. 2008.
- BACHELET, I.; LEVI-SCHAFFER, F.; MEKORI, Y.A. Mast cells: not only in allergy. **Immunol Allergy Clin North Am**, Philadelphia, v.26, n.3, p.407-425, Aug. 2006.
- BAIMA, B.; STICHERLING, M. Apoptosis in different cutaneous manifestations of lupus erythematosus. **Br J Dermatol**, Oxford, v.144, n.5, p.958-966, May. 2001.
- BALTACI, M.; FRITSCH, P. Histologic features of cutaneous lupus erythematosus. **Autoimmun Rev**, Amsterdam, v.8, n.6, p.467-473, May 2009.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v.392, London, n.6673, p.245-252, Mar. 1998.
- BASCONES-ILUDAIN, C. et al. No differences in caspase-3 and Bax expression in atrophic-erosive vs. reticular oral lichen planus. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, Amsterdam, v.22, n.2, p.204-212, Feb. 2008.
- BERBERT, A.L.; MANTESE, S.A. Lúpus eritematoso cutâneo – Aspectos clínicos e laboratoriais. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v.80, n.2, p.119-131, 2005.
- BIJL, M. et al. Do elevated levels of serum-soluble Fas contribute to the persistence of activated lymphocytes in systemic lupus erythematosus? **J Autoimmun**, London, v.11, n.5, p.457-463, Oct. 1998.
- BLANCO, P. et al. Induction of dendritic cell differentiation by INF- α in systemic lupus erythematosus. **Science**, Washington, v.294, n.5546, p.1540-1543, Nov. 2001.
- BRENNAN, M.T. et al. Oral manifestations of patients with lupus erythematosus. **Dent Clin N Am**, Philadelphia, v.49, n.1, p.127-141, Jan. 2005.
- BURGE, S.M. et al. Mucosal involvement in systemic and chronic lupus erythematosus. **Br J Dermatol**, Oxford, v.121, n.6, p.727-741, Dec. 1989.

CAMPBELL, D. T.; STANLEY, J. C. **Delineamentos experimentais e quase experimentais de pesquisa**. São Paulo: EPU, 1979.

CARROZZO, M. Oral diseases associated with hepatitis C virus infection. Part 2: lichen planus and other diseases. **Oral Dis**, Oxford, v.14, n.3, p.217-228, Apr. 2008.

DANIELS, T.E.; QUADRA-WHITE, C. Direct immunofluorescence in oral mucosal disease: A diagnostic analysis of 130 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v.51, n.1, p.38-47, Jan. 1981.

DAVIES, M.G.; MARKS, R. Evolution of the lesion of discoid lupus erythematosus: a comparison with lichen planus. **Br J Dermatol**, Oxford, v.97, n.3, p. 313-322, Sep. 1977.

DHIR, V. et al. Increased T-lymphocyte apoptosis in lupus correlates with disease activity and may be responsible for reduced T-cell frequency: a cross-sectional and longitudinal study. **Lupus**, Hampshire, v.18, n.9, p.785-791, Aug. 2009.

DI FIORE, M.S.H.; MANCINI, R.E.; DE ROBERTS, E.D.P. **Novo atlas de histologia**. 2.ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1973.

DÖRNER, T.; JACOBI, A.M.; LIPSKY, P.E. B Cells in autoimmunity. **Arthritis Res Ther**, London, v.11, n.5, p.247-258, 2009.

EISEN, D. et al. Number V Oral lichen planus: clinical features and management. **Oral Dis**, Oxford, v.11, n.6, p.338-349, Nov. 2005.

EKLUND, K.K. Mast cells in the pathogenesis of rheumatic diseases and the potential targets for anti-rheumatic therapy. **Immunol Rev**, Copenhagen, v.217, p.38-52, Jun. 2007.

EVERSOLE, L.R. Immunopathogenesis of oral lichen planus and recurrent aphthous stomatitis. **Semin Cutan Med Surg**, Philadelphia, v.16, n.4, p.284-294, Dec. 1997.

FAYETTE, J. et al. Dendritic cells enhance the differentiation of naive B cells into plasma cells *in vitro*. **Scand J Immunol**, Oslo, v.48, n.6, p.563-570, Dec. 1998.

FARTHING, P.M.; SPEIGHT, P.M. Problems and pitfalls in oral mucosal pathology. **Cur Diag Pathol**, Sheffield, v.12, n.1, p.66-74, Feb. 2006.

FIRTH, N.A. et al. Assessment of the value of immunofluorescence microscopy in the diagnosis of oral mucosal lichen planus. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.19, n.7, p.295-297, Aug. 1990.

FROSSI, B. et al. Exploring a regulatory role for mast cells: MCregs? **Trends Immunol**, Oxford, v.31, n.3, p.97-102, Mar. 2010.

FUNAUCHI, M. et al. A possible role of apoptosis for regulating autoreactive responses in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, Hampshire, v.10, n.4, p.284-288, Apr. 2001.

GALLI, S.J.; GRIMBALDESTON, M.; TSAI, M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. **Nat Rev Immunol**, London, v.8, n.6, p.478-486, Jun. 2008.

GRIFFIN, C.J.; JOLLY, M.; SMYTHE, J.D. The fine structure of epithelial cells in normal and pathological buccal mucosa. II. Colloid body formation. **Aust Dent J**, St. Leonards, v.25, n.1, p.12-19, Feb. 1980.

GUSTAFSON, J. et al. Langerin-expressing and CD83-expressing cells in oral lichen planus lesions. **Acta Odontol Scand**, Stockholm, v.65, n.3, p.156-161, Jun. 2007.

HAO, J.H. et al. Elevated levels of serum soluble Fas are associated with organ and tissue damage in systemic lupus erythematosus among Chinese. **Arch Dermatol Res**, Berlin, v. 297, n.7, p.329-332, Jan. 2006.

HASSÉUS, B. et al. Langerhans cells and T cells in oral graft versus host disease and oral lichen planus. **Scand J Immunol**, Oslo, v.54, n.5, p.516-524, Nov. 2001.

HOCHBERG, M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v.40, n.9, p.1725, Sep. 1997.

HUSSEIN, M.A et al. Evaluation of the profile of the immune cell infiltrate in lichen planus, discoid lupus erythematosus, and chronic dermatitis. **Pathology**, London, v.40, n.7, p.682-693, Dec. 2008.

ISMAIL, S.B.; KUMAR, S.K.S.; ZAIN, R.B. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. **J Oral Sci**, Tokyo, v.49, n.2, p.89-106, Jun. 2007.

JAHANSHAH, G.; AMINZADEH, A. A histochemical and immunohistochemical study of mast cells in differentiating oral lichen planus from lichenoid reactions. **Quintessence Int**, Berlin, v.41, n.3, p.221-227, Mar. 2010.

JEFFERY, P.K. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 164, n.10 Pt2, p. 528-538, Nov. 2001.

JEFFERY, P.K. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Proc Am Thorac Soc**, New York, v.1, n.13, p. 176-183, 2004.

JONSSON, R. et al. Oral mucosal lesions in systemic lupus erythematosus – a clinical, histopathological and immunopathological study. **J Rheumatol**, Toronto, v.11, n.1, p.38-42, Feb. 1984.

JUNEJA, M. et al. Histochemical analysis of pathological alterations in oral lichen planus and oral lichenoid lesions. **J Oral Sci**, Tokyo, v.48, n.4, p.185-193, Dec. 2006.

KARJALAINEN, T.K.; TOMICH, C.E. A histopathologic study of oral mucosal lupus erythematosus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St Louis, v.67, n.5, p.547-554, May 1989.

KIM, H.; POMERANZ, M.K. Lupus erythematosus and lichen planus overlap syndrome. **J Drugs Dermatol**, New York, v.3, n.3, p.311-312, May-Jun. 2004.

KONTOS, A.P. et al. Immunoglobulin M predominance in cutaneous lupus erythematosus. **J Cutan Pathol**, Copenhagen, v.32, n.5, p.352-355, May 2005.

KUHN, A.; KRAMER, P.H.; KOLB-BACHOFEN, V. Pathophysiology of cutaneous lupus erythematosus – novel aspects. **Rheumatology**, Oxford, Suppl 3:iii14-16, Oct. 2006.

KULTHANAN, K. et al. Direct immunofluorescence study in patients with lichen planus. **Int J Dermatol**, Philadelphia, v. 46, n.12, p.1237-1241, Dec. 2007.

LI, Y., LEE, P.Y., REEVES, W.H. Monocyte and macrophages abnormalities in systemic lupus erythematosus. **Arch Immunol Ther Exp**, Warsaw, v.58, n.5, p.355-364, Oct. 2010.

LIESKER, J.J. et al. Reticular basement membrane in asthma and COPD: similar thickness, yet different composition. **Int J Chron Obstruct Pulm Dis**, Auckland, v.4, p.127-135, 2009.

LIPSKER, D. et al. The significance of the ‘dust-like particles’ pattern of immunofluorescence. A study of 66 cases. **Br J Dermatol**, Oxford, v.138, n.6, p.1039-1042, Jun. 1998.

LODI, G. et al. Current controversies in oral lichen planus: Report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.100, n.1, p.40-51, Jul. 2005.

LÓPEZ-LABADY, J. et al. Oral manifestations of systemic and cutaneous lupus erythematosus in a Venezuelan population. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.36, n. 9, p.524-527, Oct. 2007.

LORO, L.L.; VINTERMYR, O.K.; JOHANNESSEN, A.C. Apoptosis in normal and diseased oral tissues. **Oral Dis**, Oxford, v.11, n.5, p.274-287, Sep. 2005.

LOURENÇO, S.V. et al. Lupus erythematosus: clinical and histopathological study of oral manifestations and immunohistochemical profile of epithelial maturation. **J Cutan Pathol**, Copenhagen, v.33, n.10, p.657-662, Oct. 2006.

LOURENÇO, S.V. et al. Lupus erythematosus: clinical and histopathological study of oral manifestations and immunohistochemical profile of the inflammatory infiltrate. **J Cutan Pathol**, Copenhagen, v. 34, n.7, p.558-564, Jul. 2007.

METZ, M. et al. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. **Immunol Rev**, Copenhagen, v.217, p.304-328, Jun. 2007.

MOREIRA, C.; CARVALHO, M.A. **Reumatologia – diagnóstico e tratamento**. 2.ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 786 p.

MUNOZ, L.E. et al. Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, Hampshire, v.17, n.5, p.371-375, May 2008.

NAGAO, K.; CHEN, K.R. A case of lupus erythematosus/lichen planus overlap syndrome. **J Dermatol**, London, v.33, n.3, p.187-190, Mar. 2006.

NAVAS-ALFARO, S.E. et al. Análise histopatológica comparativa entre líquen plano oral e cutâneo. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v.39, n.4, p.351-360, 2003.

NEPPELBERG, E.; JOHANNESSEN, A.C.; JONSSON, R. Apoptosis in oral lichen planus. **Eur J Oral Sci**, Goteborg, v.109, n.5, p.361-364, Oct. 2001.

NEVILLE, B.W. et al. **Patologia Oral & Maxilofacial**. 2.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 798 p.

NICO, M.M. et al. Oral lesions in lupus erythematosus: correlation with cutaneous lesions. **Eur J Dermatol**, Lyon, v.18, n.4, p.376-81, Jul-Aug. 2008.

OMAR, A.H. et al. Oral lichen planus and chronic junctional stomatitis: differences in lymphocyte subpopulations. **Acta Odontol Scand**, Stockholm, v.67, n.6, p.366-369, Nov. 2009.

ORTEU, C.H. et al. Systemic lupus erythematosus presenting with oral mucosal lesion: easily missed? **Br J Dermatol**, Oxford, v.144, n.6, p.1219-1223, Jun. 2001.

PALUCKA, A.K. et al. The interplay of dendritic cell subsets in systemic lupus erythematosus. **Immunol Cell Biol**, Canberra, v.80, n.5, p.484-488, Oct. 2002.

PORTER, S.R. et al. Immunologic aspects of dermal and oral lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v.83, n.3, p.358-366, Mar. 1997.

POWERS, D.B. Systemic lupus erythematosus and discoid lupus erythematosus. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, Philadelphia, v.20, n.4, p.651-662, Nov. 2008.

REGEZI, J.A.; SCIUBBA, J.J.; JORDAN, R.C. **Oral Pathology: Clinical and Pathologic Correlations**. 5.ed., St. Louis: Saunders Elsevier, 2008. 418 p.

REN, Y. et al. Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v.48, n.10, p.2888-2897, Oct. 2003.

RENAUDINEAU, Y. et al. Dysfunctional B cells in systemic lupus erythematosus. **Autoimmun Rev**, Amsterdam, v.3, n.7-8, p.516-523, Nov. 2004.

RIBEIRO, B. F. et al. Marcadores biológicos e etiopatogenia do líquen plano bucal. **Odontol Clin-Cient**, Recife, v.9, n.1, p.19-23, Jan/Mar. 2010.

- ROBAK, E. et al. Clinical significance of circulating dendritic cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Mediators Inflamm**, Oxford, v.13, n.3, p.171-180, Jun. 2004.
- ROOPASHREE, M.R. et al. Pathogenesis of oral lichen planus – a review. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.39, n.10, p.729-734, Nov. 2010.
- ROTHFIELD, N.; SONTHEIMER, R.D.; BERNSTEIN, M. Lupus erythematosus: systemic and cutaneous manifestations. **Clin Dermatol**, Philadelphia, v.24, n.5, p.348-362, Oct. 2006.
- SAMITAS, K. et al. Osteopontin expression and relation to disease severity in human asthma. **Eur Respir J**, Copenhagen, v.37, n.2, p.331-341, Feb. 2011.
- SANTORO, A. et al. Recruitment of dendritic cells in oral lichen planus. **J Pathol**, Belfast, v.205, n.4, p.426-434, Mar. 2005.
- SATO, M. et al. Immunohistopathological study of the oral lichenoid lesions of chronic GVHD. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.35, n.1, p.33-36, Jan. 2006.
- SCHIÖDT, M.; HALBERG, P.; HENTZER, B. A clinical study of 32 patients with oral discoid lupus erythematosus. **Int J Oral Surg**, Copenhagen, v.7, n.2, p.85-94, Apr. 1978.
- SCHIÖDT, M. Oral discoid lupus erythematosus. III. A histopathologic study of sixty-six patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St Louis, v.57, n.3, p.282-293, Mar. 1984.
- SCOFIELD, R. H. et al. Autoimmune thyroid disease is associated with a diagnosis of secondary Sögren's syndrome in familial systemic lupus. **Ann Rheum Dis**, London, v.66, n.3, p.410-413, Mar. 2007.
- SCULLY, C.; CARROZZO, M. Oral mucosal disease: Lichen planus. **Br J Oral Maxillofac Surg**, Edinburgh, v.46, n.1, p.15-21, Jan. 2008.
- SEPEHER, A.; WENSON, S.; TAHAN, S.R. Histopathological manifestations of systemic diseases: the example of cutaneous lupus erythematosus. **J Cutan Pathol**, Copenhagen, v.37, suppl. 1, p.112-124, Apr. 2010.
- SHAHIDULLAH, M. et al. Chronic discoid lupus erythematosus: an immunopathological and electron microscopic study. **Ann Acad Med Singapore**, Singapore, v.24, n.6, p. 789-792, Nov. 1995.
- SHOUSA, S.; SVIRBELY, J. Immunohistochemical study of lichen planus. **J Clin Pathol**, London, v.30, n.6, p.569-574, Jun. 1977.
- SKLAVOUNOU, A. et al. TNF-alpha expression and apoptosis-regulating proteins in oral lichen planus: a comparative immunohistochemical evaluation. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.29, n.8, p.370-375, Sep. 2000.

SKLAVOUNOU-ANDRIKOPOULOU, A. et al. Elevated serum levels of the apoptosis related molecules TNF- α , Fas/Apo-I and Bcl-2 in oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.33, n.7, p.386-390, Aug. 2004.

SOHN, S.W. et al. Atopy may be an important determinant of subepithelial fibrosis in subjects with asymptomatic airway hyperresponsiveness. **J Korean Med Sci**, Seoul, v.23, n.3, p. 390-396, Jun. 2008.

SUGERMAN, P.B.; SAVAGE, N.W. Oral lichen planus: Causes, diagnosis and management. **Aust Dent J**, Sydney, v.47, n.4, p.290-297, Dec. 2002.

SUGERMAN, P.B. et al. The pathogenesis of oral lichen planus. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v.13, n.4, p.350-365, 2002.

TAGAYA E.; TAMAOKI, J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. **Allergol Int**, Carlton, v.56, n.4, p.331-340, Dec. 2007.

TAN, E.M. et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v.25, n.11, p.1271-1277, Nov. 1982.

TOBÓN-ARROYAVE, S.I. et al. Expression of caspase-3 and structural changes associated with apoptotic cell death of keratinocytes in oral lichen planus. **Oral Dis**, Oxford, v.10, n.3, p.173-178, May 2004.

TSUCHIDA, T. Classification of lupus erythematosus based upon Japanese patients. **Autoimmun Rev**, Amsterdam, v.8, n.6, p.453-455, May 2009.

VILLARROEL DORREGO, M. et al. Oral lichen planus: immunohistology of mucosal lesions. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.31, n.7, p.410-414, Aug. 2002.

WALLING, H.W.; SONTHEIMER, R.D. Cutaneous lupus erythematosus: issues in diagnosis and treatment. **Am J Clin Dermatol**, Auckland, v.10, n.6, p.365-381, 2009.

WOUTERS, C.H. et al. The circulating lymphocyte profiles in patients with discoid lupus erythematosus and systemic lupus erythematosus suggest a pathogenic relationship. **Br J Dermatol**, Oxford, v.150, n.4, p.693-700, Apr. 2004.

WU, Y.H.; LIN, Y.C. Cytooid bodies in cutaneous direct immunofluorescence examination. **J Cutan Pathol**, Copenhagen, v.34, n.6, p.481-486, Jun. 2007.

YANAGIDA, M. et al. Effects of T-helper 2-type cytokines, interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-6 on the survival of cultured human mast cells. **Blood**, New York, v.86, n.10, p.3705-3714, Nov. 1995.

ZHAO, Z.Z. et al. Immunohistochemical localization of mast cells and mast cell-nerve interactions in oral lichen planus. **Oral Dis**, Oxford, v.3, n.2, p.71-76, Jun. 1997.

ZHAO, Z.Z. et al. Mast cell/T cell interaction in oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.31, n.4, p. 189-195, Apr. 2002.

ZHOU, X.J. et al. Intra-epithelial CD8⁺ T cells and basement membrane disruption in oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.31, n.1, p.23-27, Jan. 2002.

ANEXO A



Comissão Científica e de Ética Faculdade da Odontologia da PUCRS

Porto Alegre 01 de outubro de 2008

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0056/08
Intitulado: Diagnóstico diferencial de lesão orais de líquen plano e lúpus eritematoso por meio de pas e imunoistoquímica
Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Karen Cherubini
Pesquisadores Associados Márcia Fava
Nível: Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 20 de agosto de 2008.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEP/PUCRS

Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO B



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-1470/08

Porto Alegre, 12 de dezembro de 2008.

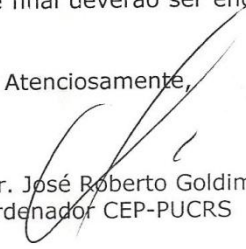
Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 08/04400 intitulado: **“Diagnóstico diferencial de lesões orais de líquen plano e lúpus erimatetoso por meio de pas e imunoistoquímica”**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
Coordenador CEP-PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Karen Cherubini
Faculdade de Odontologia
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO C

American College of Rheumatology criteria for SLE ¹²	
Criterion	Definition
1. Malar rash	Fixed erythema, flat or raised, over the malar eminences tending to spare the nasolabial folds
2. Discoid rash	Erythematous raised patches with adherent keratotic scaling and follicular plugging; atrophic scarring may occur in older lesions
3. Photosensitivity	Skin rash as a result of unusual reaction to sunlight, by patient history or physician observation
4. Oral ulcers	Oral or nasopharyngeal ulceration, usually painless, observed by physician
5. Arthritis	Nonerosive arthritis involving two or more peripheral joints characterized by tenderness, swelling, or effusion
6. Serositis	a) Pleuritis—convincing history of pleuritic pain or rubbing heard by a physician or evidence of pleural effusion
	OR
	b) Pericarditis—documented by electrocardiogram or rub or evidence of pericardial effusion
7. Renal disorder	a) Persistent proteinuria >0.5 g per day or >3+ if quantitation not performed
	OR
	b) Cellular casts—may be red cell, hemoglobin, granular, tubular, or mixed
8. Neurologic disorder	a) Seizures—in the absence of offending drugs or known metabolic derangements (eg, uremia, ketoacidosis, or electrolyte imbalance)
	OR
	b) Psychosis—in the absence of offending drugs or known metabolic derangements (eg, uremia, ketoacidosis, or electrolyte imbalance)
9. Hematologic disorder	a) Hemolytic anemia—with reticulocytosis
	OR
	b) Leukopenia—<4000/mm total on two or more occasions
	OR
	c) Lymphopenia—<1500/mm on two or more occasions
	OR
	d) Thrombocytopenia—<100,000/mm in the absence of offending drugs
10. Immunologic disorder	a) Positive LE cell preparation
	OR
	b) Anti-DNA—antibody to native DNA in abnormal titer
	OR
	c) Anti-Sm—presence of antibody to Sm nuclear antigen
	OR
	d) False-positive serologic test for syphilis known to be positive for at least 6 months and confirmed by <i>Treponema pallidum</i> immobilization or fluorescent treponemal antibody absorption test
11. Antinuclear antibody	An abnormal titer of antinuclear antibody by immunofluorescence or an equivalent assay at any point in time and in the absence of drugs known to be associated with drug-induced lupus syndrome

Fonte: POWERS, D.B. Systemic lupus erythematosus and discoid lupus erythematosus. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, Philadelphia, v.20, n.4, p.651-662, Nov. 2008.