

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação

Avaliação da expressão da proteína NOD 1 no líquen plano oral

Rafael Machado Karsburg

Pelotas, 2014

Rafael Machado Karsburg

Avaliação da expressão da proteína NOD 1 no líquen plano oral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração Diagnóstico Bucal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Etges

Co-Orientador: Prof. Dr. Fábio Renato Manzolli Leite

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

K18a Karsburg, Rafael Machado

Avaliação da expressão da proteína nod1 no líquen plano oral / Rafael Machado Karsburg ; Adriana Etges, orientadora ; Fábio Renato Manzolli Leite, Sandra Beatriz Chaves Tarquinio, coorientadores. — Pelotas, 2014.

78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Proteínas adaptadoras de sinalização no. 2. Imuno-histoquímica. 3. Líquen plano bucal. I. Etges, Adriana, orient. II. Leite, Fábio Renato Manzolli, coorient. III. Tarquinio, Sandra Beatriz Chaves, coorient. IV. Título.

CDD : D6

Rafael Machado Karsburg

Avaliação da Expressão da proteína NOD 1 no Líquen Plano Oral

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de Concentração em Diagnóstico Bucal, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

29 de outubro de 2014.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Adriana Etges (Orientadora)
Doutora em Patologia Bucal pela Universidade de São Paulo

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Uchoa Vasconcelos
Doutora em Estomatologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Lisandrea Rocha Schardosim
Doutora em Estomatologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Dedico esta dissertação aos meus familiares, amigos
e aos mestres que me inspiram.

Agradecimentos

À minha família pelo amor, incentivo e apoio sempre presentes.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Adriana Etges, pela paciência, serenidade, orientação e compreensão das minhas oscilações de planejamento de vida.

Aos meus co-orientadores, pela sempre presente prontidão em ajudar.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia e da área de concentração em Diagnóstico Bucal, por ter possibilitado o trancamento de minha matrícula enquanto terminava o curso de residência e pela flexibilização dos horários para possibilitar o serviço militar em concomitância ao curso.

Aos senhores Diretores do Hospital de Guarnição de Bagé, Coronel Marques e Tenente-Coronel Glauco, e aos Chefes do Gabinete Odontológico, Major Moreira, 1º Tenente Habekost e 1º Tenente Maria Luisa, por permitirem o trabalho em turno dobrado e a possibilidade de um dia livre para cursar o mestrado.

Aos professores da Patologia, pelo convívio e troca de experiências constantes.

Às técnicas em laboratório Ivanna e Silvana, pela harmonização do ambiente e conhecimento na realização da parte prática do trabalho.

Aos colegas de mestrado, pelo companheirismo, ajuda e risadas.

À minha sócia, CD Priscila Dias Gonçalves, por segurar os rojões de nossa clínica enquanto eu estava ausente.

Ao meu anjo da guarda por permitir 156 idas e vindas de Bagé, 28.080 km, para terminar o mestrado, apenas com um arranhão no dedo e uma perda total de um carro.

Resumo

KARSBURG, Rafael Machado. **Avaliação da expressão da proteína NOD 1 no líquen plano oral**. 2014. 78f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O Líquen Plano Oral (LPO) é uma doença inflamatória crônica mediada por células T que acomete a mucosa oral. Estima-se que a doença afete cerca de 1 a 2% da população geral adulta, com preferência por mulheres. Seu mecanismo etiopatogênico é obscuro, existindo quatro teorias para o seu desenvolvimento, provavelmente estando ligada a uma resposta imune de origem celular. Em 2003 foi descoberta a proteína *Toll* como chave reguladora do sistema imune inato em inseto, sendo identificadas em humanos proteínas homólogas, sendo as Proteínas Receptoras de Domínio de Ligação a Nucleotídeos e Oligomerização – NOD (NLR) as mais representativas e estudadas. A proteína NOD1 foi encontrada no epitélio da mucosa oral normal, sendo que o TLR2 e TLR4 já foram identificados com expressão aumentada no LPO. Além disso, já foram relacionadas mutações nas proteínas NOD1 com o desenvolvimento de doenças sistêmicas. O objetivo deste estudo foi de identificar a marcação da proteína NOD1 através da imunoistoquímica em lesões de líquen plano oral e em fragmentos de mucosa oral sadia. Foram contados quatro campos de células próximo ao epitélio localizadas no infiltrado inflamatório em banda e quatro campos logo abaixo dos mesmos em cada lâmina. O anticorpo utilizado marcou plasmócitos, havendo estatisticamente maior número destas células marcadas em biópsias dolorosas e com maior tempo de evolução, e menor em lesões do tipo estriadas. Nos campos superiores e inferiores, houve marcação significativamente maior no grupo teste quando comparado ao controle. Os resultados sugerem que existem diferenças na marcação do anticorpo entre pacientes com LPO e saudáveis, onde a contagem de plasmócitos tende a ser maior com a evolução da doença, em lesões dolorosas e menor em lesões estriadas.

Palavras-chave: proteínas adaptadoras de sinalização nod; imuno-histoquímica; líquen plano bucal

Abstract

KARSBURG, Rafael Machado. **Evaluation of the expression of NOD1 protein in oral lesions of lichen planus.** 2014. 78p. Dissertation – Federal University of Pelotas.

Oral lichen planus (OLP) is a chronic inflammatory disease mediated by T cells that affects the oral mucosa. It is estimated that the disease affects about 1 to 2% of the adult general population, with a preference for women. Their etiopathogenic mechanism is unclear, four theories exist for the development, probably being connected to an immune response of cellular origin. In 2003 Toll protein was identified as a key regulator of the innate immune system in insects, identified in human homologous proteins, being the Receptor-Binding Domain Nucleotide and Oligomerization - NOD (NLR) the most representative protein studied. The NOD1 protein was found in the epithelium of normal mucosa, whereas TLR2 and TLR4 have been identified with increased expression in OLP. Also, have linked mutations in NOD1 proteins with the development of systemic diseases. The aim of this study was to identify the marking NOD1 protein by immunohistochemistry in oral lichen planus lesions and healthy oral mucosa fragments. Four fields near the epithelial cells located in the inflammatory infiltrate in band and four fields just below the same on each slide were counted. The antibody used marked plasma cells, with statistically greater number of these cells marked in painful biopsies and more development time, and lower in the striae type injuries. In the upper and lower fields, there was significantly higher mark in the test group compared to the control. The results suggest that there are differences in the marking of the antibody in patients with OLP and controls, where the plasma cell count tends to increase with disease progression in painful and smaller lesions in striatal lesions.

Key-words: nod signaling adaptor proteins; immunehistochemistry; oral lichen planus

Lista de Figuras

Figura 1	Representação esquemática da apresentação antigênica e ativação das células T citotóxicas na Teoria da Resposta Imune Antígeno Específica18
Figura 2	Representação esquemática dos mecanismos de apoptose dos queratinócitos na Teoria da Resposta Imune Antígeno Específica19
Figura 3	Representação esquemática da função da membrana basal na patogênese Imune Não-Específica do LPO20
Figura 4	Representação esquemática das quimiocinas na Teoria da Resposta Imune Antígeno Específica20
Figura 5	Representação esquemática da participação das células apresentadoras de antígeno na teoria da patogênese autoimune22
Figura 6	Representação esquemática dos mecanismos de sinalização intracelular dos TLR27
Figura 7	Representação esquemática dos mecanismos de sinalização intracelular dos NOD1 e NOD229

Lista de Tabelas

Tabela 1	Relação dos principais tipos celulares e ligantes dos TLR.....	24
----------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

AP-1	Proteína Ativadora 1
BIR	Domínio de Repetições de Inibições de Baculovirus
CARD	Domínio de Recrutamento de Caspase
CLR	Proteínas Receptoras Lectinatipo-C
CpG	Citosina que precede uma Guanina
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GVHD	Doença do Enxerto Versus Hospedeiro
HSP	Proteínas de Choque Térmico
iE-DAP	Dipeptídeo γ -D-meso-glutamil-ácido Diaminopimélico
INF- β	Interferon Beta
IFN- γ	Interferon Gama
IFN-I	Interferon-I
IKK	Complexo I κ B Quinase
IKKi	Quinase IKKi/IKK
IgE	Imunoglobulina E
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IRAK1	Quinase 1 Associada ao Receptor de Interleucina-1
IRAK4	Quinase 4 Associada ao Receptor de Interleucina-1
IRF3	Fator Regulador 3 de Interferon
JNK	Quinase c-Jun N-Terminal
LPO	Líquen Plano Oral
LPS	Lipopolisacarídeo
LRR	Repetições Ricas em Leucina
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos

MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos-1
MDP	Dipeptídeo Muramil
MHC II	Complexo Principal de Histocompatibilidade II
MHC I	Complexo Principal de Histocompatibilidade I
MKK4	Proteínas MAP Quinase Quinase 4
MKK7	MAP Quinase Quinase 7
MMP-9	Metaloproteinase-9
mRNA	RNA mensageiro
MyD88	Proteína de Diferenciação de Resposta Mielóide Primária
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
NLR	Proteínas Receptoras de Domínios NOD
NOD	Domínio de Ligação a Nucleotídeos e Oligomerização
PA	Pró-Análise
Pam3CSSNA	Lipopeptídeo Sintético Tipo Triacil de <i>Escherichia coli</i>
PGN	Peptidoglicano
PGRP	Proteínas de Reconhecimento de Peptidoglicanos
PMAP	Padrão Molecular Associado a Patógenos
PRP	Proteínas Reconhecedoras de Patógenos
PYD	Domínio Pirina
RANTES	Quimiocina Reguladora da Ativação Normal e da Expressão e Secreção de Células
RCA	Solicitador de Atividade Citotóxica
RICK	Serina-Treonina Quinase
RLR	Receptores Gene Induzido pelo Ácido Retinóico- <i>like</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
TA	temperatura ambiente
TAB	Proteína que Liga a TAK1
TAG	Adaptador de TRAM com o Domínio Dinâmico de Golgi
TAK-1	Quinase Ativada pelo Fator de Crescimento Transformante β
TBK1	Quinase 1 Ligadora do Gene TANK
TGF-β1	Fator de Crescimento Transformante Beta 1
TIR	Domínio de <i>Toll-like</i> e Interleucina-1
TIRAP	Proteína Adaptadora Contendo domínio TIR

TLR	Proteínas Receptoras Toll- <i>like</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TNF-R1	Receptor Solúvel-1 de Necrose Tumoral Alfa
TRAF6	Fator 6 Associado ao Receptor de Fator de Necrose Tumoral
TRAM	Molécula Adaptadora Relacionada com a TRIF
TRIF	Proteína Adaptadora Contendo Domínio TIR Induzindo Interferon β
TRIS-HCl	Hidroximetil-amino-metano

Sumário

1 Introdução.....	14
2 Projeto de Pesquisa	16
2.1Antecedentes e justificativa	16
2.1.1 Líquen Plano Oral (LPO)	16
2.1.1.1 Teoria da resposta imune antígeno-específica	17
2.1.1.2 Teoria da resposta imune não-específica	19
2.1.1.3 Teoria de autoimunidade	21
2.1.1.4 Teoria humoral	23
2.1.2 Proteínas Reconhecedoras de Patógenos (PRP)	23
2.1.2.1 Proteínas Receptoras do tipo <i>Toll</i>	24
2.1.2.1.1 Via MyD88-dependente	25
2.1.2.1.2 Via MyD88-independente	26
2.1.2.2 Proteínas Receptoras tipo NOD	27
2.1.2.2.1 NOD1 e NOD2	28
2.1.2.3 Expressão das PRP no LPO e epitélio oral normal	30
2.1.2.4 Associação das NOD1 e NOD2 com doenças	33
2.2 Justificativa e Hipóteses	34
2.3 Objetivos.....	37
2.3.1 Objetivos gerais	37
2.3.2 Objetivos específicos	37
2.4 Material e métodos.....	38
2.4.1 Seleção da amostra	38
2.4.1.1 Critérios de Inclusão	38
2.4.1.2 Critérios de Exclusão	38
2.4.2 Revisão dos prontuários clínicos e cirúrgicos	38
2.4.3 Revisão das lâminas histológicas	38
2.4.4 Técnica imunoistoquímica para evidenciação da NOD1 e NOD2	39
2.4.5 Análise dos cortes histológicos	40
2.4.6 Análise estatística	40

2.4.7 Considerações Éticas	41
2.5 Cronograma	42
2.6 Orçamento	43
Referências	44
3 Relatório de Trabalho de Campo	51
4 Artigo.....	53
5 Considerações Finais	73
Anexo A - Ficha Clínica e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca – UFPel	75
Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	77
Anexo C – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	78

1 Introdução

O Líquen Plano Oral (LPO) é uma doença inflamatória crônica mediada por células T que acomete a mucosa oral (Sugerman, Savage *et al.*, 2002). Sua apresentação clínica pode ser verificada pela observação de estrias, pápulas e placas brancas, eritemas, erosões, úlceras, além de vesículas ou bolhas que acometem predominantemente a mucosa jugal, a língua e a gengiva (Silverman, Gorsky *et al.*, 1991).

Estima-se que o LPO afete cerca de um a dois por cento da população geral de adultos, afetando 1,4 mulheres para cada homem (Axell e Rundquist, 1987) encontrada, preferencialmente, na quinta década de vida (Vincent, Fotos *et al.*, 1990; Chainani-Wu, Silverman *et al.*, 2001). As lesões são usualmente bilaterais e dolorosas quando se apresentam da forma erosiva ou ulcerada (Scully e El-Kom, 1985; Eisen, 1993).

Embora a etiologia permaneça não esclarecida, existem indícios de que a doença seja mediada por células T CD8+ citotóxicas contra os queratinócitos basais, resultando em degeneração vacuolar, lise e apoptose das células basais (Walsh, Savage *et al.*, 1990; Crincoli, Di Bisceglie *et al.*, 2011).

Existem quatro mecanismos desenvolvidos para hipotetizar a imunopatogênese do LPO: a resposta imune antígeno-específica mediada por células; a resposta imune não-específica; a resposta autoimune e a imunidade humoral (Roopashree, Gondhalekar *et al.*, 2010b).

No ano de 2003 foi identificada a presença da proteína Toll em insetos do gênero *Drosophila melanogaster* como sendo a chave reguladora do sistema imune inato destes organismos (Hoffmann, 2003). A partir desta descoberta, foram identificadas em humanos proteínas com funções homólogas as encontradas nos insetos, as Proteínas Receptoras do tipo Toll (TLR) (Kawai e Akira, 2006).

Novas proteínas reconhecedoras de antígenos foram descobertas, sendo conhecidas quatro famílias de proteínas que compõe o sistema imune inato, as proteínas Receptoras do tipo Toll (TLR), as Proteínas Receptoras com Domínios de Ligação à Nucleotídeos e Oligomerização (NOD) (abreviada como NLR), os

Receptores Gene Induzido pelo Ácido Retinóico-*like* (RLR) e as Proteínas Receptoras de Lectina tipo-C (CLR) (Mathews, Sprakes *et al.*, 2008).

Os receptores NLR estão presentes no citosol das células do sistema imune inato, fazendo parte de um sistema de detecção de moléculas nocivas ou de origem microbiana presentes no meio intracelular (Mathews, Sprakes *et al.*, 2008).

Os receptores intracelulares NOD1 e NOD2 são os representantes mais conhecidos do grupo NOD. Essas proteínas são sensibilizadas por moléculas bacterianas liberadas durante a produção e degradação da peptidoglicanos. A NOD1 reconhece o Dipeptídeo γ -D-meso-glutamil-ácido Diaminopimérico (iE-DAP) (Chamaillard, Hashimoto *et al.*, 2003; Girardin, Boneca, Carneiro *et al.*, 2003), produzido pela maioria das bactérias gram-negativas e específicos gram-positivos (Hasegawa, Yang *et al.*, 2006). Em contrapartida, a NOD2 é ativada pelo Dipeptídeo Muramil (MDP), um componente presente, virtualmente, em todos os tipos de peptidoglicano (Girardin, Boneca, Viala *et al.*, 2003; Inohara, Ogura *et al.*, 2003).

Diversos estudos têm identificado uma expressão diferenciada de proteínas reconhecedoras de patógenos em lesões cutâneas e orais de líquen plano, como um aumento da expressão de TLR1, TLR2 (Salem, Abu-Zeid *et al.*, 2012) e TLR4 (Janardhanam, Prakasam *et al.*, 2012), e a redução das expressão da TLR7, TLR8, TLR9 (Ohno, Tateishi *et al.*, 2011).

A importância dos Receptores Reconhedores de Patógenos foi ressaltada com o descobrimento da associação de doenças humanas inflamatórias com alterações genéticas nos genes decodificadores dessas proteínas (Kanneganti, Lamkanfi *et al.*, 2007). No caso da NOD1, o seu polimorfismo é associado ao desenvolvimento de eczema atópico, asma e ao aumento das concentrações séricas de Imunoglobulina E (IgE) (Hysi, Kabesch *et al.*, 2005).

A hipótese deste estudo é de que a marcação da proteína NOD1 no infiltrado inflamatório das lesões de LPO poderá ser diferente quando comparado à mucosa oral sadia.

2 Projeto de Pesquisa

2.1 Antecedentes e Justificativa

2.1.1 Líquen Plano Oral (LPO)

O LPO é uma doença inflamatória crônica mediada por células T que acomete a mucosa oral (Sugerman, Savage *et al.*, 2002). Sua apresentação clínica pode ser verificada pela observação de estrias, pápulas e placas brancas, eritemas, erosões, úlceras, além de vesículas ou bolhas que acometem predominantemente a mucosa jugal, a língua e a gengiva (Silverman, Gorsky *et al.*, 1991).

Estima-se que o LPO afete cerca de um a dois por cento da população geral de adultos, sendo a doença não infecciosa da mucosa oral mais comum, afetando 1,4 mulheres para cada homem (Axell e Rundquist, 1987) encontrada, preferencialmente, na quinta década de vida (Vincent, Fotos *et al.*, 1990; Chainani-Wu, Silverman *et al.*, 2001). As lesões são usualmente bilaterais e dolorosas quando se apresentam da forma erosiva ou ulcerada (Scully e El-Kom, 1985; Eisen, 1993).

Podem estar presentes lesões cutâneas típicas descritas como pápulas lisas e violáceas afetando os pulsos, tornozelos e genitálias. O envolvimento das unhas resulta em pterígio e perda permanente da unha. Quando acomete o couro cabeludo, o líquenplano promove a alopecia da área afetada (Sugerman, Savage *et al.*, 2000).

Embora a etiologia permaneça não esclarecida, existem indícios de que a doença seja mediada por células T CD8+ citotóxicas contra os queratinócitos basais, resultando em degeneração vacuolar, lise e apoptose das células basais (Walsh, Savage *et al.*, 1990; Crincoli, Di Bisceglie *et al.*, 2011).

Existem quatro mecanismos desenvolvidos para hipotetizar a imunopatogênese do LPO: a resposta imune antígeno-específica mediada por células; a resposta imune não-específica; a resposta autoimune e a imunidade humoral (Roopashree, Gondhalekar *et al.*, 2010b).

2.1.1.1 Teoria da resposta imune antígeno-específica

Na teoria da resposta imune antígeno-específica, o antígeno para o líquen plano é desconhecido, sendo a expressão antigênica nos queratinócitos a primeira etapa do processo, que é induzida por fármacos, alérgenos, trauma mecânico, agentes biológicos ou agentes indefinidos (Sugerman, Savage *et al.*, 2002).

Os antígenos são apresentados aos linfócitos T CD4+ *helper* e T CD8+ citotóxico pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade II (MHC II) nos endossomos e pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade I (MHC I) no citosol, respectivamente. Pela localização ser diferente, sugere-se a participação de múltiplos antígenos ou de um único que é apresentado e reconhecido tanto no citosol quanto no endossomo (Sugerman, Savage *et al.*, 2002; Zhou, Sugerman *et al.*, 2002).

A expressão do antígeno pelos queratinócitos propicia a migração dos linfócitos T para o epitélio. Acredita-se que eles se instalem no epitélio por reconhecer o antígeno durante sua vigilância de rotina ou através de citocinas quimiotáticas secretadas pelo queratinócitos (Sugerman, Savage *et al.*, 2002; Lodi, Scully *et al.*, 2005). Os linfócitos T CD8+ citotóxicos, que possuem em sua superfície um hipotético Solicitador de Atividade Citotóxica (RCA), são ativados pela ligação do antígeno ao complexo MHC I nos queratinócitos. Os linfócitos T CD4+ *helper* são ativados pela secreção de Interleucina-12 (IL-12) da ligação do antígeno com o MHC II presentes nos queratinócitos ou células de Langerhans. Os linfócitos T CD4+ *helper* ativam mais linfócitos T CD8+ citotóxicos através da RCA, da Interleucina-2 (IL-2) e Interferon- γ (IFN- γ) (Sugerman, Savage *et al.*, 2002; Zhou, Sugerman *et al.*, 2002) (Figura 1).

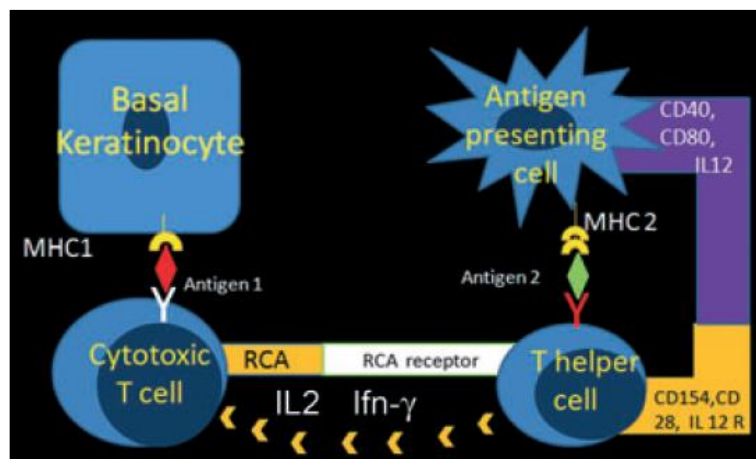


Figura 1 – Representação esquemática da apresentação antigênica e ativação das células T citotóxicas na Teoria da Resposta Imune Antígeno-Específica.

Fonte: ROOPASHREE *et al.*, 2012.

Em sequência, as células T citotóxicas secretam o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) que desencadeia a apoptose dos queratinócitos, através de mecanismos ainda não esclarecidos. Os mecanismos de indução da apoptose propostos são: 1) secreção de TNF- α pela célula T e ligação ao receptor TNF- α R1 na superfície do queratinócito; 2) secreção de fas-ligante (Fas-L ou CD95L) e sua ligação com o CD95 na superfície dos queratinócitos e 3) secreção de granzima B e penetração no interior da células através de poros induzidos pela perforina. Todos estes mecanismos ativam a cascata caspase, resultando na apoptose celular (Sugerman, Savage *et al.*, 2002) (Figura 2).

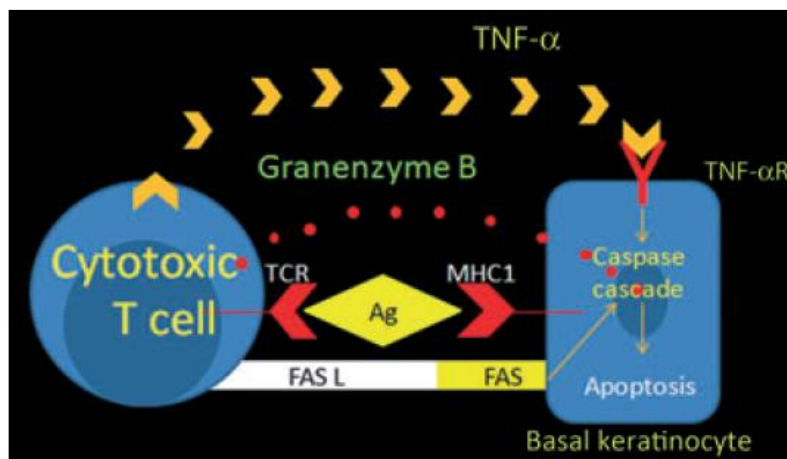


Figura 2 - Representação esquemática dos mecanismos de apoptose dos queratinócitos na Teoria da Resposta Imune Antígeno-Específica.

Fonte: ROOPASHREE *et al.*, 2012.

2.1.1.2 Teoria da Resposta Imune não-específica

Devido ao fato de algumas das células T presentes nas lesões de LPO não serem específicas, acredita-se que a destruição da camada basal ocorra pela invasão do infiltrado inflamatório por algum motivo inflamatório prévio, pensando estar relacionado com a membrana basal, as metaloproteinases, as citocinas ou os mastócitos (Chainani-Wu, Silverman *et al.*, 2001; Sugerman, Savage *et al.*, 2002; Lodi, Scully *et al.*, 2005).

Os queratinócitos detêm o papel de secreção de colágeno tipo IV e laminina V, contribuindo para a manutenção da membrana basal. Em contrapartida, a membrana basal envia sinais de sobrevivência aos queratinócitos basais, o que previne a apoptose celular (Sugerman, Savage *et al.*, 2002). Acredita-se que os queratinócitos apoptóticos não desempenhem corretamente o papel de manutenção da membrana basal, que por sua vez não realiza sua função de prevenção de apoptose celular, causando a destruição do epitélio, gerando um ciclo vicioso que explica a natureza crônica da doença (Figura 3) (Sugerman, Savage *et al.*, 2002; Lodi, Scully *et al.*, 2005).

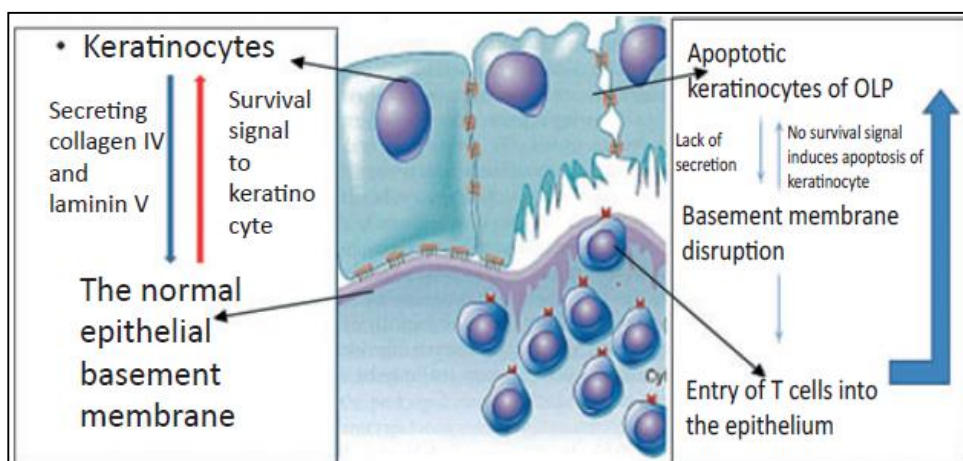


Figura 3 – Representação esquemática da função da membrana basal na patogênese Imune Não-Específica do LPO.

Fonte: ROOPASHREE *et al.*, 2012.

Identificou-se uma prevalência maior de metaloproteinase-9 (MMP-9), uma gelatinase responsável pela degradação de proteínas da matriz do tecido conjuntivo, em células T de lesões de LPO, quando comparadas a controles hígidos. Acreditando-se assim, que os linfócitos T do LPO apresentem maior quantidade de ativadores da MMP-9, o que causaria a destruição da membrana basal (Zhou, Sugerman *et al.*, 2001; Sugerman, Savage *et al.*, 2002) (Figura 4).

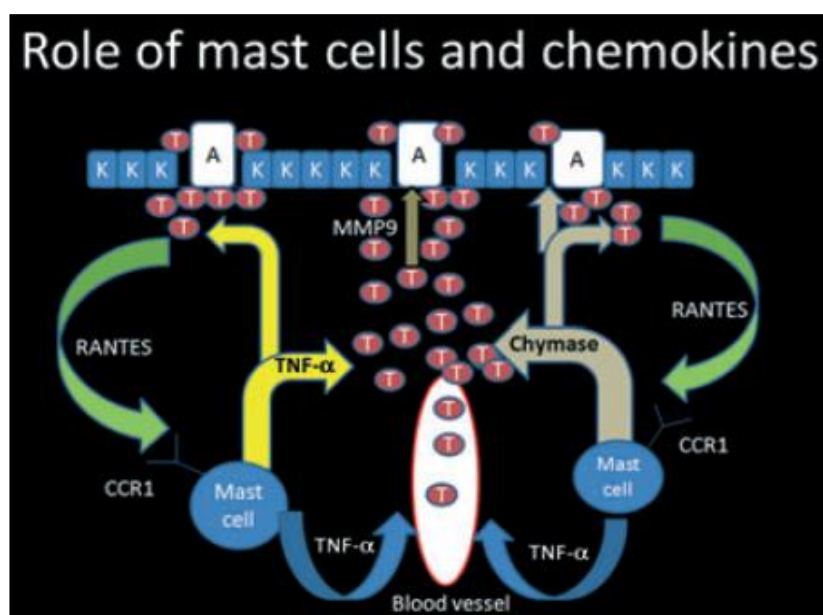


Figura 4 - Representação esquemática das quimiocinas na Teoria da Resposta Imune Antígeno-Específica.

Fonte: ROOPASHREE *et al.*, 2012.

Os linfócitos T do LPO secretam a Quimiocina Reguladora da Ativação Normal e da Expressão e Secreção de Células T (RANTES), responsável pelo recrutamento de linfócitos, monócitos, células *natural killer*, eosinófilos, basófilos e mastócitos (Zhao, Sugerman *et al.*, 2001; Sugerman, Savage *et al.*, 2002). Acredita-se que a secreção de RANTES pelas células T lesionais atraia e estimule a degradação dos mastócitos, que liberam TNF- α , responsável pela *up-regulation* dos receptores de quimiocina CCR1; e quimase, uma protease de mastócitos ativadora de MMP9, causando a degradação celular e gerando uma estimulação da secreção cíclica de RANTES pelos linfócitos T (Sugerman, Savage *et al.*, 2002).

2.1.1.3 Teorias de autoimunidade

A hipótese do líquen plano ter patogênese autoimune é suportada pelas características clínicas de acometer preferencialmente mulheres adultas, ter caráter crônico, estar associado com outras doenças autoimunes, ter associação com outros tecidos e apresentar clones de células T autotóxicas (Sugerman, Savage *et al.*, 2002), sendo propostas quatro teorias de patogênese autoimune (Roopashree, Gondhalekar *et al.*, 2010b).

A primeira teoria tem como hipótese uma deficiência do Fator de Crescimento Transformante Beta 1 (TGF- β 1) no LPO, o qual possui efeito imunossupressor, e que predisporia a uma inflamação linfocitária autoimune. O balanço entre o TGF- β 1 e o IFN- γ determinaria a atividade das lesões no LPO. Esta aumentaria a produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ Th1 e causaria a *downregulation* do efeito imunossupressor do TGF- β 1, estimulando a expressão do MHC-II nos queratinócitos e a atividade citotóxica das células T (Sugerman, Savage *et al.*, 2002; Lodi, Scully *et al.*, 2005).

A segunda teoria da patogênese autoimune sugere que a mucosa oral normal tem propriedade de induzir a apoptose de células inflamatórias infiltrantes similarmente ao que acontece nos olhos, testículos e placenta. Esse processo ocorreria através da produção de TNF- α pela camada de queratinócitos basais, induzindo a apoptose das células inflamatórias através do Receptor Solúvel-1 de Necrose Tumoral Alfa (TNF-R1). Além disso, também agiria através da expressão do Fas L (CD95L) no estroma, que induziria a apoptose das células inflamatórias que expressam Fas (CD95), um ligante de TNF. Acredita-se que uma falha neste sistema

levaria ao desenvolvimento do LPO e outras doenças autoimunes orais (Sugerman, Savage *et al.*, 2002; Roopashree, Gondhalekar *et al.*, 2010b).

A terceira teoria autoimune credita a patogênese do LPO a uma falha no sistema de maturação das células de defesa, no qual as células apresentadoras de antígenos, após a fagocitose de corpos apoptóticos, seriam erroneamente maturadas, apresentando os corpos apoptóticos aos linfócitos T *helper*, o que desencadearia uma resposta imune específica contra o queratinócito através de células T CD8+ (Sugerman, Savage *et al.*, 2002; Roopashree, Gondhalekar *et al.*, 2010b).

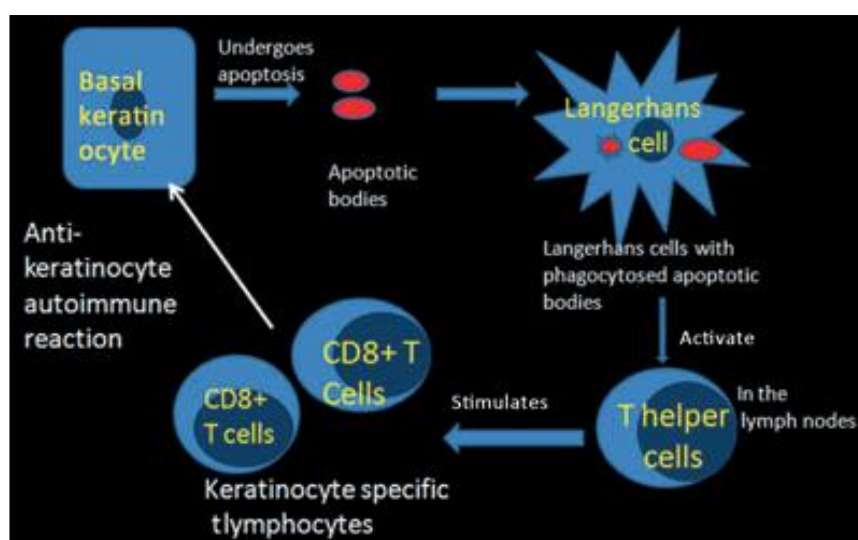


Figura 5 – Representação esquemática da participação das células apresentadoras de antígeno na teoria da patogênese autoimune.

Fonte: ROOPASHREE *et al.*, 2012.

A última teoria autoimune defende que a maior expressão de Proteínas de Choque Térmico (HSP), presente nos queratinócitos do LPO, funcionaria como um auto-antígeno no desenvolvimento da doença (Scully, Beyli *et al.*, 1998; Sugerman, Savage *et al.*, 2002; Ismail, Kumar *et al.*, 2007). O aumento da expressão desta proteína está relacionado com drogas, infecções, produtos bacterianos e trauma (Sugerman, Savage *et al.*, 2002).

2.1.1.4 Teoria Humoral

A teoria de que o LPO possa ter sua patogênese humoral baseia-se nos achados de Lukac e colaboradores, em 2006, que identificaram anticorpos circulantes específicos contra a desmogleína-1 e 3 em pacientes portadores de líquen plano oral (Lukac, Brozovic *et al.*, 2006; Roopashree, Gondhalekar *et al.*, 2010b).

2.1.2 Proteínas Reconhecedoras de Patógenos (PRP)

A imunidade inata tem um importante papel na proteção do organismo dos mamíferos, desenvolvida principalmente pela presença das PRP, encontrados nas células de defesa do sistema imune inato (Mathews, Sprakes *et al.*, 2008).

No ano de 2003 foi identificada a presença da proteína Toll em insetos do gênero *Drosophila melanogaster* como sendo a chave reguladora do sistema imune inato destes organismos (Hoffmann, 2003). A partir desta descoberta, foram identificadas em humanos as funções de proteínas homólogas as encontradas nos insetos, as Proteínas Receptoras do tipo Toll (TLR), sendo elas responsáveis pelo reconhecimento de uma lista de substâncias microbianas na superfície celular e no interior dos endossomos (Kawai e Akira, 2006).

Estas proteínas receptoras têm a propriedade de reconhecer componentes microbianos que, agrupados, são chamados de Padrão Molecular Associado à Patógenos (PMAP), que são estruturas vitais de micro-organismos, como a flagelina, estruturas de ácido nucléico exclusivas de vírus e bactérias e fragmento de parede celular de bactérias, como lipopolissacarídeos, ácido lipoteicóico e peptidoglicanos (Akira, Uematsu *et al.*, 2006).

Novas proteínas reconhecedoras de antígenos foram descobertas, sendo conhecidas quatro famílias de proteínas que compõe o sistema imune inato, as proteínas Receptoras do tipo Toll (TLR), as Proteínas Receptoras com Domínios de Ligação à Nucleotídeos e Oligomerização (NOD) (abreviada como NLR), os Receptores Gene Induzido pelo Ácido Retinóico-*like* (RLR) e as Proteínas Receptoras de Lectinatipo-C (CLR) (Mathews, Sprakes *et al.*, 2008).

2.1.2.1 Proteínas Receptoras do tipo Toll

Os receptores TLR funcionam como receptores de reconhecimento presentes na membrana celular das células do sistema imune inato, como os macrófagos, células dendríticas e os leucócitos polimorfonucleares, sendo conhecidos mais de dez tipos diferentes (Bowie, 2007; Kawai e Akira, 2009; Hennessy, Parker *et al.*, 2010; Iwasaki e Medzhitov, 2010).

Estes receptores são caracterizados pela presença extracelular de Repetições Ricas em Leucina (LRR), que agem no reconhecimento das PAMP, e de um Domínio do tipo Toll e Interleucina-1 (TIR) na porção intracelular, que ativa cascatas inflamatórias através da interação com proteínas citoplasmáticas específicas: Proteína de Diferenciação de Resposta Mielóide Primária (MyD88), Proteína Adaptadora Contendo domínio TIR (TIRAP), Proteína Adaptadora Contendo Domínio TIR Induzindo Interferon β (TRIF) e Molécula Adaptadora Relacionada com a TRIF (TRAM) (McGettrick e O'Neill, 2010).

Os TLR 1, 2, 4, 5, e 6 estão presentes nas membranas plasmáticas, com domínios extra e intracelulares. Já os TLR 3, 7, 8, 9 e 10 estão localizados no interior da célula, localizados nos endossomos e não dispendo de domínio extracelular (McGettrick e O'Neill, 2010). Na tabela 1 são destacados os principais tipos conhecidos de receptores TLR (McGettrick e O'Neill, 2007; Uehara, A., Fujimoto, Y. *et al.*, 2007; Uehara e Takada, 2007; Himmel, Hardenberg *et al.*, 2008; Akira, 2009; Pollanen, Sillat *et al.*, 2009).

Tabela 1 – Relação dos principais tipos celulares e ligantes dos TLR

Receptor	Ligante	Localização do ligante	Tipo celular
TLR1	Lipopeptídeos	Bactérias	Monócitos/macrófagos, linfócitos B, células dendríticas, células epiteliais orais, fibroblastos gengivais
TLR2	Glicolipídios, lipopeptídeos, ácido lipoteicóico, Lipoproteínas, Zimozan	Bactérias Fungos	Monócitos/macrófagos, mastócitos, células dendríticas, células epiteliais orais, fibroblastos gengivais, osteoblastos, osteoclastos, linfócitos B e T, neutrófilos

TLR3	Ácido Ribonucléico (RNA) dupla-fita, Poli I:C	Vírus	Células epiteliais orais
TLR4	Lipopolissacarídeo, proteínas de choque térmico. Fibrinogênio, heparan sulfato, ácido hialurônico	Bactérias Mamífero	Células epiteliais orais, fibroblastos gengivais, osteoblastos, osteoclastos, linfócitos T, neutrófilos
TLR5	Flagelina	Bactéria	Células epiteliais orais, fibroblastos gengivais, osteoblastos, linfócitos B e T, neutrófilos
TLR6	Lipopeptídeos	Micoplasma	Células epiteliais orais, fibroblastos gengivais, linfócitos B e T, neutrófilos
TLR7	Imidazoquinolina, bropirimina, RNA simples-fita	Fármacos Vírus	Células epiteliais orais, fibroblastos gengivais, linfócitos B, neutrófilos
TLR8	RNA simples-fita	Vírus	Células epiteliais orais, fibroblastos gengivais, linfócitos B e T, neutrófilos
TLR9	Citosinas que precedem Guanina (CpG), Ácido Desoxiribonucléico (DNA)	Bactéria	Células epiteliais orais, fibroblastos gengivais, osteoblastos, linfócitos B, neutrófilos

A sinalização intracelular dos TLR pode ser dividida em duas vertentes (Michelsen, Doherty *et al.*, 2004; Takeda e Akira, 2004), a via MyD88-dependente, que leva a produção de citocinas pró-inflamatórias e a via MyD88-independente, que induz os genes Interferon-I (IFN-I) dependentes, a *up-regulation* do MHC II e a coestimulação de moléculas em células dendríticas. Ambas as vias induzem citocinas inflamatórias através do Fator Nuclear Kappa B (NF-κB) (Zhu e Mohan, 2010).

2.1.2.1.1 A via MyD88-dependente

O domínio TIR da porção C-terminal dos TLR se associa com a proteína MyD88 plasmática e recruta a Quinase 4 Associada ao Receptor de Interleucina-1 (IRAK4), através da interação entre seus domínios de morte. A IRAK4 pode ativar a Quinase 1 Associada ao Receptor de Interleucina 1 (IRAK1) e assim associar-se com o Fator 6 Associado ao Receptor de Fator de Necrose Tumoral (TRAF6), ativando o fator de transcrição Proteína Ativadora 1 (AP-1) através da Proteína Quinase Ativada

por Mitógenos (MAPK). O TRAF6 também ativa a quinase ativada pelo Fator de Crescimento Transformante Beta (TAK1) e a Proteína que liga a TAK1 (TAB). A TAK1 leva a ativação do Complexo I κ B Quinase (IKK) e este das Proteínas MAP Quinase Quinase 4 (MKK4) e MAP Quinase Quinase 7 (MKK7), que ativam a Quinase c-Jun N-Terminal (JNK). Este processo, ao final, leva a translocação do NF κ B (Janssens e Beyaert, 2002; Hertzog, O'Neill *et al.*, 2003; Yamamoto, Takeda *et al.*, 2004; Kawai e Akira, 2006).

2.1.2.1.2 A via MyD88-Independente

Esta via é utilizada pelos TLR3 e 4, através do uso da TRIF como ligante para a ativação do Fator Regulador 3 de Interferon (IRF3), cuja ativação leva a produção de Interferon Beta (INF- β) (Hertzog, O'Neill *et al.*, 2003; Yamamoto, Takeda *et al.*, 2004; Kawai e Akira, 2006). A ativação da TRAM é induzida pelo TLR4 e leva ao recrutamento de TRIF. A TRAM localiza tardiamente endossomos onde o Adaptador de TRAM com o Domínio Dinâmico de Golgi (TAG) inibe a ativação de IRF3 e a produção de citocinas inflamatórias induzidas pelos ligantes de TLR2, TLR7 e TLR9. A fosforilação e a translocação nuclear do IRF3 introduz Quinase 1 Ligadora do Gene TANK (TBK1) ou Quinase IKKi/IKK (IKKi) (Shotorbani, Su *et al.*, 2011). Ambas cascatas podem ser visualizadas no esquema a seguir.

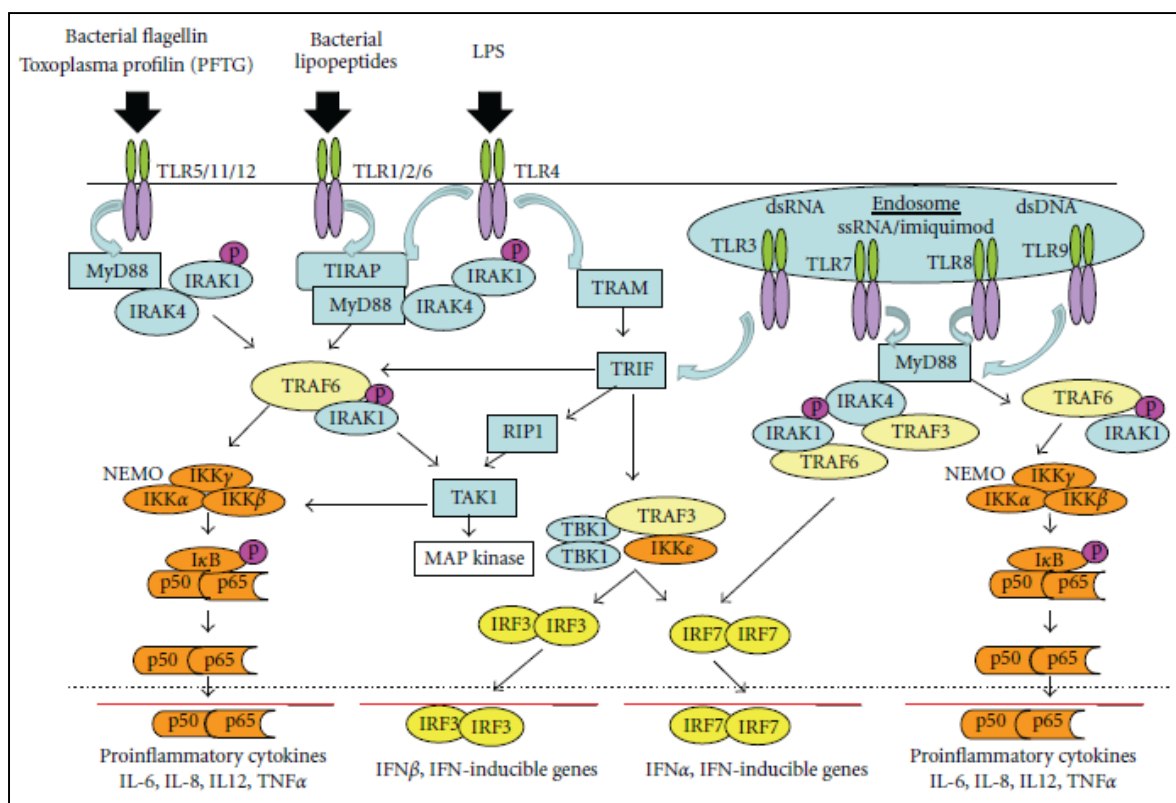


Figura 6 – Representação esquemática dos mecanismos de sinalização intracelular dos TLR.

Fonte: ZHU, 2010.

2.1.2.2 Proteínas Receptoras tipo NOD

Os receptores NLR estão presentes no citosol das células do sistema imune inato, ao contrário das TLR que estão presentes na membrana celular, fazendo parte de um sistema de detecção de moléculas nocivas ou de origem microbiana presentes no meio intracelular (Mathews, Sprakes *et al.*, 2008). Isso sugere que os patógenos que conseguem se sobrepor às defesas extracelulares encontrarão uma nova barreira de defesa no meio intracelular (Kanneganti, Lamkanfi *et al.*, 2007).

Estima-se que existam 23 genes decodificadores de NLR no genoma humano, sendo que este número pode estar subestimado, uma vez que no genoma de ratos existem 34 genes com a mesma função (Harton, Linhoff *et al.*, 2002; Inohara e Nunez, 2003).

A estrutura básica destas proteínas é composta por um domínio efetor na porção N-terminal, como o Domínio de Recrutamento de Caspase (CARD), o Domínio

Pirina (PYD) e o Domínio de Repetições de Inibições de Baculovirus (BIR); um domínio NOD na porção intermediária, necessário para a ligação com o nucleotídeo e auto-oligomerização; e uma série de cadeias C-terminais de LRR, responsável pela detecção de PAMP e controle da atividade dos NLR (Harton, Linhoff *et al.*, 2002; Inohara e Nunez, 2003).

Os NLR podem ser classificados em três subfamílias de acordo com o domínio N-Terminal presente em suas estruturas. São conhecidos, o subgrupo NOD que apresenta domínios CARD na porção N-Terminal e os NALPS que contêm o domínio PYD e os NAIPS, os quais possuem o domínio BIR (Duncan, Bergstralh *et al.*, 2007; Faustin, Lartigue *et al.*, 2007).

O funcionamento dos NLR inicia através da sensibilização do domínio LRR presente na porção C-Terminal pela exposição aos PAMP, o que desencadeia um rearranjo tridimensional da proteína e a oligomerização através do domínio NOD. Isso acarreta na exposição dos domínios efetores dos NLR que ativam proteínas plasmáticas que contêm PYD e que contêm CARD através de sua aproximação e oligomerização (Inohara, Koseki *et al.*, 1999).

Este processo resulta na interação das NOD1 e NOD2 com a Serina-Treonina Quinase (RICK) para induzir a sinalização do NF- κ B e das MAPK.

2.1.2.2.1 NOD 1 e NOD 2

Os receptores intracelulares NOD1 e NOD2 são os representantes mais conhecidos de suas subfamílias. Essas proteínas são sensibilizadas por moléculas bacterianas liberadas durante a produção e degradação da peptidoglicanos. A NOD1 reconhece o Dipeptídeo γ -D-meso-glutamil-ácido Diaminopimélico (iE-DAP) (Chamaillard, Hashimoto *et al.*, 2003; Girardin, Boneca, Carneiro *et al.*, 2003), produzido pela maioria das bactérias gram-negativas e específicos gram-positivos (Hasegawa, Yang *et al.*, 2006). Em contrapartida, a NOD2 é ativada pelo Dipeptídeo Muramil (MDP), um componente presente, virtualmente, em todos os tipos de peptidoglicano (Girardin, Boneca, Viala *et al.*, 2003; Inohara, Ogura *et al.*, 2003).

O reconhecimento das PAMP pelo domínio LRR dos NOD 1 e 2 induz o recrutamento de RICK através de interações homotípicas entre proteínas CARD (Inohara, Koseki *et al.*, 1999; Ogura, Inohara *et al.*, 2001). A RICK se liga diretamente ao regulador IKK γ e promove sua poli-ubiquitinação K63 e a ativação da quinase

TK1, um pré-requisito para a ativação do complexo iKK. Esses eventos resultam na degradação do inibidor de ativação de NF- κ B I κ B α , com consequente translocação do fator de transcrição NF- κ B ao núcleo celular, onde a transcrição dos genes dependentes alvos ocorre (Kanneganti, Lamkanfi *et al.*, 2007).

Adicionalmente a via de ativação do fator de transcrição NF- κ B, as NOD 1 e NOD 2, através da CARD9 (uma caspase pró-apoptótica) também resulta na ativação de MAPK 38, ERK e JNK, (Girardin, Tournebize *et al.*, 2001; Pauleau e Murray, 2003; Kobayashi, Chamaillard *et al.*, 2005; Park, Kim *et al.*, 2007).

As duas vias, MAPK e NF- κ B, cooperam no aumento da expressão de moléculas pró-inflamatórias que estimulam a resposta do sistema imune inato e adaptativo (Kanneganti, Lamkanfi *et al.*, 2007).

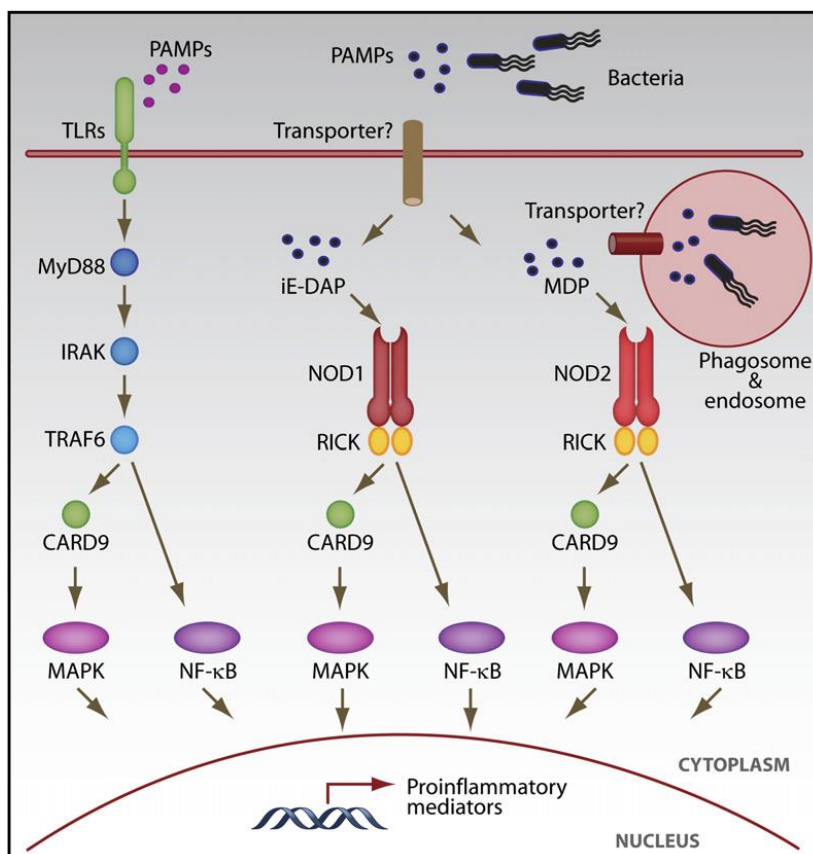


Figura 7 – Representação esquemática dos mecanismos de sinalização intracelular dos NOD1 e NOD2.

Fonte: KANNEGANTI *et al.*, 2007.

2.1.2.3 Expressão das Proteínas Reconhecedoras de Patógenos no LPO e no epitélio oral

Em 2012, Salem *et al.*, desenvolveram um estudo a fim de investigar a expressão de TLR1 e TLR2 em lesões cutâneas de Líquen Plano. Foram analisadas e submetidas à marcação imunoistoquímica 30 espécimes de lesões cutâneas de pacientes portadores de Líquen Plano e 15 fragmentos de pele removidos de pacientes sadios submetidos a cirurgias estéticas. Os autores encontraram um padrão de distribuição da expressão dos TLR diferenciado no grupo teste. O TLR1 apresentou-se com expressão preferencial na camada basal e o TLR2 na camada espinhosa superior, enquanto que o grupo controle apresentou uma distribuição mais homogênea. Os autores acreditam que a marcação diferenciada dos TLR1 e TLR2 possa estar associada com processos de reparação, regeneração ou proliferação epitelial (Salem, Abu-Zeid *et al.*, 2012).

Janardhanam *et al.* em 2012 investigaram a expressão de TLR 2 e TLR 4 através de imunoistoquímica em biópsias, e a expressão de RNAm em células epiteliais salivares de pacientes com LPO cultivadas laboratorialmente, comparando-as com as mesmas células de pacientes saudáveis. À imunoistoquímica, encontraram uma maior expressão de TLR4 no grupo teste quando comparado ao controle, e uma expressão similar de TLR2. Através do RT-PCR das células cultivadas identificaram uma expressão aumentada de RNAm para TLR4 e IL-12 e menor do RNAm para TLR2 e IL-6, quando comparados ao controle. Após estímulo com LPS, a concentração de IL-4 e IL-12 foi significativamente maior do que nas células sem o estímulo, sugerindo uma resposta mista Th1 e Th2. O tratamento destas células com dexametasona após o estímulo com LPS causou aumento da concentração de IL-4 e diminuição da IL-12, IL-6 e IL-8, comparados ao controle. Os autores concluem haver um importante papel da interação microbiana na patogênese do LPO, devido à resposta envolvendo Th1 e Th2 (Janardhanam, Prakasam *et al.*, 2012).

Ohno *et al.* em 2011 objetivaram identificar o papel das TLR no desenvolvimento do LPO. Para isso, analisaram 32 fragmentos de gengiva apresentando lesões de LPO (10 do tipo erosivo e 22 do tipo reticular) e compararam com cinco controles. Estes tecidos foram submetidos a microarranjo, RT-PCR e imunoistoquímica. Também foi coletado sangue periférico de 10 pacientes com LPO e de cinco controles para análise dos monócitos circulantes. Identificou-se expressão

moderadamente aumentada dos genes do TLR1 e TLR2, discreta dos genes do TLR5 e TLR6 e redução da expressão dos genes do TLR7, TLR8 e TLR9. Ao RT-PCR, os autores examinaram 10 fragmentos de LPO e cinco controles quanto a expressão de RNAm das TLR2 e TLR4. Foi encontrada uma expressão maior em 6 casos do grupo teste para TLR2 e 4 casos para TLR4 quando comparado ao controle, sendo que os demais casos foram semelhantes ao controle. À imunoistoquímica, os 32 fragmentos de mucosa com LPO apresentaram marcação do TLR2 na camada basal e espinhosa do epitélio, enquanto os cinco controles só demonstraram marcação basal. Quanto ao TLR4, dos 32 casos de LPO, quatro apresentaram marcação na camada espinhosa e um na camada granular. Os monócitos infiltrados apresentaram marcação para TLR2 forte em cinco casos, moderada em 14 amostras e negativa em 13 casos. Para o TLR4 a marcação foi forte em um caso, moderada em cinco casos e negativa em 26 casos. Os monócitos sanguíneos demonstraram maior marcação de TLR2 e TLR4 do que os controles, sem diferença entre os tipos de apresentações clínicas de LPO. Ao teste de estímulo com Lipopolisacarídeo (LPS) e Peptidoglicano (PGN), os monócitos de pacientes com LPO, antes do estímulo, produziam 2 vezes a mais que os controles, sendo elevada para 10 vezes essa diferença após estimulação. A Interleucina-4 (IL-4) foi duas vezes menor no grupo teste antes do estímulo, não sendo alterada a quantidade produzida após a estimulação. A marcação para a Interleucina-10 (IL-10) foi menor no grupo teste antes e após o estímulo, enquanto a produção de IFN- γ foi similar antes, e maior no grupo teste após o estímulo. Os autores acreditam que a expressão aumentada de TLR2 nos queratinócitos, monócitos teciduais e sanguíneos nos casos com LPO sejam devido à liberação de citocinas pelos queratinócitos e células mononucleares presentes, as quais secretam substâncias características de uma resposta imune TH1, que pode ser um fator perpetuador da doença (Ohno, Tateishi *et al.*, 2011).

Uehara *et al.*, em 2005, analisaram a resposta de células epiteliais de mucosa oral (HSC-2, HO-1-u-1 e KB) ao estímulo do receptor TLR2, que foi realizado através do Lipopeptídeo sintético tipo triacil de *Escherichia coli* (Pam3CSSNA), do TLR4 realizado pelo lipídio A sintético tipo *E. coli*, da NOD1 estimulado pelo iE-DAP e da NOD2 estimulada pelo MDP. Os autores identificaram que as células não secretaram Interleucina-8 (IL-8) nem MCP-1 (proteína quimiotóxica de monócitos-1) ambos, fatores pró-inflamatórios, e também não mostraram aumento do RNAm destas proteínas. Foi identificado um aumento da síntese de RNAm e da expressão de

Proteínas de Reconhecimento de Peptidoglicanos (PGRP) -L, -1 α , -1 β e -S, que são responsáveis pela produção de fatores antimicrobianos, não produzindo fatores pró-inflamatórios. Os autores encontraram que a regulação destas PGRP é feita pelas TLR2, TLR4, NOD1 e NOD2, através da sua via final, a inibição do NF- κ B, mais especificamente nas vias p50 e p65. Eles concluem que a mucosa oral tem uma grande resposta aos componentes microbianos, detendo capacidade de combatê-los, sem estimular o sistema imune inato, e assim preservar a integridade tecidual (Uehara, Sugawara *et al.*, 2005).

Sugawara *et al.*, em 2006, investigaram a expressão das proteínas TLR2, TLR4, NOD1 e NOD2 em células epiteliais normais e de pacientes com periodontite, e sua resposta ao estímulo por Lipopeptídeo Pam3CSSNA do tipo *E. coli* e iE-DAP, avaliada através de RT-PCR, citometria de fluxo, imunomarcação *in vitro* (HSC-2, HO-1-u-1 e KB) e *in vivo* (fragmentos de mucosa oral sadia e com periodontite). À imunistoquímica, foi identificada expressão de NOD1 e NOD2 no tecido humano saudável e no fragmento de mucosa de bolsa periodontal distribuídos pelo epitélio. Houve expressão das proteínas TLR2 e TLR4 em ambos tecidos, sendo mais discreta do que a marcação das NOD. A mucosa de bolsa periodontal apresentou marcação nítida na membrana celular. As células cultivadas (HSC-2, HO-1-u-1 e KB) expressaram RNAm de todos TLR e NOD, na membrana celular e no espaço intracelular, respectivamente. Identificou-se que estas células, mesmo não estimuladas, produziam pequena quantidade de β -defensina, que aumentava quando estimuladas. Os autores sugerem que os TLR e as NOD atuem como receptores antibacterianos no epitélio oral, causando o aumento da resposta imune inata em resposta a agressões bacterianas. Entretanto, ratificam a teoria de que as células epiteliais orais são dessensibilizadas parcialmente para evitar danos teciduais por processos inflamatórios oriundos das bactérias comensais habitantes da cavidade oral. (Sugawara, Uehara *et al.*, 2006).

Uehara *et al.*, em 2007, avaliaram a expressão de RNAm e das proteínas TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, NOD1, NOD2, PGRP-L, PGRP-1 α , PGRP-1 β e PGRP-S, assim como a produção de MCP-1, IL-6, IL-8 e β -defensina2, um antimicrobiano epitelial, antes e após estimulação por MDP, Lipídio A tipo *E. coli*, Lipopeptídeo triacil Pam3CSSNA tipo *E. coli*, iE-DAP, ssPoly U e Poly I:C em diferentes culturas de células humanas epiteliais orais (HSC-2, HSC-3, SAS e HO-1-u-1), faríngeas (HEp-2), esofágicas (TE-1), mamárias (MCF-7), pulmonares (A549), renais (caki-1), uterinas

(CCL-227 e HT29), salivares (HSY), de carcinoma epitelioide (HeLa) e intestinais (SW620, HT29, T84 e Caco-2), utilizando a RT-PCR, citometria de fluxo, ELISA e imunomarcação. Os autores encontraram expressão de todas TLR e NOD em todos os grupos celulares analisados. Foram detectadas expressão de superfície celular dos TLR2 e 4, e intracelular dos TLR 3 e 7, NOD 1 e 2. Em todas as análises, a expressão das NOD foi mais intensa quando comparadas com os TLR. Todos os tipos celulares, com exceção das intestinais HT29 e SW620, não expressaram fatores pró-inflamatórios IL-6, IL-8 e MCP-1 antes ou após estímulos. As células HSC-2, HEp-2, TE-1, SW620 e HeLa foram avaliadas quanto a produção de β -defensinas, e todas foram capazes de produzi-la. A interrupção da produção da β -defensina-2 foi conseguida através do bloqueio do NF- κ B, sendo identificado o papel desta molécula na produção da proteína, e dos TLR e NOD na sua modulação. A expressão das proteínas PGRP- α , -S e - β foi observada nas células epiteliais e esofagianas, aumentando após o estímulo, exceto a PGRS-S nas células esofagianas que se manteve estável, e nas intestinais e uterinas que não as expressaram. Com estes resultados os autores ratificam sua teoria de que as células epiteliais respondem fracamente ou não respondem ao estímulo das PAMPs na produção de fatores inflamatórios, desencadeando a produção de fatores antibacterianos com a finalidade de impedir uma resposta inflamatória local e destruição epitelial, mediados pelas proteínas TLR e NOD (Uehara, Akiko, Fujimoto, Yukari *et al.*, 2007).

2.1.2.4 Associação dos NLR com doenças

A importância dos Receptores Reconhecedores de Patógenos NOD 1 e NOD 2 foi ressaltada com o descobrimento da associação de doenças humanas inflamatórias com alterações genéticas nos genes decodificadores dessas proteínas (Kanneganti, Lamkanfi *et al.*, 2007).

O polimorfismo da NOD1 é associado ao desenvolvimento de eczema ectópico, asma e ao aumento das concentrações séricas de Imunoglobulina E (IgE) (Hysi, Kabesch *et al.*, 2005).

Variantes da NOD2 foram encontradas expressando reduzido potencial de ativação do fator de transcrição NF- κ B quando ativado pelo MDP, laboratorialmente (Inohara, Ogura *et al.*, 2003; Netea, Ferwerda *et al.*, 2005; Van Heel, Ghosh *et al.*, 2005), também sendo associados a um maior risco de desenvolvimento de doença de

Crohn (Hugot, Chamaillard *et al.*, 2001; Ogura, Bonen *et al.*, 2001) por uma remoção inadequada das bactérias comensais intestinais, o que leva a respostas inflamatórias desreguladas do tecido (Kanneganti, Lamkanfi *et al.*, 2007).

As variações da NOD2 associadas à doença de Crohn foram relacionadas com o aumento da incidência de Doença do Enxerto Versus Hospedeiro (GVHD) e de morte associada ao transplante autólogo de medula óssea (Holler, Rogler *et al.*, 2004; Elmaagacli, Koldehoff *et al.*, 2006; Granell, Urbano-Ispizua *et al.*, 2006).

Além das doenças já mencionadas, também foram relacionadas às alterações na NOD2 com a Síndrome de Blau (Miceli-Richard, Lesage *et al.*, 2001) e a sarcoidose inicial (Kanazawa, Okafuji *et al.*, 2005), duas desordens autossômicas dominantes caracterizadas por inflamação de múltiplos órgãos. Acredita-se que essas mutações aumentem a atividade da NOD2, sendo necessários mais estudos para identificar a relação destas mutações com o desenvolvimento de doenças inflamatórias (Kanneganti, Lamkanfi *et al.*, 2007).

2.2 Justificativa e Hipóteses

O líquen plano oral é uma doença de grande relevância na clínica odontológica devido a sua alta frequência e recorrência, ao prejuízo funcional e da qualidade de vida que promove e sua discutível chance de predispor ao desenvolvimento de lesões malignas.

Seu tratamento é focado no combate da sintomatologia dolorosa, normalmente associado a ulcerações, fissuras e erosões, através do uso de substâncias tópicas analgésicas e aceleradoras do reparo tecidual. Entretanto, observa-se clinicamente que alguns pacientes apresentam resposta favorável ao tratamento, enquanto uma parcela menor experimenta lesões duradouras com baixa resposta ao tratamento, mesmo com drogas de maior potência e artifícios para aumentar o tempo de contato da mesma com a mucosa oral, como as placas de silicone e as drogas sistêmicas.

Estes insucessos clínicos trazem à tona a discussão dos motivos pelos quais alguns pacientes respondem bem e outros não à terapêutica instituída, levando-nos, invariavelmente, a estudar a patogenia da doença a fim de encontrar estas respostas.

Entretanto, a literatura científica não é unânime na explicação do mecanismo de desenvolvimento do líquen plano oral, não possibilitando a explicação dos motivos das respostas diferentes ao tratamento, fazendo com que os tratamentos propostos sejam baseados exclusivamente na resposta clínica de melhora dos sintomas dos pacientes, e não na manipulação dos mecanismos de desenvolvimento da doença.

Com a descoberta das proteínas NOD como integrantes do sistema imune inato dos seres humanos, uma série de estudos relacionou mutações em sua estrutura com o desenvolvimento de doenças autoimunes mucosas, e a sua alta expressão no tecido epitelial oral produzindo e modulando fatores antibacterianos e pró-inflamatórios. Estas questões suscitam a dúvida a respeito de sua participação no processo de patogênese do LPO, que por possuir características autoimunes e de agressão celular, aumenta os indícios de uma provável participação no processo, justificando a investigação desta relação.

Este estudo relacionará a expressão imunoistoquímica das proteínas NOD1 e NOD2 com o Líquen Plano Oral, algo ainda não realizado na literatura.

A hipótese deste estudo é de que a marcação das proteínas NOD1 e NOD2 no infiltrado inflamatório e no epitélio das lesões de LPO poderá ser diferente tanto na

localização como na quantidade de células marcadas quando comparado à mucosa oral sadia. O sistema de reconhecimento bacteriano através das NOD pode estar alterado no LPO, reconhecendo as bactérias indígenas como patógenos e estimulando anormalmente a resposta imune inata, causando destruição tecidual, similarmente ao que ocorre no intestino com Doença de Crohn.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão das proteínas NOD1 e NOD2 em lesões de líquen plano oral e na mucosa oral de pacientes hígidos.

2.3.2 Objetivos específicos

Avaliar a ocorrência de marcação das proteínas NOD1 e NOD2 no infiltrado inflamatório adjacente às lesões de LPO.

2.4 Materiais e Métodos

2.4.1 Seleção da amostra

Serão selecionados 30 blocos de parafina contendo fragmentos de mucosa jugal de pacientes biopsiados com diagnóstico histopatológico de líquen plano oral e 8 blocos de parafina de mucosa oral hígida para compor o grupo controle, removidos de pacientes saudáveis durante exodontia de terceiro molar inferior impactado sem sinais de pericoronarite, ambos pertencentes ao arquivo do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca.

2.4.1.1 Critérios de inclusão

Serão incluídos no estudo blocos de parafina de biópsias realizadas na mucosa jugal de pacientes portadores de líquen plano oral (de acordo com os critérios clínicos e histopatológicos de VAN DER MEIJ e VAN DER WALL, 2003), por indicação clínica de diagnóstico da doença, pertencentes ao arquivo do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca.

2.4.1.2 Critérios de exclusão

Serão excluídos do estudo blocos de parafina de pacientes cujas lesões forem situadas em locais que não sejam a mucosa jugal, aquelas presentes em portadores de doença autoimunes sistêmicas e as de pacientes que não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (as biópsias oriundas de pacientes da rede privada e pública, externos ao CDDB), anexo à ficha clínica do CDDB-UFPEI (**Anexo A**).

2.4.2 Revisão dos prontuários clínicos e cirúrgicos

Os prontuários de atendimento serão revisados para a coleta de informações de raça, idade, características clínicas das lesões, tempo de evolução das lesões, sintomatologia, tipos de tratamentos realizados e sítio de acometimento das lesões.

2.4.3 Revisão das lâminas histopatológicas

Os 30 espécimes selecionados serão revisados a fim de confirmar o diagnóstico histopatológico por dois avaliadores experientes.

2.4.4 Técnica de Imunoistoquímica para evidência da expressão de NOD1 e NOD2

A expressão dos anticorpos NOD1 e NOD2 será obtida através da técnica de imunoistoquímica pelo método da estreptavidina-biotina.

De cada bloco de parafina serão obtidos três cortes de 3µm. Os cortes serão estendidos em lâminas de vidro previamente lavadas em álcool absoluto, secas e mergulhadas por um minuto em solução de 3-aminopropiltrietoxi-silano (Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA) a 10% em álcool absoluto.

Os cortes serão desparafinados em dois banhos de xilol: o primeiro a 60°C por 30 minutos, e o segundo a temperatura ambiente (TA) por 20 minutos. Em seguida reidratados em séries descendentes de etanóis, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95%, 85% e 80%, durante 5 minutos cada.

Após lavagem em água corrente e água destilada, as lâminas receberão os tratamentos de recuperação antigênica para que ocorra o restabelecimento dos sítios antigênicos e o rompimento das ligações cruzadas com a formalina. Será utilizado o ácido cítrico pH 6,0 em banho-maria por 30 minutos à 95°C para ambos os anticorpos.

Após o tratamento, os cortes serão novamente lavados em água corrente seguidos de duas passagens de 5 minutos cada em água destilada e do bloqueio da peroxidase endógena tecidual, para o qual serão realizados dois banhos de 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio, 20 volume sem metanol Pró-Análise (PA)(1:1, v/v). Após o bloqueio, os cortes serão novamente lavados em água corrente seguido de duas passagens por água destilada e, em seguida, dois banhos em solução tampão de TRIS-HCl (hidroximetil-amino-metano) a 0,5M pH 7,6, 5 minutos cada imersão.

Após, será realizada a incubação por uma hora dos anticorpos primários para identificação do antígeno NOD 1 e NOD 2. A diluição para a NOD 1 e NOD 2, será de 1:50 a 1:500 em BSA 1% (albumina sérica – Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA), conforme instruções do fabricante. Passado o período de incubação do anticorpo primário, será realizada a incubação do soro e complexo terciários (ambos por 30 minutos) - Kit LSAB (Dako Corporation). Lavagem duas vezes em água destilada (5 minutos) e em solução tampão TRIS (Hidroximetil aminometano Tris - Sigma Chemical, MO, EUA) pH 7,6.

Em seguida, será feita a revelação através da utilização do cromógeno diaminobenzina (DAB, 3,3 diaminobenzina, Sigma Chemical CO., St. Louis, USA) por

1 minuto. Após, lavagem em água corrente por 10 minutos, dois banhos em água destilada por 5 minutos cada, e duas imersões de 5 minutos cada em TRIS pH 7,6.

As lâminas serão contracoradas com Hematoxilina de Mayer por 8 minutos e em seguida lavadas em água corrente por 10 minutos e um banho em água destilada por 5 minutos.

Após, as lâminas serão desidratadas através da utilização de cadeias ascendentes de etanóis e diafanização com xilol. As lâminas serão montadas com resina Permound (Fischer Scientific, Fair Lawn, USA).

2.4.5 Análise dos resultados da expressão das proteínas NOD1 e NOD2

Os cortes histopatológicos submetidos à técnica de imunoistoquímica para evidencição das proteínas NOD1 e NOD2 serão avaliados por um único pesquisador, onde com o auxílio de um retículo (quadriculado, 10x10 campos) e um microscópio óptico (na magnitude de 40x) será contado o número e avaliado o tipo de células marcadas positivamente em quatro áreas contíguas do tecido conjuntivo na região justaepitelial, e outras quatro áreas imediatamente abaixo das primeiras.

2.4.6 Análise estatística

O estudo é classificado como estudo retrospectivo com grupo controle.

Os dados obtidos serão tabulados no programa Stata 12.0 (StataCorp, 2011, EUA) onde os resultados serão apresentados em forma de média e desvio padrão, e as comparações entre os grupos e análise de variáveis categóricas serão feitas através teste de Mann-Whitney, e as comparações entre variáveis ordinais, através da Correlação de Spearman.

2.4.7 Considerações Éticas

O projeto de pesquisa será conduzido com blocos de parafina de LPO e de mucosa oral sadia pertencentes ao arquivo do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca da UFPel, entre os anos de 1959 a 2013, cujos pacientes tenham assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em anexo à ficha clínica do CDDB (**Anexo A**). Os pacientes cujos fragmentos teciduais forem utilizados na pesquisa, serão contactados, quando possível, para que autorizem formalmente o uso de seu material, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo B**).

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pelotas, através do parecer 07/2014 (**Anexo C**)

2.5 Cronograma

	2014			
	Jun.	Jul.	Ago.	Set.
Submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa				
Seleção dos casos do grupo teste e controle				
Conferência do diagnóstico dos casos selecionados				
Levantamento dos dados biográficos, anamnéticos e clínicos nas fichas clínicas				
Separação dos blocos de parafina dos casos incluídos				
Realização da técnica de imunoistoquímica				
Análise das lâminas coradas				
Tabulação dos resultados e análise estatística				
Discussão dos resultados				
Elaboração da dissertação				
Defesa da dissertação				
Envio para publicação em revistas científicas				

2.6 Orçamento

Materiais	Preço
3-aminopropiltietoxi-silano	*
Ácido cítrico	*
Água destilada	*
Albumina sérica	*
Álcool absoluto	*
Anticorpo anti-NOD1 para imunoistoquímica	U\$279,00
Anticorpo anti-NOD2 para imunoistoquímica	U\$279,00
Diaminobenzina	*
Etanol	*
Formalina	*
Hematoxilina de Mayer	*
Hidroximetil-amino-metano	*
Lâminas histológicas	*
Lamínulas histológicas	*
Metanol pró-análise	*
Parafina	*
Peróxido de hidrogênio 20 volumes	*
Resina Permunt	*
Soro e complexo terciário	*
Xilol	*
Total em Dólares	U\$558
Total em reais (cotação: U\$1 = R\$ 2,114 no dia 29/05/2013)	R\$1.179,61

* Materiais disponíveis no Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca da UFPel.

Os gastos da pesquisa serão custeados através de recursos do Programa de Apoio à Pós-graduação (PROAP) e pelo “Projeto Parceria entre Programas de Pós-Graduação UFPel/UFMG, Buscando Consolidação da Área de Diagnóstico Bucal do PPGO/FOUFPel”(MCT/CNPq/MEC/Capes - Ação Transversal n. 06/2011 - Casadinho/Procad - No. do processo 552662/2011-9 - Valor: R\$ 281.000,00 – Coordenadora Profa Dra Sandra Beatriz Chaves Tarquinio).

REFERÊNCIAS

AKIRA, S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, v.85, n.4, p.143-56, 2009.

AKIRA, S. ;UEMATSU, S. ;TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, v.124, n.4, p.783-801, Feb 24, 2006.

AXELL, T. ;RUNDQUIST, L. Oral lichen planus--a demographic study. *Community dentistry and oral epidemiology*, v.15, n.1, p.52-6, Feb, 1987.

BOWIE, A. G. Translational mini-review series on Toll-like receptors: recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity. *Clinical and experimental immunology*, v.147, n.2, p.217-26, Feb, 2007.

CHAINANI-WU, N., *et al.* Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *Journal of the American Dental Association*, v.132, n.7, p.901-9, Jul, 2001.

CHAMAILLARD, M., *et al.* An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature immunology*, v.4, n.7, p.702-7, Jul, 2003.

CRINCOLI, V., *et al.* Oral lichen planus: update on etiopathogenesis, diagnosis and treatment. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, v.33, n.1, p.11-20, Mar, 2011.

DUNCAN, J. A., *et al.* Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.104, n.19, p.8041-6, May 8, 2007.

EISEN, D. The therapy of oral lichen planus. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, v.4, n.2, p.141-58, 1993.

ELMAAGACLI, A. H., *et al.* Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation. *Transplantation*, v.81, n.2, p.247-54, Jan 27, 2006.

FAUSTIN, B., *et al.* Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Molecular cell*, v.25, n.5, p.713-24, Mar 9, 2007.

GIRARDIN, S. E., *et al.* Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, v.300, n.5625, p.1584-7, Jun 6, 2003.

GIRARDIN, S. E., *et al.* Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *The Journal of biological chemistry*, v.278, n.11, p.8869-72, Mar 14, 2003.

GIRARDIN, S. E., *et al.* CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO reports*, v.2, n.8, p.736-42, Aug, 2001.

GRANELL, M., *et al.* Effect of NOD2/CARD15 variants in T-cell depleted allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*, v.91, n.10, p.1372-6, Oct, 2006.

HARTON, J. A., *et al.* Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *Journal of immunology*, v.169, n.8, p.4088-93, Oct 15, 2002.

HASEGAWA, M., *et al.* Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments. *The Journal of biological chemistry*, v.281, n.39, p.29054-63, Sep 29, 2006.

HENNESSY, E. J. ;PARKER, A. E. ;O'NEILL, L. A. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nature reviews. Drug discovery*, v.9, n.4, p.293-307, Apr, 2010.

HERTZOG, P. J. ;O'NEILL, L. A. ;HAMILTON, J. A. The interferon in TLR signaling: more than just antiviral. *Trends in immunology*, v.24, n.10, p.534-9, Oct, 2003.

HIMMEL, M. E., *et al.* The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease. *Immunology*, v.125, n.2, p.145-53, Oct, 2008.

HOFFMANN, J. A. The immune response of *Drosophila*. *Nature*, v.426, n.6962, p.33-8, Nov 6, 2003.

HOLLER, E., *et al.* Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, v.104, n.3, p.889-94, Aug 1, 2004.

HUGOT, J. P., *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, v.411, n.6837, p.599-603, May 31, 2001.

HYSI, P., *et al.* NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Human molecular genetics*, v.14, n.7, p.935-41, Apr 1, 2005.

INOHARA, N., *et al.* Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *The Journal of biological chemistry*, v.274, n.21, p.14560-7, May 21, 1999.

INOHARA, N. ;NUNEZ, G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature reviews. Immunology*, v.3, n.5, p.371-82, May, 2003.

INOHARA, N., *et al.* Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *The Journal of biological chemistry*, v.278, n.8, p.5509-12, Feb 21, 2003.

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

IWASAKI, A. ;MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, v.327, n.5963, p.291-5, Jan 15, 2010.

JANARDHANAM, S. B., *et al.* Differential expression of TLR-2 and TLR-4 in the epithelial cells in oral lichen planus. *Archives of oral biology*, v.57, n.5, p.495-502, May, 2012.

JANSSENS, S. ;BEYAERT, R. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends in biochemical sciences*, v.27, n.9, p.474-82, Sep, 2002.

KANAZAWA, N., *et al.* Early-onset sarcoidosis and CARD15 mutations with constitutive nuclear factor-kappaB activation: common genetic etiology with Blau syndrome. *Blood*, v.105, n.3, p.1195-7, Feb 1, 2005.

KANNEGANTI, T. D. ;LAMKANFI, M. ;NUNEZ, G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*, v.27, n.4, p.549-59, Oct, 2007.

KAWAI, T. ;AKIRA, S. TLR signaling. *Cell death and differentiation*, v.13, n.5, p.816-25, May, 2006.

_____. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology*, v.21, n.4, p.317-37, Apr, 2009.

KOBAYASHI, K. S., *et al.* Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, v.307, n.5710, p.731-4, Feb 4, 2005.

LODI, G., *et al.* Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, v.100, n.1, p.40-51, Jul, 2005.

LUKAC, J., *et al.* Serum autoantibodies to desmogleins 1 and 3 in patients with oral lichen planus. *Croatian medical journal*, v.47, n.1, p.53-8, Feb, 2006.

MATHEWS, R. J. ;SPRAKES, M. B. ;MCDERMOTT, M. F. NOD-like receptors and inflammation. *Arthritis research & therapy*, v.10, n.6, p.228, 2008.

MCGETTRICK, A. F. ;O'NEILL, L. A. Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis. *British journal of haematology*, v.139, n.2, p.185-93, Oct, 2007.

_____. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Current opinion in immunology*, v.22, n.1, p.20-7, Feb, 2010.

MICELI-RICHARD, C., *et al.* CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nature genetics*, v.29, n.1, p.19-20, Sep, 2001.

MICHELSSEN, K. S., *et al.* TLR signaling: an emerging bridge from innate immunity to atherogenesis. *Journal of immunology*, v.173, n.10, p.5901-7, Nov 15, 2004.

NAVAS-ALFARO, S. E., *et al.* Comparative histopathological analysis between oral and cutaneous lichen planus. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.39, n.4, p.351-360, 2003.

NETEA, M. G., *et al.* Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *Journal of immunology*, v.174, n.10, p.6518-23, May 15, 2005.

OGURA, Y., *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, v.411, n.6837, p.603-6, May 31, 2001.

OGURA, Y., *et al.* Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry*, v.276, n.7, p.4812-8, Feb 16, 2001.

OHNO, S., *et al.* Enhanced expression of Toll-like receptor 2 in lesional tissues and peripheral blood monocytes of patients with oral lichen planus. *The Journal of dermatology*, v.38, n.4, p.335-44, Apr, 2011.

PARK, J. H., *et al.* RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *Journal of immunology*, v.178, n.4, p.2380-6, Feb 15, 2007.

PAULEAU, A. L. ;MURRAY, P. J. Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Molecular and cellular biology*, v.23, n.21, p.7531-9, Nov, 2003.

POLLANEN, R., *et al.* Microbial antigens mediate HLA-B27 diseases via TLRs. *Journal of autoimmunity*, v.32, n.3-4, p.172-7, May-Jun, 2009.

ROOPASHREE, M. R., *et al.* Pathogenesis of oral lichen planus--a review. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, v.39, n.10, p.729-34, Nov, 2010a.

_____. Pathogenesis of oral lichen planus--a review. *J Oral Pathol Med*, v.39, n.10, p.729-34, Nov, 2010b.

SALEM, S. A. ;ABU-ZEID, R. M. ;NADA, O. H. Immunohistochemical study of toll-like receptors 1 and 2 expression in cutaneous lichen planus lesions. *Archives of dermatological research*, Jul 28, 2012.

SCULLY, C., *et al.* Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, v.9, n.1, p.86-122, 1998.

SCULLY, C. ;EL-KOM, M. Lichen planus: review and update on pathogenesis. *Journal of oral pathology*, v.14, n.6, p.431-58, Jul, 1985.

SHOTORBANI, S. S. ;SU, Z. L. ;XU, H. X. Toll-like receptors are potential therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *World journal of biological chemistry*, v.2, n.7, p.167-72, Jul 26, 2011.

SILVERMAN, S., JR., *et al.* A prospective study of findings and management in 214 patients with oral lichen planus. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, v.72, n.6, p.665-70, Dec, 1991.

SUGAWARA, Y., *et al.* Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. *J Dent Res*, v.85, n.6, p.524-9, Jun, 2006.

SUGERMAN, P. B., *et al.* The pathogenesis of oral lichen planus. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, v.13, n.4, p.350-65, 2002.

SUGERMAN, P. B., *et al.* Oral lichen planus. *Clinics in dermatology*, v.18, n.5, p.533-9, Sep-Oct, 2000.

TAKEDA, K. ;AKIRA, S. TLR signaling pathways. *Seminars in immunology*, v.16, n.1, p.3-9, Feb, 2004.

UEHARA, A., *et al.* Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Molecular immunology*, v.44, n.12, p.3100-11, May, 2007.

UEHARA, A., *et al.* Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Molecular Immunology*, v.44, n.12, p.3100-3111, May, 2007.

UEHARA, A., *et al.* Chemically synthesized pathogen-associated molecular patterns increase the expression of peptidoglycan recognition proteins via Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 in human oral epithelial cells. *Cellular Microbiology*, v.7, n.5, p.675-686, May, 2005.

UEHARA, A. ;TAKADA, H. Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. *Journal of dental research*, v.86, n.3, p.249-54, Mar, 2007.

VAN HEEL, D. A., *et al.* Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet*, v.365, n.9473, p.1794-6, May 21-27, 2005.

VINCENT, S. D., *et al.* Oral lichen planus: the clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, v.70, n.2, p.165-71, Aug, 1990.

WALSH, L. J., *et al.* Immunopathogenesis of oral lichen planus. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, v.19, n.9, p.389-96, Oct, 1990.

YAMAMOTO, M. ;TAKEDA, K. ;AKIRA, S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Molecular immunology*, v.40, n.12, p.861-8, Feb, 2004.

ZHAO, Z. Z., *et al.* Mast cell degranulation and the role of T cell RANTES in oral lichen planus. *Oral diseases*, v.7, n.4, p.246-51, Jul, 2001.

ZHOU, X. J., *et al.* Matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral lichen planus. *Journal of cutaneous pathology*, v.28, n.2, p.72-82, Feb, 2001.

ZHOU, X. J., *et al.* Intra-epithelial CD8+ T cells and basement membrane disruption in oral lichen planus. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, v.31, n.1, p.23-7, Jan, 2002.

ZHU, J. ;MOHAN, C. Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities. *Mediators of inflammation*, v.2010, p.781235, 2010.

3 Relatório do trabalho de campo

O projeto de pesquisa defendido nesta dissertação necessitou de alterações após o início da execução da metodologia proposta, tornando-o diferente do apresentado anteriormente.

O início das atividades laboratoriais da dissertação consistiu na otimização dos anticorpos comprados para evidencição das proteínas NOD1 e NOD2, procedimento este de difícil realização, uma vez que os protocolos narrados na literatura não foram satisfatórios em sua reprodução e as instruções contidas nas bulas dos anticorpos não abordavam a maneira de serem trabalhados.

As reações de imunoistoquímica de cada anticorpo demandavam um grande tempo para a otimização, devido ao longo tempo de incubação de cada anticorpo (18h), o que, conseqüentemente, também gerava uma grande demora até que o resultado do experimento pudesse ser analisado para possibilitar uma nova reação teste.

Foram testadas diferentes diluições dos anticorpos (1:600, 1:400, 1:200, 1:100), diferentes métodos de tratamento antigênico (banho-maria com ácido cítrico, banho-maria com EDTA, calor sob pressão com ácido cítrico e calor sob pressão com EDTA) e diferentes tempos de recuperação antigênica (30' e 25'), sendo essas variáveis cruzadas em busca de uma marcação otimizada para o infiltrado inflamatório das lesões.

A marcação para o anticorpo para NOD1 ficou determinada como ideal na concentração de 1:600, com a recuperação antigênica sendo realizada em banho-maria submerso em ácido cítrico durante 25 minutos.

Entretanto, a marcação do anticorpo para NOD2, apesar de morosamente otimizada, deixou de apresentar imunorreatividade no controle positivo durante as

primeiras rodadas do experimento, demonstrando uma instabilidade do produto, que pode ser observada também em outras marcas testadas em trabalhos concomitantemente em andamento.

Devido a demora na importação dos anticorpos, também pela demora da aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPel, restando poucos meses para o desenvolvimento do experimento, não houve tempo hábil para a realização de nova importação do anticorpo para NOD2, nem para sua otimização, afim de ser incluído na dissertação.

Por estes motivos, o trabalho foi conduzido de igual forma, entretanto sendo avaliada somente a expressão da proteína NOD1.

4 Artigo (Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial)

Avaliação da expressão da proteína NOD 1 no líquen plano oral

Rafael Machado Karsburg¹, Marcos Britto Corrêa², Sandra Beatriz Chaves

Tarquínio³, Fábio Renato Manzolli Leite³, Adriana Etges³

- 1- Pós-Graduando do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas/RS.
- 2- Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Dentística, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas/RS.
- 3- Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas/RS.

Autor Correspondente:

Prof^a Dr^a Adriana Etges

Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca - CDDB

Faculdade de Odontologia - FO

Universidade Federal de Pelotas - UFPel

Rua Gonçalves Chaves, 457/607

Cep 96015-560

Centro – Pelotas

Rio Grande do Sul

Brasil

4.1 Resumo

O Líquen Plano Oral é uma doença inflamatória crônica mediada por células T que afeta a mucosa oral. Seu mecanismo etiopatológico não é claro, sendo relacionada a uma resposta imune celular. Em 2003, foi identificada em humanos, proteínas chamadas Receptores Toll-like com função no reconhecimento antígenos na resposta imune inata, As proteínas NOD (NLR) são o grupo mais representativo e estudado. O objetivo deste estudo foi de identificar a expressão da proteína NOD 1 através da imunoistoquímica em lesões orais de Líquen Plano Oral e em fragmentos de mucosa oral sadia. O anticorpo marcou plasmócitos, sendo estatisticamente mais frequente em lesões reticulares, dolorosas ou com longo tempo de evolução. Foi identificada uma mais marcação no grupo teste quando comparado ao grupo controle. Os resultados sugerem que a presença de plasmócitos tende a ser maior quanto maior for o tempo de evolução devido a inflamação crônica, o que estimularia o Sistema imune adaptativo; e que a presença das células evidenciadas pelo anticorpo contra NOD1 está relacionada a lesões brancas ou dolorosas.

Palavras-chave: proteínas adaptadoras de sinalização nod; imuno-histoquímica; líquen plano bucal

4.2 Abstract

Oral lichen planus is a chronic inflammatory disease mediated by T cells that affects the oral mucosa. Their etiopathogenic mechanism is unclear, probably being connected to an immune response of cellular origin. In 2003, it was identified in human homologous to insects proteins, proteins called Toll-like receptor with similar functions in innate immune system. NOD (NLR) is the most representative studied. The aim of this study was to identify the expression of NOD 1 protein by immunohistochemistry in lesions of oral lichen planus (OLP) and specimens of healthy oral mucosa. The antibody marked plasma cells, being statistically more frequent in reticular OLP, in painful and longlasting lesions. There was significantly higher immunostaining in the test group compared to the control. The results suggest that the presence of plasma cells tends to increase with disease progression due to chronic inflammation, which stimulate the adaptive immune system; and that the presence of these cells evidenced by NOD1 antibody is related to white and painful lesions.

Key-words: Nod Signaling Adaptor Proteins, Immunohistochemistry, Oral Lichen Planus

4.3 Introdução

O Líquen Plano Oral (LPO) é uma doença inflamatória crônica mediada por células T que acomete a mucosa oral (Sugerman, Savage *et al.*, 2002). Sua apresentação clínica pode ser verificada pela observação de estrias, pápulas e placas brancas, eritemas, erosões, úlceras, além de vesículas ou bolhas que acometem predominantemente a mucosa jugal, a língua e a gengiva (Silverman, Gorsky *et al.*, 1991).

Estima-se que o LPO afete cerca de um a dois por cento da população geral de adultos, afetando 1,4 mulheres para cada homem (Axell e Rundquist, 1987) encontrada, preferencialmente, na quinta década de vida (Vincent, Fotos *et al.*, 1990; Chainani-Wu, Silverman *et al.*, 2001). As lesões são usualmente bilaterais e dolorosas quando se apresentam da forma erosiva ou ulcerada (Scully e El-Kom, 1985; Eisen, 1993).

Embora a etiologia permaneça não esclarecida, existem indícios de que a doença seja mediada por células T CD8+ citotóxicas contra os queratinócitos basais, resultando em degeneração vacuolar, lise e apoptose das células basais (Walsh, Savage *et al.*, 1990; Crincoli, Di Bisceglie *et al.*, 2011).

Existem quatro mecanismos desenvolvidos para hipotetizar a imunopatogênese do LPO: a resposta imune antígeno-específica mediada por células; a resposta imune não-específica; a resposta autoimune e a imunidade humoral (Roopashree, Gondhalekar *et al.*, 2010b).

No ano de 2003 foi identificada a presença da proteína Toll em insetos do gênero *Drosophila melanogaster* como sendo a chave reguladora do sistema imune inato destes organismos (Hoffmann, 2003). A partir desta descoberta, foram

identificadas em humanos proteínas com funções homólogas as encontradas nos insetos, as Proteínas Receptoras do tipo Toll (TLR) (Kawai e Akira, 2006). E desde então, estudos tem sido desenvolvidos a fim de identificar prováveis alterações nestas proteínas como explicação do mecanismo de ação de diferentes doenças de origem auto-imunes.

Novas proteínas reconhecedoras de antígenos foram descobertas, sendo as Proteínas Receptoras com Domínios de Ligação à Nucleotídeos e Oligomerização (NOD) (NLR) as mais estudadas. (Mathews, Sprakes *et al.*, 2008).

Os receptores NLR estão presentes no citosol das células do sistema imune inato, fazendo parte de um sistema de detecção de moléculas nocivas ou de origem microbiana presentes no meio intracelular (Mathews, Sprakes *et al.*, 2008).

Os receptores intracelulares NOD1 e NOD2 são os representantes mais conhecidos do grupo NOD. Essas proteínas são sensibilizadas por moléculas bacterianas liberadas durante a produção e degradação da peptidoglicanos. A NOD1 reconhece o Dipeptídeo γ -D-meso-glutamil-ácido Diaminopimérico (iE-DAP) (Chamaillard, Hashimoto *et al.*, 2003; Girardin, Boneca, Carneiro *et al.*, 2003), produzido pela maioria das bactérias gram-negativas e específicos gram-positivos (Hasegawa, Yang *et al.*, 2006). Em contrapartida, a NOD2 é ativada pelo Dipeptídeo Muramil (MDP), um componente presente, virtualmente, em todos os tipos de peptidoglicano (Girardin, Boneca, Viala *et al.*, 2003; Inohara, Ogura *et al.*, 2003).

Diversos estudos têm identificado uma expressão diferenciada de proteínas reconhecedoras de patógenos em lesões cutâneas e orais de líquen plano, como um aumento da expressão de TLR1, TLR2 (Salem, Abu-Zeid *et al.*, 2012) e TLR4 (Janardhanam, Prakasam *et al.*, 2012), e a redução das expressão da TLR7, TLR8, TLR9 (Ohno, Tateishi *et al.*, 2011).

A importância dos Receptores Reconhecedores de Patógenos foi ressaltada com o descobrimento da associação de doenças humanas inflamatórias com alterações genéticas nos genes decodificadores dessas proteínas (Kanneganti, Lamkanfi *et al.*, 2007). No caso da NOD1, o seu polimorfismo é associado ao desenvolvimento de eczema atópico, asma e ao aumento das concentrações séricas de Imunoglobulina E (IgE) (Hysi, Kabesch *et al.*, 2005).

4.4 Material e Métodos

O estudo é classificado como retrospectivo com grupo controle.

Foram selecionados 30 blocos de parafinas de biópsias de pacientes apresentando LPO na mucosa jugal (de acordo com os critérios clínicos e histopatológicos de VAN DER MEIJ e VAN DER WALL, 2003) para compor o grupo teste e 8 blocos de parafina de mucosa jugal hígida para compor o grupo controle, removidos de pacientes saudáveis durante exodontia de terceiros molares inferiores impactados sem sinais de pericoronarite, ambos pertencentes ao arquivo do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca da Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

Todos os blocos selecionados foram revisados por um patologista experiente a fim de confirmar o diagnóstico histopatológico de LPO ou de mucosa oral normal.

Foram excluídos do estudo os blocos de parafina provenientes de pacientes portadores de doença autoimunes sistêmicas e que não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os prontuários de atendimento clínicos desses pacientes foram revisados para a coleta de informações sobre a cor da pele, idade, características clínicas das lesões, seus sítios de acometimento, tempo de evolução das lesões relatado pelos pacientes, sintomatologia e tipos de tratamentos realizados.

A expressão da proteína NOD1 foi obtida através da técnica de imunoistoquímica pelo método da estreptavidina-biotina, utilizando o anticorpo anti-NOD1 (Santa Cruz Biotechnology, Texas, Dallas, EUA) diluído em BSA 1% (Sigma Aldrich Co., Missouri, St. Louis, EUA), na concentração de 1:600, com exposição antigênica em banho-maria por 25 minutos em ácido cítrico e incubação *overnight* de 18 horas. A marcação foi feita com anticorpos secundários e terciários (Kit LSAB - Dako Corporation, California, Carpinteria, EUA), sendo a sua evidenciação feita com

DAB (Sigma Chemical CO., Missouri, St. Louis, USA) e a contracoloração obtida com Hematoxilina de Mayer.

Os cortes histopatológicos foram avaliados por um único pesquisador, onde com o auxílio de um retículo (quadriculado, 10x10 campos) e um microscópio óptico (Nikon Optishop, na magnitude de 40x) foi identificada a região mais marcada da lâmina (hot-spot) e contados o número e tipo de células marcadas positivamente em quatro áreas contíguas do infiltrado inflamatório subepitelial, e outras quatro áreas imediatamente abaixo das primeiras, em ambos os grupos (**Figura 1**).

Os dados obtidos foram tabulados no programa Stata 12.0 (StataCorp, 2011, EUA) e as comparações entre os grupos e análise de variáveis categóricas foram feitas através do teste Exato de Fisher e de Mann-Whitney, e as comparações entre variáveis ordinais através da Correlação de Spearman. Para todos os testes foi considerado o nível de significância de 5%.

O objetivo principal deste estudo foi de identificar diferenças entre a marcação da proteína NOD1 em lesões orais de líquen plano oral (Grupo Teste) quando comparadas a mucosa jugal saudável (Grupo Controle). Secundariamente, foi analisada a marcação do anticorpo no infiltrado inflamatório em banda de lesões de LPO e no tecido imediatamente abaixo do infiltrado; também foi verificada a existência de diferença na marcação da proteína entre as diferentes apresentações clínicas das lesões de LPO e também analisada a correlação entre a marcação da proteína e o tempo de evolução da doença.

4.5 Resultados

A amostra do grupo teste foi constituída por 10 homens e 20 mulheres, enquanto o grupo controle apresentou 4 homens e 4 mulheres.

A marcação da proteína NOD1 foi positiva em 22 casos do grupo teste (73,3%) e em apenas 1 caso do grupo controle (12.5%) ($P<0.005$). A marcação em todos os casos foi localizada no citoplasma celular de plasmócitos nos quadrantes superiores e inferiores (**Figura 2**).

Houve um predomínio da marcação no infiltrado inflamatório subepitelial (quadrantes superiores), com média e mediana de 17,7 e 3 células marcadas por lâmina, respectivamente, contra 9,8 e 1,5 dos quadrantes inferiores, entretanto sem diferença estatística ($P=0,633$).

O cruzamento dos dados clínicos com a média de células marcadas por lâminas no infiltrado inflamatório justaeptelial revelou que a marcação para NOD1 é menor em pacientes portadores de lesões do tipo reticular ($P<0,05$) e maior nos que apresentavam dor ($P<0,05$). Nos quadrantes inferiores, a marcação da NOD1 também foi menor em pacientes portadores de lesões de LPO tipo reticular ($P<0,01$). Não houve diferença estatística na marcação da NOD1 entre os sexos, presença de lesões tipo placa, presença de úlceras, presença de erosões ou com relação ao tipo de tratamento realizado (**Tabela 1**).

A comparação da contagem de células marcadas no infiltrado inflamatório subepitelial e no tecido conjuntivo adjacente ao infiltrado demonstrou que o grupo teste apresentou marcação maior do que o grupo controle em todas as avaliações (**Tabela 2**).

O tempo de evolução médio entre o início da doença, relatado pelos pacientes, e o momento da biópsia foi de 28,9 meses, variando de 2 a 204 meses.

Foi encontrada relação positiva entre o tempo de evolução da doença e uma maior contagem de células marcadas pela NOD1 (**Tabela 3**).

4.6 Discussão

Embora os linfócitos T sejam os tipos celulares predominantes no infiltrado inflamatório das lesões de LPO, a presença de plasmócitos nas mesmas é bastante comum, enquanto esse achado é raro nas lesões de pele da mesma doença (Navas-Alfaro, Da Fonseca *et al.*, 2003). Em nosso estudo, a presença de plasmócitos com marcação positiva para a proteína NOD1 ocorreu em 73,3% dos casos no grupo teste.

Conhecidamente, os plasmócitos são mais frequentes em biópsias da mucosa oral, principalmente em biópsias originárias da mucosa jugal e dos lábios. Acredita-se que este fato se deva à grande presença de glândulas salivares acessórias nessas regiões, que apresentam tecido linfóide associado aos ductos, onde se encontram células B que seriam as prováveis precursoras dos plasmócitos em inflamações destas regiões (Navas-Alfaro, Da Fonseca *et al.*, 2003). Em nossa pesquisa, todas as biópsias foram provenientes da mucosa jugal, tanto do grupo controle como do grupo teste, o que explicaria a grande presença de plasmócitos nas lâminas estudadas.

Sugere-se que a maior contagem de plasmócitos marcados pela NOD1 em lesões com maior tempo de evolução encontrada em nosso estudo, possa ser devido a longa presença do processo inflamatório associado às lesões orais de líquen plano. Na teoria etiopatogênica antígeno-específica do LPO proposta por Roopashere (2010), existe a participação de células apresentadoras de antígeno, através da apresentação de antígenos pelos complexos maiores de histocompatibilidade e também da estimulação da secreção de INF- α na destruição dos queratinócitos basais, entretanto, esses mecanismos de ação também podem apresentar ativação do sistema imune adaptativo.

A menor contagem de plasmócitos marcados pela NOD1 encontrada nas lesões de LPO estriadas, juntamente com a maior marcação encontrada em lesões com relato de dor pelo paciente, sugere uma possível relação entre a maior marcação do anticorpo e a apresentação clínica mais sintomática ou aguda do líquen plano oral, aumentando a especulação da função da proteína NOD1 e dos plasmócitos no processo inflamatório da doença.

A marcação dos plasmócitos pela NOD1 não foi diferente no infiltrado em banda justaepitelial quando comparado ao infiltrado no tecido conjuntivo abaixo dele, evidenciando que os plasmócitos no interior do infiltrado do LPO apresentam similaridade com os plasmócitos próximos à mesma.

Apesar de frequente, o papel dos plasmócitos no LPO ainda não é conhecido, havendo convergência da literatura de que estas células não tenham uma participação direta na patogenia das lesões de LPO (Navas-Alfaro, Da Fonseca *et al.*, 2003). Entretanto, em revisão de literatura recente, a teoria humoral para o desenvolvimento do LPO ainda é citada. (Roopashree, Gondhalekar *et al.*, 2010a). Assim sendo, mesmo que com papel secundário, poderia ser encontrada uma relação dos plasmócitos localizados próximos às lesões com o desenvolvimento da doença.

A marcação da proteína NOD1 nos plasmócitos condiz com o esperado, pois sua localização conhecida e apresentada neste estudo é citoplasmática. Entretanto, a função biológica da proteína é relacionada com a primeira linha de defesa do organismo, a imunidade inata, mas em nossos resultados a proteína apresentou marcação em plasmócitos, células relacionadas diretamente ao sistema imune adaptativo ou humoral.

Os achados deste estudo podem indicar a possibilidade dos microrganismos invasores apresentarem alguma relação com o desenvolvimento de uma resposta

específica baseada no sistema imune adaptativo, além da já conhecida origem da doença a partir do sistema imune inato.

Um fator a ser considerado, e também uma limitação do estudo, é o fato de não existirem no mercado anticorpos monoclonais contra a NOD1, que apresentariam uma marcação mais específica. Em vista disso, nossos resultados devem ser encarados como preliminares de um estudo inicial e inédito avaliando a relação da proteína NOD1 com o LPO.

Através dos resultados deste estudo pode-se concluir que a presença de plasmócitos, evidenciados pela marcação pela proteína NOD1, é diferente entre pacientes portadores de LPO e pacientes saudáveis, onde os primeiros apresentam maior número de células marcadas pelo anticorpo. O maior número de plasmócitos marcados no LPO também foi relacionado com o maior tempo de evolução da doença e com lesões dolorosas. O número de células marcadas pela NOD1 foi menor nas lesões estriadas, e não foi identificada diferença entre a marcação do anticorpo no infiltrado inflamatório justaeptelial e do tecido conjuntivo adjacente. Resta, ainda, a necessidade de maior investigação quanto à marcação e do papel da NOD1 nos plasmócitos e sobre a função destes na doença.

Agradecimentos

Ivana Hannemann Neves pela realização das reações imunoistoquímicas.

REFERÊNCIAS

AXELL, T. ;RUNDQUIST, L. Oral lichen planus--a demographic study. *Community dentistry and oral epidemiology*, v.15, n.1, p.52-6, Feb, 1987.

CHAINANI-WU, N., *et al.* Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *Journal of the American Dental Association*, v.132, n.7, p.901-9, Jul, 2001.

CHAMAILLARD, M., *et al.* An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature immunology*, v.4, n.7, p.702-7, Jul, 2003.

CRINCOLI, V., *et al.* Oral lichen planus: update on etiopathogenesis, diagnosis and treatment. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, v.33, n.1, p.11-20, Mar, 2011.

EISEN, D. The therapy of oral lichen planus. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, v.4, n.2, p.141-58, 1993.

GIRARDIN, S. E., *et al.* Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, v.300, n.5625, p.1584-7, Jun 6, 2003.

GIRARDIN, S. E., *et al.* Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *The Journal of biological chemistry*, v.278, n.11, p.8869-72, Mar 14, 2003.

HASEGAWA, M., *et al.* Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments. *The Journal of biological chemistry*, v.281, n.39, p.29054-63, Sep 29, 2006.

HOFFMANN, J. A. The immune response of *Drosophila*. *Nature*, v.426, n.6962, p.33-8, Nov 6, 2003.

HYSI, P., *et al.* NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Human molecular genetics*, v.14, n.7, p.935-41, Apr 1, 2005.

INOHARA, N., *et al.* Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *The Journal of biological chemistry*, v.278, n.8, p.5509-12, Feb 21, 2003.

JANARDHANAM, S. B., *et al.* Differential expression of TLR-2 and TLR-4 in the epithelial cells in oral lichen planus. *Archives of oral biology*, v.57, n.5, p.495-502, May, 2012.

KANNEGANTI, T. D. ;LAMKANFI, M. ;NUNEZ, G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*, v.27, n.4, p.549-59, Oct, 2007.

KAWAI, T. ;AKIRA, S. TLR signaling. *Cell death and differentiation*, v.13, n.5, p.816-25, May, 2006.

MATHEWS, R. J. ;SPRAKES, M. B. ;MCDERMOTT, M. F. NOD-like receptors and inflammation. *Arthritis research & therapy*, v.10, n.6, p.228, 2008.

NAVAS-ALFARO, S. E., *et al.* Comparative histopathological analysis between oral and cutaneous lichen planus. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.39, n.4, p.351-360, 2003.

OHNO, S., *et al.* Enhanced expression of Toll-like receptor 2 in lesional tissues and peripheral blood monocytes of patients with oral lichen planus. *The Journal of dermatology*, v.38, n.4, p.335-44, Apr, 2011.

ROOPASHREE, M. R., *et al.* Pathogenesis of oral lichen planus--a review. *J Oral Pathol Med*, v.39, n.10, p.729-34, Nov, 2010a.

_____. Pathogenesis of oral lichen planus--a review. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, v.39, n.10, p.729-34, Nov, 2010b.

SALEM, S. A. ;ABU-ZEID, R. M. ;NADA, O. H. Immunohistochemical study of toll-like receptors 1 and 2 expression in cutaneous lichen planus lesions. *Archives of dermatological research*, Jul 28, 2012.

SCULLY, C. ;EL-KOM, M. Lichen planus: review and update on pathogenesis. *Journal of oral pathology*, v.14, n.6, p.431-58, Jul, 1985.

SILVERMAN, S., JR., *et al.* A prospective study of findings and management in 214 patients with oral lichen planus. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, v.72, n.6, p.665-70, Dec, 1991.

SUGERMAN, P. B., *et al.* The pathogenesis of oral lichen planus. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, v.13, n.4, p.350-65, 2002.

VINCENT, S. D., *et al.* Oral lichen planus: the clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, v.70, n.2, p.165-71, Aug, 1990.

WALSH, L. J., *et al.* Immunopathogenesis of oral lichen planus. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, v.19, n.9, p.389-96, Oct, 1990.

Tabelas

Tabela 1 – Cruzamento das características clínicas das lesões de LPO com a contagem de células marcadas pela NOD1 nos quadrantes superiores e inferiores.

	Quadrantes Superiores (justaepteliais)		Quadrantes Inferiores (tecido conjuntivo adjascente)	
Sexo				
- Feminino	10.6 (24.3)	P=0.516	5.5 (9.6)	P=0.665
- Masculino	21.6 (49.3)		9.5 (17.8)	
Estria				
- Ausente	26.9 (32.0)	P=0.046*	21.9 (23.0)	P=0.008*
- Presente	15.6 (44.2)		6.4 (13.0)	
Placa				
- Ausente	7.0 (10.6)	P=0.363	3.1 (4.6)	P=0.100
- Presente	24.3 (50.0)		13.9 (19.8)	
Úlcera				
- Ausente	19.0 (43.5)	P=0.403	10.9 (17.7)	P=0.660
- Presente	12.7 (15.9)		3.7 (5.5)	
Erosão				
- Ausente	21.8 (53.0)	P=0.380	5.9 (8.7)	P=0.341
- Presente	13.3 (14.8)		16.3 (23.4)	
Dor				
- Ausente	22.5 (56.5)	P=0.040*	7.9 (15.4)	P=0.166
- Presente	16.0 (14.5)		14.7 (19.5)	
Tratamento				
- Prosservar	23.1 (65.4)	P=0.260	8.6 (17.2)	P=0.905
- Corticóide	12.3 (14.3)		9.1 (17.9)	

* Resultado estatisticamente significativo através do teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$)

Legendas: Valor fora dos parênteses = média do número de células marcadas positivamente nas lâminas. (Valor dentro dos parênteses) = desvio padrão.

TABELA 2 – Comparação da média de células marcadas nas lâminas do grupo teste e controle..

	Quadrantes Superiores	Quadrantes Inferiores	Soma dos Quadrantes
Teste	17.7 (40.8)	9.8 (16.7)	27,5 (46.8)
	P=0.04*		P=0.02*
Controle	17.1 (48.4)	1.4 (3.9)	18.5 (53.3)

* Resultado estatisticamente significativo através do teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$)

Legendas: Valor fora dos parênteses = média do número de células marcadas positivamente nas lâminas. (Valor dentro dos parênteses) = desvio padrão.

TABELA 3 – Avaliação da relação entre o tempo de evolução e a contagem de células marcadas pela NOD1

	ρ (Rho)	Valor de P
Quadrantes Superiores	0.595	0.005*
Quadrantes Inferiores	0.573	0.008*
Soma dos Quadrantes	0.545	0.013*

* Resultado estatisticamente significativo de força moderada através da Correlação de Spearman ($P < 0,05$)

Figuras

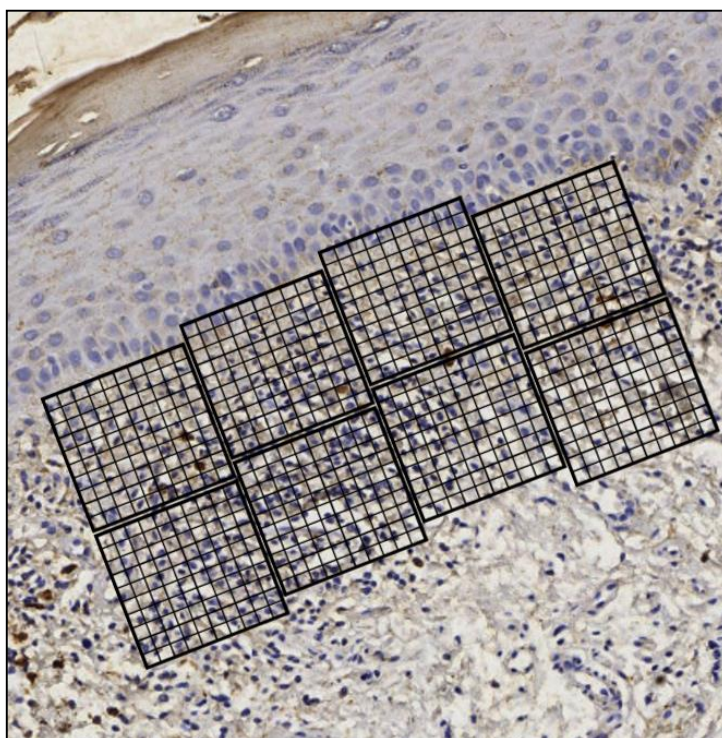


Figura 1 – Exemplificação da contagem das células marcadas realizada com o auxílio de um retículo ocular em microscópio óptico no aumento de 40x.

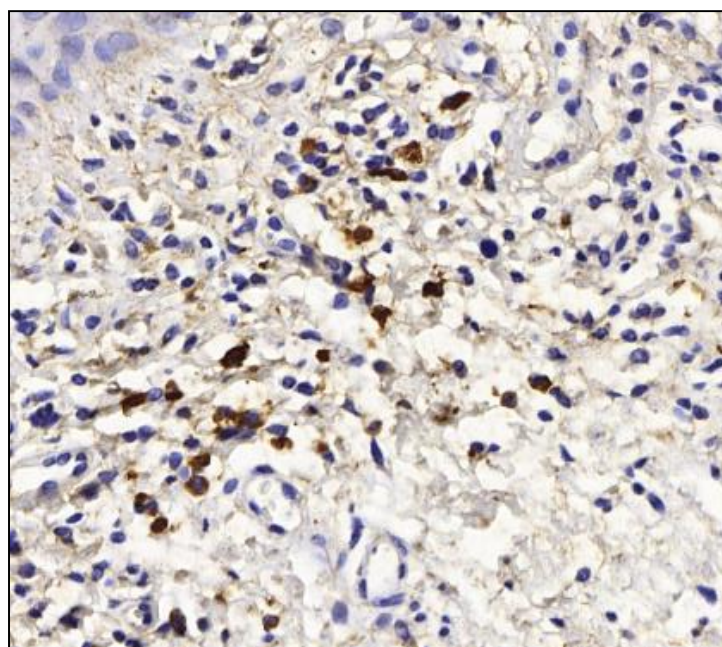


Figura 2 – Marcação contra a proteína NOD1 localizada no citoplasma de plasmócitos próximos ao infiltrado linfocítico em banda das lesões de Líquen Plano Oral. (DAB, Hematoxilina, 40x).

5 Considerações finais

Através dos resultados deste estudo pode-se concluir que a presença de plasmócitos, evidenciados pela marcação pela proteína NOD1, é diferente entre pacientes portadores de LPO e pacientes saudáveis, onde os primeiros apresentam maior número de células marcadas pelo anticorpo. O maior número de plasmócitos marcados no LPO também foi relacionado com o maior tempo de evolução da doença e com lesões dolorosas. O número de células marcadas pela NOD1 foi menor nas lesões estriadas, e não foi identificada diferença entre a marcação do anticorpo no infiltrado inflamatório justaepitelial e do tecido conjuntivo adjacente. Resta, ainda, a necessidade de maior investigação quanto à marcação e do papel da NOD1 nos plasmócitos e sobre a função destes na doença.

Anexos

Anexo A – Ficha Clínica e Termo de Consentimento Livre Esclarecido do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca - UFPel

**CENTRO DE DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS DA BOCA - CDDB
FACULDADE DE ODONTOLOGIA - UFPel**

FICHA DE ATENDIMENTO

NOME COMPLETO:

SEXO: COR: DATA NASC.: PROFISSÃO:

ENDEREÇO:

BAIRRO: FONE: CIDADE:

CC:

DATA:

ANAMNESE:

DESCRIÇÃO DA LESÃO:

Se superficial: subcutânea, submucosa: inserção, mobilidade, consistência, tamanho, coloração, presença de linfadenopatia, aspecto da superfície, se íntegra ou ulcerada....

Se intra-óssea: aspecto radiográfico (radiolúcido, radiopaco, misto), localização, tamanho, presença ou não de expansão de corticais, integridade das corticais à palpação, reabsorção/deslocamento dentário....

DIAGNÓSTICO CLÍNICO:

CONDUTA:

PROFESSOR (a):

aluno (A):

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
CDDB**

Eu, _____ RG
fui suficientemente esclarecido(a) sobre a minha situação de saúde bucal, bem como sobre o tratamento proposto. Aceito, de forma livre e esclarecida este tratamento e permito a utilização de dados clínicos e imagens dele resultantes para fins didático-científicos, desde que minha identidade seja preservada. Foi-me assegurado também que posso retirar a permissão para utilização deste material com fins didáticos, a qualquer tempo e por qualquer motivo por mim determinado, sem nenhum prejuízo ao tratamento a ser realizado.

Pelotas, de de

Assinatura do Paciente ou Responsável

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Olá, estamos realizando um trabalho na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas intitulado "**Avaliação da expressão das proteínas NOD 1 e 2 no Líquen Plano Oral**" e gostaríamos que participasse da mesma.

O objetivo deste trabalho é de identificar a presença de substâncias de nosso corpo que podem ter relação na formação das feridas e manchas brancas que pessoas portadoras da doença Líquen Plano apresentam.

Participar deste estudo é **opcional**, independente da sua escolha o seu tratamento na instituição seguirá **o mesmo**, sem prejuízos.

Ao participar deste estudo o procedimento de biópsia a que você foi submetido e o diagnóstico que recebeu não será alterado. Será realizado uma nova análise do fragmento removido de sua boca para a identificação das substâncias que estamos pesquisando. Esta etapa não altera o resultado do seu exame.

Todas as etapas desta pesquisa são gratuitas. Não há risco de você ser prejudicado participando desta pesquisa. Os benefícios com esta pesquisa dependem dos resultados obtidos, podendo ser observadas melhoras no entendimento da doença Líquen Plano a médio e longo prazo.

É importante informar que sua identidade será preservada em todas as fases do trabalho, e, somente fotos da sua boca e os dados da sua ficha serão utilizados.

Apesar de não termos questionários, você tem o direito de deixar de não responder qualquer pergunta que achar importante, e levará uma cópia desta folha com você.

Se concordar em participar do trabalho, pedimos que realize a aprovação por escrito no espaço abaixo:

Eu, _____ portador do RG _____, **concordo** em participar do trabalho intitulado "**Avaliação da expressão das proteínas NOD 1 e 2 no Líquen Plano Oral**", realizado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas. Declaro ter recebido as devidas explicações sobre o referido trabalho e concordo que minha desistência poderá ocorrer em qualquer momento sem que ocorra quaisquer prejuízos físicos, mentais ou no acompanhamento deste serviço. Declaro ainda estar ciente de que minha participação é voluntária e que fui devidamente esclarecido(a) quanto aos objetivos e procedimentos deste trabalho.

Certos de poder contar com sua autorização, colocamo-nos à disposição para esclarecimentos. Você pode encontrar pesquisadores envolvidos na pesquisa (Prof^a. Adriana Etges e Mestrando CD Rafael M. Karsburg) na Faculdade de Odontologia, Rua Gonçalves Chaves, número 457, sala 607, Centro, CEP 96015-560 ou pelo telefones (53) 32256741, ramal 132.

Data: ____/____/____

Anexo C – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA**

PELOTAS, 04 de junho de 2014

PARECER Nº 07/2014

O projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da expressão das proteínas NOD 1 e 2 no líquen plano oral**" está constituído de forma adequada, cumprindo, nas suas plenitudes preceitos éticos estabelecidos por este Comitê e pela legislação vigente, recebendo, portanto, **PARECER APROVADO**.

A handwritten signature in black ink, which appears to read 'Waldemarin', is positioned above the printed name.

Prof. Dr. Renato Fabrício de Andrade Waldemarin

Coordenador do CEP- FOP/UFPel