

Aline Fernanda Cruz

Avaliação do perfil de metilação nas diferentes
formas clínicas do líquen plano bucal

Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2017

Aline Fernanda Cruz

Avaliação do perfil de metilação nas diferentes formas clínicas do líquen plano bucal

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Coorientadora: Prof.^a Dra. Renata Gonçalves de Resende

Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte

2017

Ficha Catalográfica

C957a Cruz, Aline Fernanda.
2017 Avaliação do perfil de metilação no líquen plano bucal /
T Aline Fernanda Cruz. -- 2017.

47 f. : il.

Orientador: Ricardo Santiago Gomez.
Coorientadora: Renata Gonçalves de Resende.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Líquen plano. 2. Líquen plano bucal. 3. Metilação. 4. Inflamação. I. Gomez, Ricardo Santiago. II. Resende, Renata Gonçalves de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047

Ao meu pai, Antonio, terra firme sob meus passos, dedico este trabalho. E à minha mãe, Conceição, que assim como o sol, é calor e luz todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Meu amado Deus, eu Te sou muito grata pela minha vida e de todas as pessoas que o Senhor colocou em meu caminho. Algumas delas me inspiram, me ajudam, me desafiam e me encorajam a ser cada dia melhor. Agradeço pela minha jornada de tropeços, vitórias e derrotas, que me fez enxergar o verdadeiro significado e beleza da vida.

Minha gratidão à minha querida mãe, Conceição, por utilizar o que havia de melhor em seu interior para construir a pessoa que sou hoje. Obrigada por dar o que tinha e o que não tinha para me fazer feliz, sólida e consciente da minha força. Minha mãe me ensinou que sempre dá pra fazer de novo, fazer melhor, fazer diferente.

Ao meu pai, Antonio, agradeço por me mostrar que trabalho não é algo para ser temido, que ser paciente é diferente de ser acomodada e que o sucesso vem para aqueles que nunca desistem. Meu pai me ensinou que ser responsável, ter transparência e lutar pelo que acredito é nobre e valioso.

Aos meus irmãos, Lucas e Pedro, agradeço pela cumplicidade inata. O laço que nos une é imaterial, impossível de ser traduzido em palavras. Com meus irmãos aprendi a dividir (os pais, brinquedos, amigos, angústias e alegrias).

Agradeço ao professor Ricardo Gomez pelo presente da orientação. Neste tempo de convivência extraí lições muito valiosas e cada uma delas está impressa em minha memória. Obrigada por me ajudar a conduzir o mestrado de forma leve e agradável. Obrigada por me mostrar o real significado de ser professor.

Não existem palavras que expressem com justiça toda minha gratidão à professora Renata Resende, minha coorientadora, mentora e amiga. Obrigada pelo incentivo nos momentos em que a jornada pareceu árdua, pelas palavras de coragem quando o desânimo tentou se apossar e pelo conforto da amizade.

Ao professor Júlio Lacerda, agradeço pelos anos de convivência. Durante este tempo aprendi que humildade e excelência são características que andam juntas. Obrigada por me permitir te observar. Obrigada por me inspirar e por ser grande exemplo de cirurgião, professor e ser humano.

Agradeço à Marina Diniz e Núbia Braga pela dedicação à pesquisa. Obrigada pela disponibilidade para esclarecer minhas dúvidas e pela paciência perante minha inexperiência.

Aos professores Carolina Gomes, Tarcília Silva, Ricardo Mesquita, Felipe Fonseca e Maria Cássia Aguiar pelas valiosas contribuições em minha formação e por todo conhecimento compartilhado.

Obrigada a todos os colegas de mestrado, em especial Flávia Fonseca, Luiz Paulo Rocha, Ivana Prado, Igor Figueiredo, Andrea López, e Henrique Meira por suavizarem o peso da rotina e tornarem a jornada mais leve.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular, em especial Josiane França, Elisa Carvalho, Bruna Antonini e Jéssica Silva agradeço pela convivência fácil e prazerosa e ao Leonardo Melo, por toda ajuda.

Minha gratidão à equipe do Laboratório de Patologia Buco-Maxilo-Facial, Domênico, Daniela e Inês pela disponibilidade e paciência.

À todos os meus amigos, agradeço por serem fontes inesgotáveis de afeto e incentivo. Sou especialmente grata às minhas amigas, Isabela Braga, Amanda Mendes, Amanda Toledo e Monaliza Viana, por serem sempre presentes.

Aos meus tios, primos e avós por me apoiarem incondicionalmente.

À toda equipe do Hospital Odilon Behrens e da Liga de Estomatologia e Cirurgia Buco-Maxilo-Facial agradeço por me acolherem como uma grande família.

Aos pacientes, o grande propósito de tudo, agradeço pela confiança.

À CAPES, FAMEPIG e CNPq, pelo apoio financeiro.

À todas as pessoas que, mesmo quando ausentes, contribuíram de alguma forma, serei sempre grata.

“You cannot hope to build a better world without improving the individuals. To that end each of us must work for his own improvement, and at the same time share a general responsibility for all humanity, our particular duty being to aid those to whom we think we can be most useful”.

Marie Curie

RESUMO

O Líquen Plano bucal (LPB) é uma doença crônica de grande relevância clínica. Apesar de sua etiologia não ser bem compreendida, acredita-se que os linfócitos T estão envolvidos na sua patogênese. Identificar os mecanismos epigenéticos envolvidos na patogênese do LPB é fundamental para o entendimento da reação inflamatória que ocorre nesta doença. O objetivo deste estudo foi comparar os níveis de metilação da região promotora de genes relacionados à resposta imune nas diferentes formas clínicas do LPB comparados à mucosa normal. Os pacientes incluídos na pesquisa foram divididos em três grupos: líquen plano reticular/em placa e líquen plano erosivo. Para o grupo controle utilizou-se amostra de mucosa normal coletada em pacientes submetidos a exodontias de dentes inclusos. Para avaliação do perfil de metilação foi realizada extração do DNA das amostras e, em seguida, as mesmas foram agrupadas em 3 pools referentes aos seus respectivos grupos. Foram avaliados os níveis de metilação de genes relacionados ao desenvolvimento da resposta inflamatória. Os pools foram submetidos a digestão por enzimas sensível e dependente da metilação. As amostras digeridas foram submetidas a reação uma reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) e através dos valores brutos de ΔCT , obteve-se a porcentagem relativa de DNA metilado para cada gene em cada grupo. O percentual de metilação encontrado na região promotora do *STAT5A* na mucosa bucal normal (59,05%) foi o que apresentou maior discrepância quando comparado ao LPB reticular/em placa e erosivo (5,43% e 2,76%, respectivamente). O gene *ELANE* foi o que apresentou maior discrepância no perfil de metilação quando comparadas as formas clínicas reticular/em placa (72,16%) com erosiva (50,0%). Estes dados sugerem que a metilação de genes relacionados à resposta imune podem estar envolvidos na patogênese do LPB, podendo modular a expressão clínica da doença.

Palavras-chave: Líquen Plano, Líquen Plano bucal, Metilação, Epigenética, Inflamação

ABSTRACT

The oral Lichen Planus is a chronic disease of great clinical relevance. Although its etiology is not well understood, data suggests that its inflammatory events are mediated by T lymphocytes. Identifying the epigenetic mechanisms involved in the pathogenesis of oral Lichen Planus is essential to understanding the inflammatory reaction that occurs in the disease. Therefore, this work evaluated the methylation profile in different clinical forms of oral Lichen Planus. The patients included in the study were divided into three groups: reticular/ plaque lichen planus and erosive lichen planus. For the control group, a sample of normal mucosa was collected in patients submitted to extraction of included teeth. In order to evaluate the methylation profile, the DNA was extracted from the samples and then they were grouped into 3 pools referring to their respective groups. The levels of methylation of genes related to the development of the inflammatory response were evaluated. The pools were digested by methylation-sensitive and methylation-dependent enzymes. The digested samples were submitted to a real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and through the Δ CT values, the relative percentage of methylated DNA for each gene in each group was obtained. The percentage of methylation found in the *STAT5A* promoter region in the normal mucosa (59.05%) showed the greatest discrepancy when compared to reticular/plaque and erosive oral Lichen Planus (5.43% and 2.76%, respectively). When comparing reticular/plaque lichen planus with erosive, the gene *ELANE* presented hypermethylation in the promoter region of the gene in the reticular/plaque Lichen Planus (72.16%) compared to the erosive form (50.00%). Based on the results it is possible to conclude that methylation of the genes responsible for inflammation in oral Lichen Planus differs with the normal mucosa and among the clinical types of the disease.

Key-words: Oral Lichen Planus, Lichen Planus, Methylation, Epigenetics, Inflammation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Lesões de Líquen Plano bucal em mucosa jugal, lado direito (a), borda lateral de língua e assoalho bucal (b) mostrando áreas estriadas (estrias de Wickham) associadas a eritema de mucosa.....16

Figura 2: Corte histológico corado por Hematoxilina e Eosina de Líquen Plano bucal mostrando acantose, liquefação degenerativa da camada basal e infiltrado inflamatório na camada superficial do tecido conjuntivo predominantemente composto de linfócitos com aumento de 40 vezes.....17

Figura 3: Níveis de metilação nos pools de LPB reticular/em placa, (b) LPB erosivo e (c) mucosa bucal normal. Nota-se que *STAT5A* mostrou menores taxas de metilação nos pools de LPB (a) e (b) comparado ao grupo controle (c).....31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do kit Epitect Methyl II Signature Human Cytokine Production PCR Array.....	28
Tabela 2: Dados clínicos dos pacientes com Líquen Plano bucal incluídos na análise de metilação gênica.....	30
Tabela 3: Níveis de metilação na região promotora dos genes <i>FOXP3</i> , <i>ELANE</i> e <i>STAT5A</i>	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ct: Cycle Threshold

DNMT: DNA Metil-transferase

gDNA: DNA genômico

IL: Interleucina

IFN: Interferon

LP: Líquen Plano

LPB: Líquen Plano Bucal

M: Metilado

MDRE: Enzima dependente da metilação

MiR: Micro-RNA

MSRE: Enzima sensível à metilação

NM: Não Metilado

OMS: Organização Mundial de Saúde

qRT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Th: Linfócitos T helper (auxiliares)

Treg: Linfócitos T reguladores

TNF: fator de necrose tumoral

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 LÍQUEN PLANO	14
2.2 LÍQUEN PLANO BUCAL.....	14
2.2.1 RESPOSTA IMUNE CELULAR NO LÍQUEN PLANO BUCAL	18
2.3 O PAPEL DA EPIGENÉTICA NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	20
2.3.1 METILAÇÃO.....	20
2.3.2 A METILAÇÃO NA REGULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	21
3 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	23
4 OBJETIVOS.....	24
4.1 OBJETIVOS GERAIS.....	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5 METODOLOGIA.....	25
5.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	25
5.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	25
5.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	26
5.4 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	26
5.5 ANÁLISE DA METILAÇÃO DO DNA	27
5.5.1 EXTRAÇÃO DE DNA.....	27
5.5.2 METILAÇÃO DO DNA E REAÇÃO DE qRT-PCR.....	28
6 RESULTADOS.....	30
7 DISCUSSÃO.....	33
8 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37
ANEXO A.....	45
ANEXO B.....	46
ANEXO C.....	47

1 Introdução

O líquen plano (LP) é uma doença mucocutânea imuno-inflamatória crônica (Axell and Rundquist, 1987; Lodi *et al.*, 2005) que pode afetar pele, mucosas, couro cabeludo e unhas (Axell and Rundquist, 1987; Lodi *et al.*, 2005; Rodrigues-Nuñez, *et al.*, 2001; Malarkodi and Sathasivasubramanian, 2015). O LP acomete cerca de 0,5 a 2% da população (Bouquot and Gunndloch, 1986; Axell and Rundquist, 1987; Schlosser, 2010) e é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma doença potencialmente maligna (El-Naggar *et al.*, 2017, p112-115, Schlosser, 2010; Wahrnakulasuriya, Johnson and Van der Waal, 2007).

O líquen plano bucal (LPB) é conhecido pelo aspecto clássico de lesões brancas reticulares, com atrofia da mucosa e erosões (Maehara T *et al.*, 2015), porém, a apresentação das lesões pode variar em seis diferentes formas clínicas: reticular, em placa, papular, erosiva, atrófica e bolhosa (Scully and Porter, 1997). Os eventos envolvidos na etiopatogênese da doença são complexos, porém, evidências mostram que fatores genéticos e ambientais podem influenciar na desregulação do sistema imune (Scully *et al.*, 1998; Ismail, Kumar and Zain, 2007).

Estudos recentes têm buscado correlacionar eventos epigenéticos a diversos processos autoimunes comuns na prática clínica (Vivek, Wei and Huan, 2011). A epigenética é a área da biologia que conecta fatores ambientais com os padrões de expressão gênica em células (Bird, 2007; Berger *et al.*, 2009). A regulação da expressão gênica por meio da epigenética inclui alterações hereditárias e reversíveis do DNA (Chuang and Jones, 2007).

A metilação é um mecanismo epigenético que atua através da inibição efetiva da transcrição gênica devido à adição de um grupo metil na posição 5' do anel de citosina (Baylin *et al.*, 2005). Existem na literatura poucos estudos que se propuseram a analisar o papel da metilação na etiopatogênese do LPB (Morandi *et al.*, 2015, Bediaga *et al.*, 2014 and Dang *et al.*, 2013), porém, sua importância na etiologia de outros processos inflamatórios como lesões periapicais inflamatórias (Campos *et al.*, 2015), lúpus eritematoso sistêmico e doença de Addison (Cribbs *et al.* 2015, Bjanesoy *et al.*, 2014) é relatada.

A hipótese deste trabalho é que a resposta imuno-inflamatória no LPB é regulada através da metilação de genes envolvidos na inflamação. Para isso foram avaliados os perfis de metilação em 22 áreas promotoras de genes que participam da resposta imune nas diferentes formas clínicas de LPB.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Líquen plano

O líquen plano (LP) é uma doença inflamatória mucocutânea crônica, descrita pela primeira vez pelo médico britânico Erasmus Wilson, em 1869 (Malakordi and Sathasivassubramanian, 2015). Clinicamente, o LP cutâneo apresenta-se como pápulas pruriginosas, de coloração púrpura, podendo haver estrias esbranquiçadas, as chamadas “estrias de Wickham”. Pacientes acometidos pelo LP cutâneo, frequentemente, exibem lesões em mucosa bucal, porém esta concomitância nem sempre acontece (Vazquez-Lopez, *et al.*, 2007; Parashar, 2011). As lesões bucais são muito frequentes e, na maioria das vezes, apenas a cavidade bucal é afetada (Bagán *et al.* 1992).

2.2 Líquen plano bucal

O LP pode ter diversas manifestações na cavidade bucal (Rodrigues-Núñez, *et al.*, 2001). Na literatura, existem seis classificações clínicas descritas para o LPB: reticular, papular, em placa, bolhoso, atrófico e erosivo (Eisen, 2002). Essas várias expressões clínicas da doença podem ocorrer simultaneamente podendo a forma predominante ser modificada (Silvermand and Bahl, 1997).

A forma reticular é a mais comum e geralmente é assintomática. (Derossi and Ciarrocca, 2005). As lesões consistem em estrias brancas hiperqueratóticas, que se dispõem em forma de uma rede (estrias de Wickham) (Schlosser, 2010). Sendo assintomático, o LPB reticular é freqüentemente descoberto durante exame bucal de rotina (Schlosser, 2010).

A forma erosiva é a segunda mais prevalente e geralmente suas lesões apresentam sintomatologia dolorosa. Muitas vezes as lesões estão associadas à gengivite descamativa (Scully and Porter, 1997). Clinicamente apresenta-se como área central eritematosa, atrófica ou erosiva. Pode estar associada a estrias de Wickham (Grossman, 2005) e os sintomas podem incluir dor, edema, disfagia e sangramento (Derossi and Ciarrocca, 2005; Eisen, 2002).

A forma atrófica é caracterizada por atrofia de mucosa associada à ulceração. As lesões podem ser sangrantes ao toque e apresentar áreas descamativas e sintomatologia dolorosa (Bagán *et al.*, 1992).

O LPB em placa caracteriza-se clinicamente por placas brancas hiperqueratóticas e assintomáticas. Acomete qualquer região da cavidade bucal, especialmente o dorso de língua, podendo causar atrofia das papilas linguais. Pode ocorrer também no palato e na mucosa jugal (Schlosser *et al.*, 2010).

A forma papular do LPB apresenta-se como pápulas múltiplas ou únicas de aspecto hiperkeratótico que podem acometer qualquer região da mucosa bucal (Grossman, 2005).

O LPB *bolhoso* é a forma clínica mais grave e também a mais rara. Apresenta componente erosivo mais severo que pode levar à separação de epitélio do conjuntivo (Grossman, 2005).

As formas clínicas geralmente não ocorrem isoladamente, sendo que duas ou mais formas clínicas podem acontecer simultaneamente, como mostra a figura 1. Existem evidências de que a forma clínica do LPB está relacionada à severidade da reação inflamatória linfocitária na camada basal do epitélio da mucosa. Quando a reação é branda há estímulo da atividade epitelial,

resultando em estriações ou placas brancas. A atividade dos linfócitos mais intensa pode resultar em ulceração ou atrofia do epitélio (Grossman, 2005).

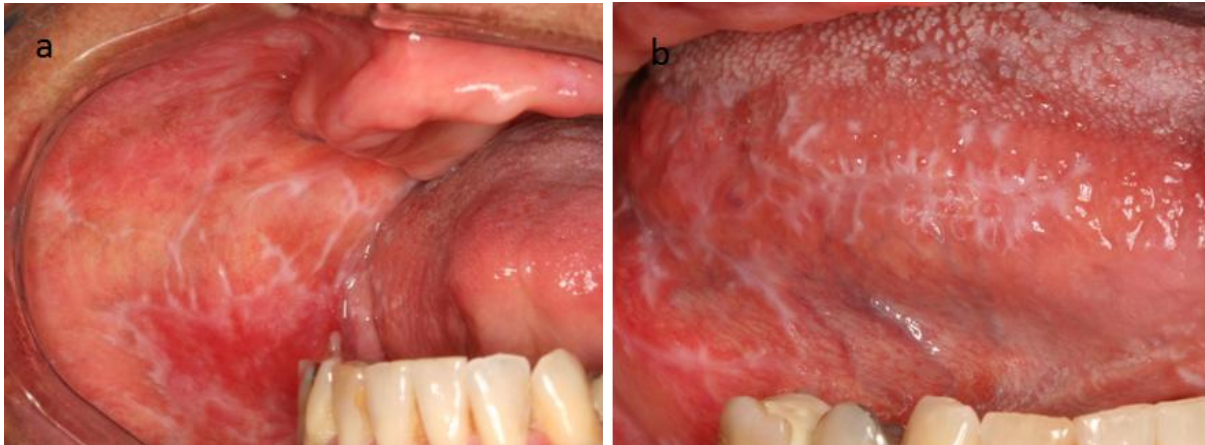


Figura 1(a-b): Lesões de Líquen Plano bucal em mucosa jugal, lado direito (a), borda lateral de língua e assoalho bucal (b) mostrando áreas estriadas (estrias de Wickham) associadas a eritema de mucosa.

A prevalência do LPB ainda não é bem conhecida, visto que os estudos epidemiológicos são prejudicados pela falta de critérios diagnósticos, apresentação clínica variada, além do fato de a forma mais comum da doença ser assintomática e, portanto, subdiagnosticada (Schlosser, 2010). A idade de diagnóstico mais prevalente varia entre a 4ª e 7ª décadas de vida (Eisen, 2002) e pacientes do sexo feminino são mais acometidos, sendo que entre 63% e 70% dos pacientes diagnosticados com LPB são mulheres (Silverman and Bahl, 1997).

O diagnóstico definitivo é feito conjugando-se aspectos clínicos e histopatológicos. É importante que haja comunicação entre o clínico e o patologista. Ocasionalmente o exame de imunofluorescência pode ser necessário e, em longo prazo, deve-se observar comportamento e progressão

da doença, não só para fins de tratamento, mas também para conferir o diagnóstico inicial de LPB (Cheng *et al.*, 2016).

O aspecto histopatológico mostra degeneração balonizante da camada basal do epitélio além de infiltração de linfócitos T e macrófagos dispostos em banda na faixa subepitelial (Derossi and Ciarrocca, 2005). A figura 2 mostra corte histológico de Líquen Plano bucal apresentando acantose, liquefação degenerativa da camada basal e infiltrado inflamatório na porção superficial do tecido conjuntivo composto predominantemente por linfócitos.

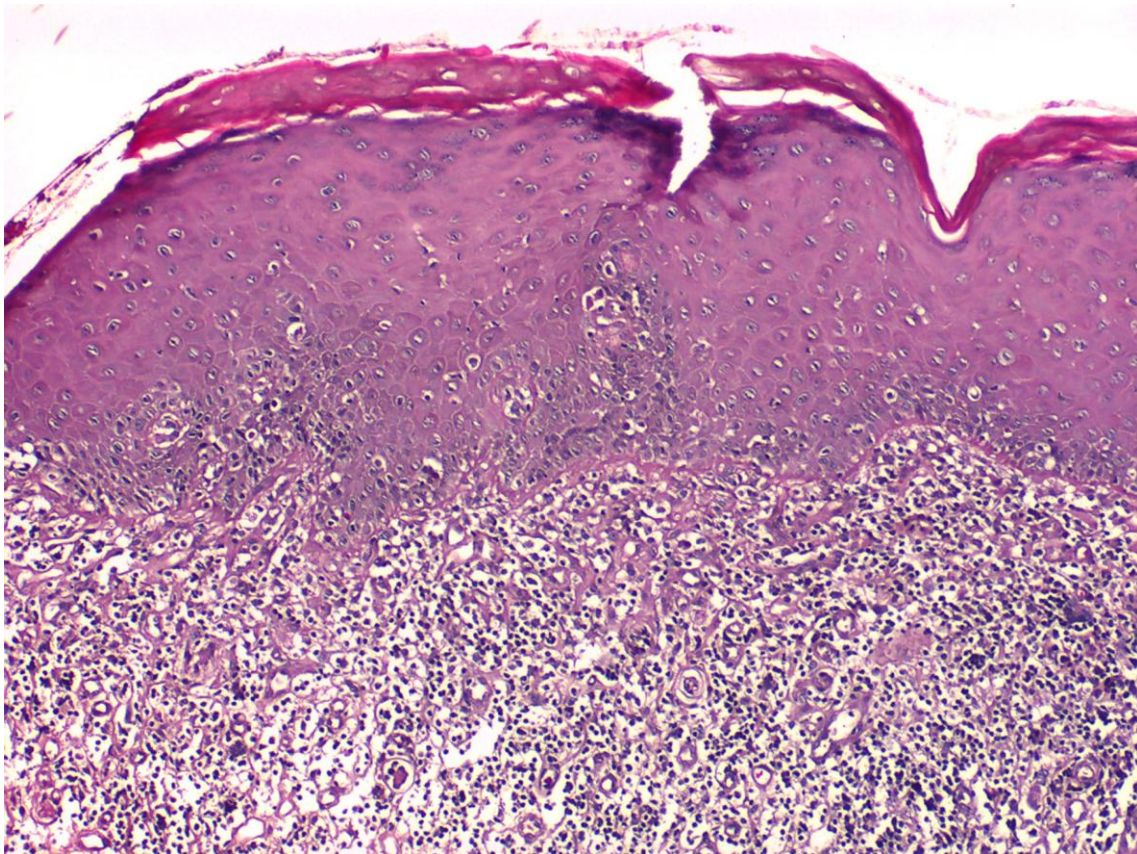


Figura 2: Corte histológico corado por Hematoxilina e Eosina de Líquen Plano bucal mostrando acantose, liquefação degenerativa da camada basal e infiltrado inflamatório na camada superficial do tecido conjuntivo predominantemente composto de linfócitos (aumento de 400x).

Só há indicação de tratamento quando há presença de sintomatologia dolorosa (geralmente, apenas nas formas atrófica, bolhosa e erosiva). Os

pacientes respondem bem ao tratamento com corticosteroides tópicos ou sistêmicos (Schlosser, 2010).

2.2.1 A resposta imune celular no líquen plano bucal

Estudos sugerem que o LPB é uma doença autoimune mediada por células T (Sugerman *et al.*, 2000). Nas lesões iniciais, há predominância de linfócitos T CD4⁺, porém, em lesões mais avançadas, as células T CD8⁺ predominam. Isso ocorre porque nos primeiros estágios da doença há reconhecimento ou apresentação de antígenos e ativação linfocitária (função das células T CD4⁺) (De Panfilis, *et al.* 1983; Lu *et al.*, 2014).

A presença de infiltrado de células T CD4⁺ auxiliares (Th) proporcionam aumento da expressão de moléculas de adesão e de secreção de citocinas (Sugerman, Savage and Seymour, 1994). Portanto, há um aumento local nos níveis de citocinas inflamatórias além de alterações na expressão de moléculas responsáveis pela adesão celular (Buechner, 1984).

À medida que as lesões vão se agravando, ocorre dano aos queratinócitos pela ativação dos linfócitos T CD8⁺ (De Panfilis, *et al.* 1983). As células T CD8⁺ ativadas podem liberar quimiocinas que atraem outros linfócitos e outras células imunes, o que contribui para progressão da resposta inflamatória (Yamamoto and Osaki, 1995). Estudos anteriores identificaram em lesões de LPB grande variedade de moléculas pró-inflamatórias que são sintetizadas e secretadas pelo infiltrado de ambas as células T (Th e CD8⁺) e alteração em queratinócitos (Yamamoto and Osaki, 1995). Isso indica que o desenvolvimento das lesões de LPB é fortemente associado à produção e ativação de moléculas inflamatórias. (Lu *et al.*, 2014).

As células T auxiliares (Th) 1 e 2 são subdivisões das células T (Pouralibaba, *et al.*, 2013). Uma regula a função da outra através da produção de citocinas com papéis antagonistas, determinando assim as características da resposta imune (Rengarajan, Szabo and Glimcher, 2000; Gor Do, Rose and Greenspan, 2003). Sabe-se que as células T auxiliares 1 (Th1) secretam citocinas como interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Rengarajan, Szabo and Glimcher, 2000), Interleucina-2 (IL-2), TNF- β , IFN- γ e interleucina-1 beta (IL-1 β), (Rhodus and Ondrey, 2007), que regulam a resposta imune celular e atuam principalmente no início e progressão da inflamação. Essas citocinas desencadeiam danos aos queratinócitos, fazem ativação de citocinas quimiotáticas bem como facilitam a sua migração os tecidos (Sugermann, *et al.*, 2002; Sugermann, *et al.*, 1996).

As células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 IL-13 (Rengarajan, Szabo and Glimcher, 2000) e IL-6 (Rhodus, Rose and Ondrey, 2007) e participam da resposta imune humoral (regulação e produção de anticorpos) suprimindo a resposta imune celular (Liu *et al.* 2014; Gor Do, Rose and Greenspan, 2003; Rengarajan, Szabo and Glimcher, 2000; Hagiwara, *et al.* 1995). Estudos mostram que a diminuição do número de IL-10 em células produtoras de sangue periférico em pacientes com LPB podem indicar uma incapacidade do sistema imunológico para inibir o processo citotóxico nessas lesões (Sugermann *et al.* 1992).

Existem ainda as células Th17, uma terceira subdivisão da família das células Th. Apresentam função de controlar as respostas imunes e inflamatórias através da secreção de algumas citocinas, como as interleucinas-17A (IL-17A) e 17F (IL-17F) que apresentam efeitos pró-inflamatórios em uma

ampla variedade de células, incluindo macrófagos, células endoteliais, e fibroblastos e contribuem para a progressão do LP (Shibata, *et al.*, 2008).

Por fim, existe uma subclasse de células auxiliares denominadas Th22 que produzem a interleucina-22 (IL-22). Recentemente, foi apontado envolvimento da IL-22 na patogênese de doenças auto-imunes e inflamatórias como psoríase, lúpus eritematoso e artrite reumatóide (Tian, Yu and Ma, 2013). Estudos pilotos recentes mostraram o aumento da expressão de IL-22 em lesões LP, o que sugere a atuação dessa citocina na patogênese da doença (Chen, *et al.* 2013).

2.3 O papel da epigenética na regulação da expressão gênica

Inicialmente, o termo “epigenética” foi usado para definir alguns mecanismos causais que relacionavam as informações genéticas contidas no organismo com o ambiente. Recentemente, a definição de epigenética passou a incluir tanto as alterações hereditárias independentes do DNA que interferem na expressão gênica, quanto às alterações na transcrição que não são necessariamente hereditárias (Cribbs *et al.*, 2015).

O risco de desenvolver doenças autoimunes depende tanto de fatores genéticos quanto ambientais. Os mecanismos epigenéticos têm capacidade de regular a expressão gênica e traduzir estímulos ambientais em modificações estáveis no genoma (Leoni *et al.*, 2015).

2.3.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético que acontece frequentemente no processo de regulação de alguns genes (Bjanesoy *et al.*

2014). É caracterizada pela adição do grupo metil na posição 5' do anel citosina e é mediada por enzimas DNA metiltransferase (DNMT) (Leoni *et al.*, 2015). Após a metilação, os fatores de transcrição ficam impedidos de atuar no promotor do gene. Desta forma, a transcrição é efetivamente inibida (Baylin, 2005).

Embora alguns genes que controlam as funções imunológicas sejam conhecidos por serem regulados pela metilação do DNA, a compreensão sobre o impacto das modificações epigenéticas na regulação das células T ainda é limitado (Leoni *et al.*, 2015). Estudos revelam que a hipermetilação de regiões promotoras causam silenciamento do gene, enquanto a hipometilação intragênica leva à ativação do gene (Hon *et al.*, 2012).

2.3.2 A metilação na regulação da resposta inflamatória

Já foi proposto na literatura que a expressão de alguns mediadores inflamatórios são regulados pela metilação (Ehrlich *et al.*, 1982). Campos *et al.* (2013) constataram um perfil de metilação do gene *INFG* alterado em cistos radiculares e granulomas periapicais. Em outro trabalho realizado em 2015, Campos *et al.*, afirmaram que o gene *FOXP3* se apresenta hipermetilado em lesões periapicais comparado com folículos pericoronários.

O padrão de metilação do DNA também tem se mostrado alterado em muitas doenças autoimunes (Lu, 2013; Selmi *et al.*, 2012). Em 2015, Renauer *Et al.* verificaram um padrão de metilação diferenciado para distintas formas clínicas de lúpus eritematoso sistêmico. Para pacientes com histórico de *rash* malar foi encontrado um padrão hipometilado para *MIR886* e *TRIM69* e

hipermetilado para o *RNF39*. Para pacientes com histórico de rash discoide foi encontrado perfil hipometilado para o gene *RHOJ* (gene relacionado ao citoesqueleto) (Renauer *et al.*, 2015). Em um estudo realizado em 2014 por Bjanesoy *et al.* sugeriram um papel regulador da metilação no curso da doença de Addison autoimune através da identificação de múltiplas regiões promotoras de genes hipometiladas em células T CD4⁺ isoladas de pacientes portadores da doença. Por fim, Cribs Feldmann e Oppermann (2015) avaliaram, em uma revisão de literatura, estudaram alterações no perfil de metilação em pacientes portadores de artrite reumatóide e, constataram que a metilação do gene promotor da IL-6 é um dos principais mecanismos que interferem no curso da doença.

Ainda não é possível determinar o momento em que a metilação ocorre ou se isso é consequência da doença, do tratamento médico e se realmente interfere no curso dos processos autoimunes (Bjanesoy *et al.*, 2014).

3. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O líquen plano bucal é uma doença dermatológica crônica comum que frequentemente acomete a mucosa bucal (Scully and El-Kom, 1985; Liu, *et al.* 2014). É de considerável relevância clínica devido à sua incidência relativamente alta (Poualibaba, *et al.* 2013). Sua etiologia ainda não é completamente compreendida (Liu *et al.*, 2014; Chen, *et al.*, 2013), portanto, identificar os mecanismos epigenéticos envolvidos na patogênese do LPB é fundamental para o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença.

Este trabalho visa elucidar o papel da metilação na etiopatogenia da resposta imuno-inflamatória da doença. Com isso vislumbra-se que terapias moleculares poderão, futuramente, ter grande impacto no manejo clínico do paciente com a doença.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Avaliar o perfil de metilação das diferentes formas clínicas de líquen plano bucal;

4.2 Objetivos específicos

- Comparar o perfil de metilação dos genes *BCL10*, *BCL3*, *HMOX1*, *IL12A*, *TRAF6*, *MALT1*, *SOD 1*, *MAP3K7*, *TRAF 2*, *STAT5A*, *INHA*, *INHBA*, *GATA3*, *IRF1*, *SMAD3*, *IDF2BP2*, *ELA2*, *LTB*, *MYD88*, *NOD1* e *TLR2*, *TRAF* entre as diferentes formas clínicas de LPB e mucosa normal;
- Comparar o perfil de metilação dos genes *BCL10*, *BCL3*, *HMOX1*, *IL12A*, *TRAF6*, *MALT1*, *SOD 1*, *MAP3K7*, *TRAF 2*, *STAT5A*, *INHA*, *INHBA*, *GATA3*, *IRF1*, *SMAD3*, *IDF2BP2*, *ELA2*, *LTB*, *MYD88*, *NOD1* e *TLR2*, *TRAF* no LPB reticular/em placa com erosivo.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação e aprovado pelo Colegiado de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e do Hospital Metropolitano Odilon Behrens (CAAE: 57753916.3.0000.5149), obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS nº 466/12 e 304/00 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Todos os pacientes foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa, concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXOS A e B) por livre e espontânea vontade.

5.2 Critérios de elegibilidade

Para os grupos caso (LPB) foram selecionados pacientes com diagnóstico clínico de LPB atendidos na Clínica de Semiologia e Patologia Bucal – UFMG e no serviço de estomatologia do Hospital Metropolitano Odilon Behrens (HMOB), em Belo Horizonte. Em todos os casos houve necessidade de realização de biópsia incisional da lesão com finalidade diagnóstica.

Para o grupo controle foram selecionados pacientes saudáveis, sem diagnóstico de neoplasias de origem epitelial, alterações infecciosas ou inflamatórias submetidos à cirurgia para exodontia de terceiros molares inclusos na clínica de cirurgia da Faculdade de Odontologia da UFMG (FO-

UFMG) e que foram submetidos à remoção de mucosa dentro das indicações de procedimentos cirúrgicos dessa natureza.

5.3 Critérios de exclusão

Foram eliminados deste trabalho todos os pacientes que se recusaram a assinar o TCLE.

Foram excluídos pacientes que relataram desordens neoplásicas, infecciosas ou imunoinflamatórias diagnosticadas na cavidade bucal (com exceção do líquen plano) ou que estiveram em tratamento com qualquer tipo de anti-inflamatório nos últimos 3 meses antes do momento da biópsia.

5.4 Coleta e armazenamento das amostras

Os pacientes recrutados responderam a um questionário (ANEXO C) cuja finalidade foi o estadiamento clínico da doença e obtenção de dados acerca das condições sistêmicas dos mesmos. Em seguida, foram divididos em 3 grupos: Grupo caso (1): pacientes com a forma clínica reticular e/ou em placa do LPB (2): pacientes com a forma clínica erosiva do LPB; E grupo controle (3): fragmento de mucosa normal de pacientes saudáveis submetidos à exodontia.

Os pacientes com LPB que apresentaram mais de uma forma clínica de LPB foram classificados de acordo com o tipo de lesão que acometeu a área biopsiada.

Os tecidos, logo após serem biopsiados, foram divididos em dois fragmentos: O primeiro foi acondicionado em formaldeído a 10% e enviado para processamento de rotina e confirmação do diagnóstico. O outro fragmento foi armazenado em solução de RNA Later® (Thermo Fisher Scientific,

Wilmington, EUA) durante 24 horas e, logo após, mantido congelado a -80°C em nitrogênio líquido até o momento da realização dos experimentos. Para os pacientes do grupo controle, todo tecido coletado foi armazenado em RNA Later® (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA) durante 24 horas e mantido congelado a -80° em nitrogênio líquido até o momento do processamento.

As amostras só foram processadas após confirmação histopatológica de diagnóstico feita por patologista bucal (RSG) seguindo critérios da OMS e da Academia Americana de Patologia Oral e Maxilo-facial (Cheng *et al.*, 2016).

5.5 Análise da metilação do DNA

5.5.1 Extração de DNA

Para a análise da metilação do DNA, foi realizada extração do DNA genômico (gDNA) das amostras de tecido fresco previamente coletadas e congeladas utilizando o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Germany). A digestão do tecido foi feita com a enzima proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante.

A quantificação do DNA foi feita em 1 microlitro (μL) de amostra no NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). A integridade do DNA foi avaliada através de PCR convencional em gel de poli-acrilamida.

5.5.2 Metilação do DNA e reação de qRT-PCR

As amostras foram divididas em pool 1): 06 amostras de LPB reticular, em placa, 2): 05 amostras de LPB erosivo e 3) 05 amostras de mucosa normal,

de acordo com os critérios já descritos no item 5.4. A concentração final de gDNA foi de 1 µg/pool, conforme proposto pelo fabricante.

Após preparo dos pools foi feita avaliação da metilação dos genes *BCL10*, *BCL3*, *HMOX1*, *IL12A*, *TRAF6*, *MALT1*, *SOD 1*, *MAP3K7*, *TRAF 2*, *STAT5A*, *INHA*, *INHBA*, *GATA3*, *IRF1*, *SMAD3*, *IDF2BP2*, *ELA2*, *LTB*, *MYD88*, *NOD1* e *TLR2*, *TRAF* em cada pool utilizando o kit EpiTect® Methyl II Signature Human Cytokine Production PCR Array (EAHS 541Z-1, SABiosciences, Qiagen, Valencia, CA). Embora o *FOXP3* fizesse parte do kit, optou-se por não avaliar o perfil de metilação da região promotora deste gene, uma vez que o gene está localizado no cromossomo X e, para este tipo de análise seria necessário categorizar por sexo os pacientes incluídos em cada pool.

Tabela 1: Composição do kit EpiTect Methyl II Signature Human Cytokine Production PCR Array

Função	Gene
Regulação da função de células T	<i>BCL10</i> , <i>BCL3</i> , <i>HMOX1</i> , <i>IL12 A</i> , <i>MALT1</i> , <i>MAP3K7</i> , <i>SOD1</i> , <i>STAT5A</i> , <i>TRAF2</i> , <i>TRAF6</i>
Regulação da função de células B	<i>BCL10</i> , <i>BCL3</i> , <i>INHA</i> , <i>INHBA</i> , <i>STAT5A</i>
Regulação da transcrição	<i>BCL10</i> , <i>BCL3</i> , <i>GATA3</i> , <i>IRF1</i> , <i>SMAD3</i> , <i>STAT5A</i>
Regulação da tradução	<i>BCL3</i> , <i>IGF2BP2</i>
Resposta ao estímulo intracelular e ambiental	<i>BCL10</i> , <i>BCL3</i> , <i>ELA2</i> , <i>GATA3</i> , <i>HMOX1</i> , <i>IL12A</i> , <i>INHA</i> , <i>INHBA</i> , <i>LTB</i> , <i>MALT1</i> , <i>MYD88</i> , <i>NOD1</i> , <i>SMAD3</i> , <i>SOD1</i> , <i>STAT5A</i> , <i>TLR</i>
Sinalização molecular e produção de citocinas	<i>BCL10</i> , <i>BCL3</i> , <i>HMOX1</i> , <i>INHA</i> , <i>INHBA</i> , <i>LTB</i> , <i>MALT1</i> , <i>MAP3K7</i> , <i>MYD88</i> , <i>NOD1</i> , <i>SMAD3</i> , <i>SOD1</i> , <i>STAT5A</i> , <i>TLR2</i> , <i>TRAF2</i> , <i>TRAF6</i>

Fonte: Biogen, 2015

Os pools foram aliquotados em quatro porções iguais: a primeira sem enzima; a segunda submetida à digestão por enzima sensível à metilação (MSRE); a terceira porção foi submetida à digestão por enzima dependente da

metilação (MDRE); e a última submetida à dupla digestão (MSRE e MDRE), conforme proposto pelo fabricante. Após as reações enzimáticas, foi feita adição de qPCR master mix (SABiosciences, Qiagen, Valencia, CA) e pipetagem das amostras em placa contendo 96 poços pré-aliquotados com primers correspondentes aos genes supracitados.

A placa foi submetida a uma reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR), utilizando ciclos com condições específicas de temperatura. A análise de dados foi realizada utilizando-se uma matriz específica para PCR EpiTect Methyl II específica baseada no Microsoft Excel (disponível em www.sabiosciences.com/dna_methylation_data_analysis.php), de acordo com instruções do fabricante. O modelo do Excel normaliza os valores de cycle threshold (Ct) das amostras digeridas para calcular a porcentagem de gDNA metilado e não metilado

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO

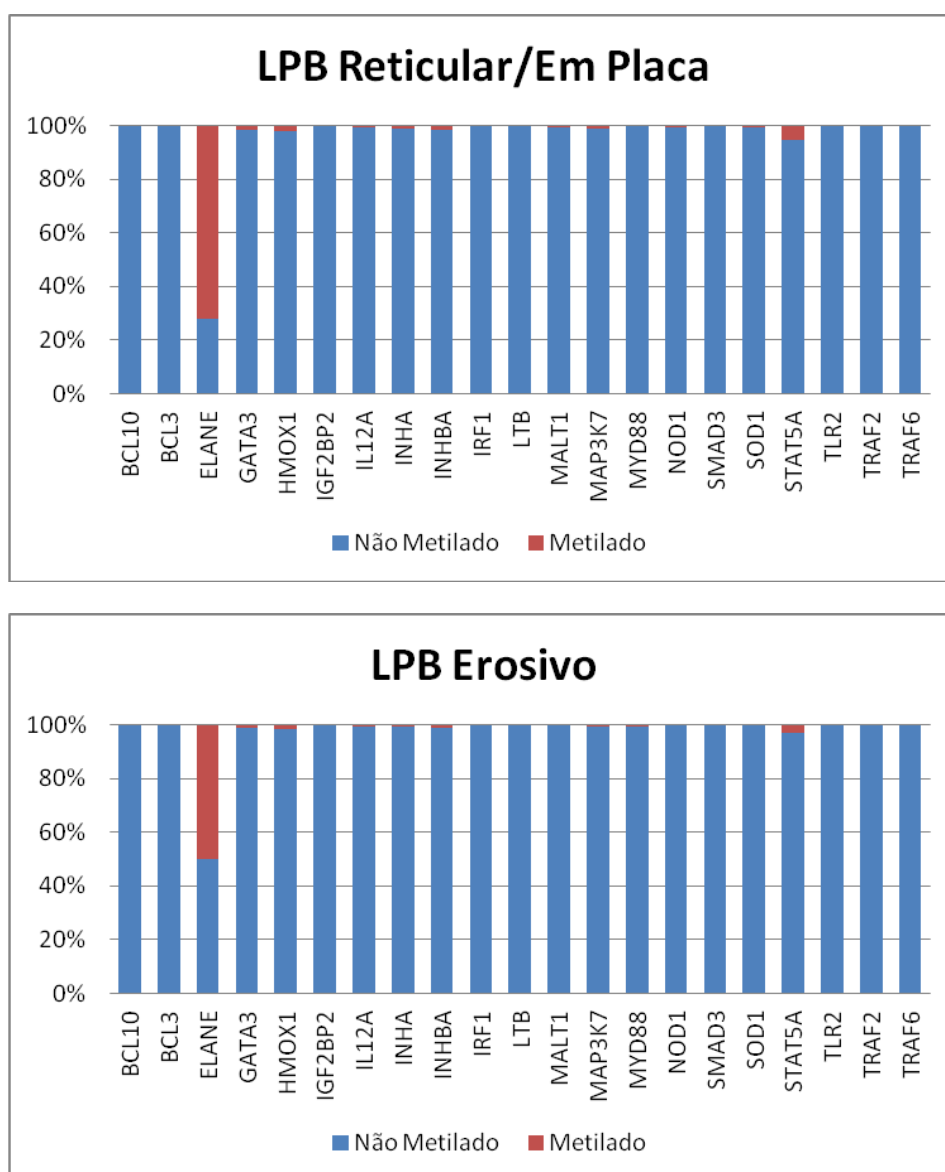
A Tabela 2 mostra os principais dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo.

Tabela 2: Dados clínicos dos pacientes incluídos na análise de metilação gênica

Paciente	Apresentação clínica	Sexo	Idade (anos)	Localização
01	Reticular	Masculino	63	mucosa jugal
02	Reticular	Feminino	64	mucosa jugal
03	Reticular	Feminino	20	mucosa jugal
04	Reticular	Feminino	55	mucosa jugal
05	Em placa	Feminino	53	mucosa jugal
06	Reticular	Feminino	55	fundo de vestibulo
07	Erosivo	Feminino	60	mucosa jugal
08	Erosivo	Masculino	62	mucosa labial superior
09	Erosivo	Feminino	47	mucosa jugal
10	Erosivo	Feminino	60	mucosa jugal
11	Erosivo	Masculino	73	mucosa jugal
12	Mucosa normal	Feminino	24	Gengiva inserida (dente 11)
13	Mucosa normal	Feminino	46	Rebordo alveolar
14	Mucosa normal	Masculino	14	Gengiva inserida (dente 36)

15	Mucosa normal	Feminino	37	Gengiva inserida
16	Mucosa normal	Masculino	45	Mucosa alveolar vestibular

Os níveis de metilação da região promotora dos 22 genes relacionados à resposta imune nos grupos de LPB e mucosa bucal normal estão apresentados na Figura 3.



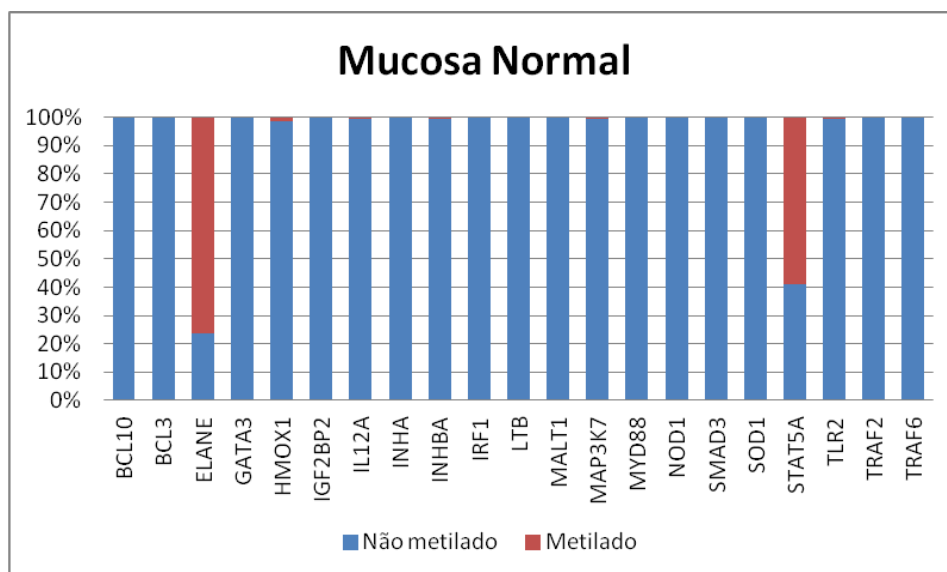


Figura 3: Níveis de metilação nos pools de líquen plano bucal (LPB) reticular/em placa, LPB erosivo e mucosa bucal normal. Nota-se que *STAT5A* mostrou menores taxas de metilação nos pools de LPB e comparado ao grupo controle.

Os genes com os níveis de metilação mais discrepantes entre os grupos estão representados na Tabela 3.

Tabela 3: Níveis de DNA metilado na região promotora dos genes *ELANE* e *STAT5A*

GENE	LPB Reticular/ em placa		LPB erosivo		Mucosa normal	
	NM(%)	M (%)	NM (%)	M (%)	NM (%)	M (%)
STAT5A	94,57	5,43	97,24	2,76	40,95	59,05
ELANE	27,84	72,16	50,00	50,00	23,68	76,32

LPB: Líquen Plano Bucal; NM: Não metilado; M: metilado.

O percentual de metilação da região promotora do *STAT5A* na mucosa bucal normal (59,05%) apresentou valores discrepantes comparado ao LPB reticular/em placa e erosivo (5,43% e 2,76%, respectivamente). Por outro lado, ao compararmos LPB reticular/em placa com LPB erosivo, encontrou-se hipermetilação da região promotora do *ELANE* no LPB reticular/em placa (72,16%) em relação ao LPB erosivo (50,00%).

7 Discussão

O desenvolvimento de doenças imunomediadas depende tanto de fatores genéticos quanto ambientais. Os mecanismos que participam da regulação gênica através da tradução de modificações causadas pelo ambiente em alterações estáveis no genoma são chamados de epigenéticos (Leoni *et al.*, 2015). Embora a metilação do DNA seja um dos mecanismos epigenéticos mais bem elucidados e mecanisticamente entendidos (Smith e Meissner, 2013), há uma escassez de dados no que se refere ao perfil de metilação do DNA em lesões de LPB.

Estudos prévios encontraram perfil hipermetilado das regiões promotoras do micro-RNA 137 (miR-137) (Morandi *et al.*, 2015, Dang *et al.*, 2013) e do gene *P-16* (Dang *et al.*, 2013) em LPB comparado à mucosa normal. Tanto o *P-16* quanto o miR-137 são conhecidos por participarem do processo de carcinogênese em carcinomas de células escamosas bucal atuando na supressão de tumor (Demokan *et al.*, 2012) e no controle do ciclo celular (Kozaki *et al.*, 2008), respectivamente. Outro estudo avaliou os níveis de metilação das regiões promotoras de genes relevantes para carcinogênese em lesões liquenóides, incluindo o LPB e não foi encontrada diferença do perfil de metilação comparado à mucosa normal (Bediaga *et al.*, 2014). Portanto, ainda não há na literatura estudos que propuseram a investigação do papel da metilação em genes envolvidos na resposta imunoinflamatória do LPB. Este trabalho trata-se de um estudo transversal que analisou os padrões de metilação do DNA em regiões promotoras de 21 genes relacionados à resposta imune nas diferentes formas clínicas de LPB.

Neste estudo, inicialmente foram comparados os níveis de metilação nas diferentes formas clínicas de LPB com a mucosa bucal normal. Entre os 21 genes analisados, o *STAT5A* apresentou o perfil mais discrepante no LPB em relação à mucosa normal. Os pools de LPB, incluindo as formas reticular/em placa e erosiva, apresentaram um estado hipometilado predominante (5,4% e 2,7%, respectivamente) em relação à mucosa normal (59,0%).

O *STAT5A* é um fator de transcrição membro da família STAT. É ativado por uma variedade de citocinas e hormônios e desempenha um papel essencial no desenvolvimento de células T reguladoras (Treg) (Rochman *et al.*, 2009). Estudos anteriores sugeriram o papel da metilação do *STAT5A* em processos inflamatórios, como doenças alérgicas das vias aéreas (Stefanowicz *et al.*, 2012), porém, ainda não existem na literatura dados que remetem à participação deste gene nos processos inflamatórios do LP. Este trabalho trata-se de estudo piloto que investiga a hipótese de que a modulação epigenética deste gene poderia ser relevante para o desenvolvimento da doença. Estudos adicionais são necessários para confirmar ou refutar este pressuposto.

A região promotora do gene *ELANE* mostrou perfil de metilação mais diferenciado quando comparados os tipos clínicos de LPB entre si. Este gene é responsável pela produção da proteína elastase neutrofílica que participa da propagação da inflamação neutrofílica através da aceleração da produção de citocinas pró-inflamatórias (Griffin *et al.*, 2014). Como não há dados disponíveis sobre a expressão *ELANE* no LPB, este é um alvo atraente para estudos futuros.

A primeira evidência que sugeriu a participação da metilação na autoimunidade foi publicada em 1986 (Richardson, 1986 e Richardson *et al.*,

1986). Estes autores investigaram o efeito do inibidor da DNA metiltransferase 5-azacytidina na indução de sintomas associados à autoimunidade. Um genoma globalmente hipometilado é observado em pacientes diagnosticados com doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico (Liu *et al.*, 2011) e doença de Addison autoimune (Bjanesoy *et al.*, 2014). Considerando que as doenças autoimunes são complexas e apresentam desafios específicos aos pesquisadores que procuram definir sua etiologia e explicar a progressão (Yang *et al.*, 2010), vários mecanismos envolvidos na patogênese dessas doenças podem servir como alvos em terapêutica, como inibidores de DNA-metiltransferases aplicados em modelos animais e em ensaios clínicos (Zhang and Zhang, 2015) Portanto, a metilação gênica pode ser considerada importante mecanismo de regulação da expressão gênica e estudos futuros podem ser impactantes no manejo de pacientes com LPB.

Este estudo sugere que o estado de metilação das regiões promotoras de genes que participam da resposta imunológica do LPB difere com a mucosa normal e entre os tipos clínico da doença. Embora não seja possível estabelecer uma relação causa-efeito entre a metilação dos genes com sua expressão na doença, nossos resultados mostram dados promissores que precisam ser investigados.

8 Conclusão

- O gene *STAT5A* apresentou estado hipometilado nas diferentes formas clínicas do LPB quando comparados à mucosa normal. Estudos adicionais, como avaliação da expressão deste gene, são necessários para validação deste dado.
- O gene *ELANE* apresentou maior discrepância nos níveis de metilação quando comparadas entre si as formas clínicas da doença. Para validação deste resultado são necessários estudos adicionais

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AXELL T AND RUNDQUIST L, Oral Lichen Planus- a Demographic Study. *Community Dent Oral Epidemiol*, v.15, n.1, p. 52-56, 1987.
- 2 BAGÁN JVS *et al.*, A clinical study of 205 patients with oral lichen planus. *J Oral Maxillofac Surg*, v.50, p. 116-118m, 1992.
- 3 BANHAM, A.H., POWRIE F.M., SURI-PAYER, FOXP3+ regulatory T cells: current controversies and future perspectives. *Eur. J. Immunol.* v.36, p.2832–2836, 2006.
- 4 BAYLIN SB, DNA methylation and gene silencing in cancer, *Nature Clinical Practice Oncology* v.2, S4-S11, 2005.
- 5 BEDIAGA NG, *et al.*, Global DNA methylation: uncommon event in oral lichenoid disease, *Oral Dis*, v.20, n.8, p.821-826, 2014.
- 6 BERGER, S, *et al.*, An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* V.23, p.781–783, 2009.
- 7 BJANESØY TE, *et al.*, Altered DNA methylation profile in Norwegian patients with Autoimmune Addison's Disease. *Molecular Immunology* v.59, p.208–216, 2014.
- 8 BOUQUOT JE AND GUNDLACH KK, Common oral lesions found during a mass screening examination. *J Am Dent Assoc*, v.112, n.1, p.50-57, 1986.
- 9 BRANT JM, VASCONCELOS AS AND RODRIGUES LV, Role of angiogenesis in the pathogenesis of oral lichen planus, *J Oral Maxillofac Pathol.* v.16, n.1, p.45–48, 2012.
- 10 BUECHNER S, T-cell subsets and macrophages in lichen planus. *Dermatologic* v.169, p.325-329, 1984.
- 11 CAMPOS K, *et al.*, FOXP3 DNA Methylation Levels as a Potential Biomarker in the Development of Periapical Lesions, *Basic Research-Biology*, v41, n2, 2015.
- 12 CAMPOS K, *et al.*, Methylation pattern of IFNG in periapical granulomas and radicular cysts, *J Endod*, v.39, n.4, p.493-496, 2013.

- 13 CHEN X, *et al.*, Immunoexpression of Interleukin-22 and Interleukin-23 in Oral and Cutaneous Lichen Planus Lesions: A Preliminary Study. *Mediators of Inflammation*, v.2013, p. 1-7, 2013.
- 14 CHENG YL, GOULD A, KURAGO Z, Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral Surg Oral Pathol Oral Med*, v.122, n.3, 2016.
- 15 CRIBBS A, FELDMANN A AND OPPERMAN U, Towards an understanding of the role of DNA methylation in rheumatoid arthritis: therapeutic and diagnostic implications. *Ther Adv Musculoskel Dis*, v. 7, n.5, p. 206–219, 2015.
- 16 DANG J, *et al.*, MicroRNA-137 promoter methylation in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, v.42, n.4, p.315-321, 2013.
- 17 DEMOKAN S, *et al.*, Promoter methylation and loss of p16(INK4a) gene expression in head and neck cancer, *Head Neck*. v.34, n.10, p.1470-1475, 2012.
- 18 DE PANFILIS, G *et al.*, T cell infiltrate in lichen planus. Demonstration of activated lymphocytes using monoclonal antibodies. *J Cutan Pathol*, v.10, p.52-58, 1983.
- 19 DEROSI SS AND CIARROCCA KN. Lichen Planus, Lichenoid drug reactions and Lichenoid mucositis, *Dental Clinics of North America*, v.49, n.1, p. 77-89, 2005.
- 20 EISEN, D. The Clinical Features, Malignant Potential and Systemic Associations of Oral Lichen *Cytokine* Planus: a Study of 723 Patients, *J Am Acad Dermatol*, v.46, n.2, p. 207-214, 2002.
- 21 EHRLICH M, *et al.*, Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells, *Nucleic Acids Res*, v.24, n.10, p.2709- 2721, 1982.
- 22 GOR DO, ROSE NR AND GREENSPAN NS. TH1 – TH2: a procrustean paradigm, *Nature Immunology*, v. 4, n. 6, p.503–505, 2003.
- 23 GRIFFIN KL *et al.*, 2-O, 3-O-desulfated heparin inhibits neutrophil elastase-induced HMGB-1 secretion and airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50: 684-689, 2014.

- 24 GROSSMANN SMC, Associação entre Líquen Plano Bucal e a Hepatite Crônica causada pelo vírus C, Tese (Mestrado em Estomatologia) – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.
- 25 HAGIWARA, E *et al.*, Phenotype and frequency of cells secreting IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN and TNF-alpha in human peripheral blood., v.7, n.8, p.815-22, 1995.
- 26 HE L AND HANNON GJ, MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, n.5, v.7, p.522–531, 2004.
- 27 HIRST M. and MARRA, M. Epigenetics and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* v.4, p.136–146, 2009.
- 28 HON GC *et al.*, Global DNA hypomethylation coupled to repressive chromatin domain formation and gene silencing in breast cancer. *Genome Res*, v.22, n.2, p. 246-258, 2012.
- 29 ISMAIL SB, KUMAR SKS AND ZAIN RB. Oral Lichen Planus and Lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation, *Journal of Oral Science*, v. 49, n.2, p. 89-106, 2007.
- 30 JIANG X, *et al.*, Epigenetic Regulation of Antibody Responses by the Histone H2A Deubiquitinase MYSM1, *Sci Rep*, v,5, p. 13755, 2015.
- 31 JURETÍC M, *et al.*, Salivary Levels of TNF- α and IL-6 in Patients with Oral Premalignant and Malignant Lesions (proinflammatory cytokines / premalignant / malignant lesions), *Folia Biologica*, v.57, p.99-102, 2013.
- 32 KOZAKI K, *et al.* Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer, *Cancer Res*. v.68, n.7, p.2094-2105, 2008.
- 33 LEI L, *et al.*, Foxp3 gene expression in oral lichen planus: a clinicopathological study, *Mol Med Rep*, v.9, n.3, p.928-934, 2014
- 34 LEONI C *et al.*, Epigenetics of T lymphocytes in health and disease. *Swiss Med Wkly*. 145:w1419, 2015.
- 35 LIU WZ, *et al.*, Interferon-c and interleukin-4 detected in serum and saliva from patients with oral lichen planus, *International Journal of Oral Science*, v.6, p. 22-26, 2014.

- 36 LODI, G et al., Current Controversies in Oral Lichen Planus: Report of an International Consensus Meeting, Part 1. Viral Infections and atypogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod*, v.100, p. 40-51, 2005.
- 37 LU, R et al., Overexpression and Selectively Regulatory Roles of IL-23/IL-17 Axis in the Lesions of Oral Lichen Planus, Mediators Of Inflammation, v. 2014, p.1-12, 2014.
- 38 MAEHARA T et al., Cytokine Profiles Contribute to Understanding the Pathogenic Difference Between Good Syndrome and Oral Lichen Planus: Two Cases Reports and Literature Review. *Medicine Journal*, v. 94, n. 14, p.1-5, 2015.
- 39 MALARKODI T AND SATHASIVASUBRAMANIAN S, Quantitative Analysis of Salivary TFN- α in Oral Lichen Planus Patients. *International Journal of Dentistry*, v. 2015, p. 1 a 5, 2015.
- 40 MATTISSON U, JONTELL M AND HOLMSTRUP P. Oral Lichen Planus and Malignant Transformation: Is a Recall of Patients Justified? *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, v13, n.5, p. 390-396, 2002.
- 41 MIGNOGNA MD, et al., Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in oral lichen planus: is there any evidence? *Oral Oncology*, v. 40, n. 2, p. 120–130, 2004.
- 42 MORANDI L, et al., DNA methylation analysis by bisulfite next-generation sequencing for early detection of oral squamous cell carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesion from oral brushing, *J Craniomaxillofac Surg*. v.43, n.8, p.1494-1500, 2015.
- 43 PARASHAR P, Oral Lichen Planus. *Otolaryngol Clin North Am*. V.44, n.1, p, 89-107, 2011.
- 44 PARK H et al., A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*, v. 6, n. 11, p. 1133–1141, 2005.
- 45 POURALIBABA F, et al., Serum Level of Interleukin-17 in Patients with Erosive and Non-erosive Oral Lichen Planus. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect* v.7, n.2, p.91-94, 2013.
- 46 RENAUER P, et al., DNA methylation patterns in naïve CD4+ T cells identify epigenetic susceptibility loci for malar rash and discoid rash in systemic lupus erythematosus, *Lupus Sci Med*. v.15, n.;2, p.1, 2015.

- 47 RENGARAJAN J, SZABO SJ AND GLIMCHER LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunology Today*,v. 21, n.10, p. 479–483, 2000.
- 48 RHODUS NL, CHENG B AND ONDREY F, Th1/Th2 Cytokine Ratio in Tissue Transudates from Patients with Oral Lichen Planus, Mediators of Inflammation, v.2007, p. 1-5, 2007
- 49 RICHARDSON, B., Effect of an inhibitor of DNA methylation on T cells. II. 5-Azacytidine induces selfreactivity in antigen-specific T4 + cells. *Hum Immunol* v.17, p. 456–470, 1986.
- 50 RICHARDSON, B., *et al.*, Effect of an inhibitor of DNA methylation on T cells. I. 5-Azacytidine induces T4 expression on T8 + T cells. *J Immunol*, v.137, p.35–39, 1986.
- 51 ROCHMAN Y, SPOLSKI R and LEONARD WJ, New insights into the regulation of T cells by γc family cytokines. *Nat Rev Immunol*.v.9, n7, p.480, 2009.
- 52 RODRÍGUEZ-NUÑEZ I, Peripheral T-cell subsets in patients with reticular and atrophic-erosive oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.91,p.180-8, 2001.
- 53 SCHLOSSER BJ, Lichen planus and lichenoid reactions of the oral mucosa. Schlosser BJ. *Dermatol Ther*, v.23, n.3, p251-267, 2010.
- 54 SCULLY C and EL-KOM M, Lichen planus: review and update on pathogenesis. *J Oral Pathol*. v.14, n.6, p.431-58, 1985.
- 55 SCULLY C AND PORTER SR. The clinical spectrum of desquamative gingivitis. *Semin Cutan Med Surg*, v.16, n.4, p.308–313, 1997.
- 56 SELMI C, *et al.*, Mechanisms of environmental influence on human autoimmunity: a National Institute of Environmental Health Sciences expert panel workshop, *J Autoimmun*. v.39, n.4, p.272-284, 2012.
- 57 SHEN Z *et al.*, Expression of Foxp3 and interleukin-17 in lichen planus lesions with emphasis on difference in oral and cutaneous variants *Arch Dermatol Res*, v.306, p.441–446, 2014.

- 58 SHIBATA K *et al.*, Identification of CD25+ $\gamma\delta$ T cells as fetal thymus-derived naturally occurring IL-17 producers, *The Journal of Immunology*, v.181, n. 9, p. 5940–5947, 2008.
- 59 SILVERMAN, S. J.; GORSKY, M.; LOZADA-NUR F. *et al.* A prospective study of findings and management in 214 patients with oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol., Michigan*, v. 72, n. 6, p. 665-70, Dec. 1991.
- 60 SILVERMAN, SJ AND BAHL S, Oral lichen planus update: clinical characteristics, treatment responses, and malignant transformation. *Am J Dent*, v.10, p.259-263. 1997.
- 61 SMITH, Z. and MEISSNER, A., DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, v.14, p.204–220, 2013.
- 62 SUGERMANN PB, Suppressor cell function in oral lichen planus. *J Dent Res*, v.71, n.12, p.1916-1919,1992.
- 63 SUGERMANN PB, SAVAGE NW AND SEYMOUR GJ, Phenotype and suppressor activity of T-lymphocyte clones extracted from lesions of oral lichen planus. *Br J Dermatol*. v.131, p.319–324, 1994.
- 64 SUGERMANN PB, *et al.*, Is there a role for tumor necrosis factor- α (TNF- α) in oral lichen planus?, *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 25, n. 5, p. 219–224, 1996.
- 65 SUGERMANN PB, *et al.*, The Pathogenesis of Oral Lichen Planus. *Crit Rev Oral Biol Med*, v.13, n.14, p.350-365, 2002.
- 66 TAO X *et al.*, FOXP3+ T regulatory cells in lesions of oral lichen planus correlated with disease activity. *Oral Diseases*, v.16, p.76–82, 2010.
- 67 TIAN, T YU S AND MA D. Th22 and related cytokines in inflammatory and autoimmune diseases. *Therapeutic Targets*, v. 17, n. 2, p.113–125, 2013.
- 68 VAZQUEZ-LOPEZ, F *et al.*, Dermoscopy of active Lichen Planus. *Arch Dermatol*, p. 143, 1992.
- 69 WARNAKULASURIYA S, JOHNSON NW AND VAN DER WAAL I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa, *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 36, n. 10, p. 575–580, 2007.

70 YAMAMOTO, T AND OSAKI, T. Characteristic cytokines generated by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Invest Dermatol*, v.104, p.784-788, 1995.

71 YANG X, *et al.*, Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, v.31, e1, p536–546, 2010.

72 ZHANG Z AND ZHANG R, Epigenetics in autoimmune diseases: Pathogenesis and prospects for therapy. *Autoimmunity Reviews*, v.14, p 854–863, 2015.

ANEXO A
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar da pesquisa **“Avaliação dos eventos epigenéticos na patogênese do líquen plano bucal”**. O líquen plano é uma doença que acontece na pele e na cavidade bucal de adultos e pode causar dor e ardência na boca. Nesta doença, o seu organismo não reconhece algumas de suas células e tenta destruí-las. Dessa forma, o líquen plano precisa ser melhor estudado para o entendimento dos mecanismos que levam à formação da doença. Este projeto de pesquisa tem como objetivo estudar algumas substâncias relacionadas à estas reações imunológicas, que podem levar ao aparecimento das lesões do líquen plano. O diagnóstico do Líquen Plano é dado por meio de uma biópsia, na qual um fragmento da lesão bucal será retirado, sob anestesia local, e mandado para análise histopatológica em laboratório de patologia bucal.

O diagnóstico do Líquen plano bucal é feito por meio de biópsia da lesão. Caso você concorde em participar deste estudo, será coletado um fragmento do tecido que será removido durante a biópsia. Portanto, caso você concorde em participar desta pesquisa, correrá o risco de sofrer complicações trans e pós operatórias. Estas complicações incluem dor, edema e infecções, porém, o procedimento cirúrgico faz parte do seu plano de tratamento e ocorrerá independente desta pesquisa. Não será removido nenhum fragmento de mucosa bucal além do necessário para a realização da biópsia.

A qualquer momento da pesquisa você poderá esclarecer suas dúvidas ou retirar o consentimento, havendo continuidade normal do seu tratamento. O seu tratamento será realizado normalmente mesmo que haja recusa em assinar esse termo.

A amostra obtida será utilizada para a finalidade do projeto e será descartada após o estudo. Sua identidade e seus dados pessoais não serão revelados em nenhum momento do estudo.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Declaro que li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas satisfatoriamente. Permito a utilização dos dados e resultados da pesquisa para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Recebi uma via deste documento e a outra via ficou em porte do pesquisador.

Local: _____

Data: ___/___/_____

NOME DO PACIENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ N.º: _____

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/ Aline Fernanda Cruz. Telefone: (31) 35409-2477

Emails: rsgomez@ufmg.br / alinecruzz16@gmail.com

ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PESQUISADOR AUXILIAR

Em caso de dúvidas quanto ao seu direito na pesquisa você poderá consultar o COEP (Comitê de Ética em Pesquisa): Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG, Brasil. 31270-901. Email: coep@prpq.ufmg.br / Tel: 31 3409-4592.

ANEXO B
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Destinado ao grupo controle)

Você está sendo convidado a participar da pesquisa **“Avaliação dos eventos epigenéticos na patogênese do líquen plano bucal”**. O líquen plano é uma doença que acontece na pele e na cavidade bucal de adultos e pode causar dor e ardência na boca. Nesta doença, o organismo não reconhece algumas de suas células e tenta destruí-las. Este projeto de pesquisa tem como objetivo estudar algumas substâncias relacionadas à estas reações imunológicas, que podem levar ao aparecimento das lesões do líquen plano.

Você será submetido a exodontia. Este procedimento inclui uma etapa de acerto na gengiva, que ocorre após a remoção do dente. Nesta etapa, para uma melhor cicatrização, há remoção de fragmentos de gengiva que estão irregulares. Estes fragmentos seriam descartados, porém, caso você concorde em participar deste estudo, iremos coletar este fragmento que servirá de controle em análises laboratoriais e seus resultados serão comparados aos resultados de amostras de lesões de líquen plano. Portanto, caso você concorde em participar desta pesquisa, correrá o risco de sofrer complicações trans e pós operatórias. Estas complicações incluem dor, edema e infecções, porém, o procedimento cirúrgico faz parte do seu plano de tratamento e ocorrerá independente desta pesquisa. Não será removido nenhum fragmento de mucosa bucal além do necessário para a realização do acerto gengival.

A qualquer momento da pesquisa você poderá esclarecer suas dúvidas ou retirar o consentimento, havendo continuidade normal do seu tratamento. O seu tratamento será realizado normalmente mesmo que haja recusa em assinar esse termo.

A amostra obtida será utilizada para a finalidade do projeto e será descartada após o estudo. Sua identidade e seus dados pessoais não serão revelados em nenhum momento do estudo.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Declaro que li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas satisfatoriamente. Permito a utilização dos dados e resultados da pesquisa para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Recebi uma via deste documento e a outra via ficou em porte do pesquisador.

Local: _____

Data: ___/___/_____

 NOME DO PACIENTE

 ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ N.º: _____

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/ Aline Fernanda Cruz. Telefone: (31) 35409-2477

Emails: rsgomez@ufmg.br / alinecruzz16@gmail.com

 ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

 ASSINATURA DO PESQUISADOR AUXILIAR

Em caso de dúvidas quanto ao seu direito na pesquisa você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa: Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG, Brasil. 31270-901. Email: coep@prpq.ufmg.br/Tel: 31 3409-4592.

ANEXO C
FICHA CLÍNICA

Dados Pessoais

Código: _____

Paciente n.º _____ Data: _____ Sexo: _____

Idade: _____ Data de nascimento: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Doença: Diagnóstico clínico: _____ Variante clínica: _____

Tempo da doença: _____

Regime medicamentoso: Paciente faz ou já fez uso de medicação de uso contínuo? Sim Não Quais? _____**História Médica:** Alterações sistêmicas: _____Alergia a algum medicamento: Sim Não Qual? _____Fumante? Sim Não Etilista? Sim Não**Manifestações clínicas bucais:** Localização: Mucosa jugal Língua Lábio Palato Gengiva Outros _____N.º. sítios envolvidos: 1 2 3 4 >4 Sintomas: Ausente PresenteAspecto clínico: Estrias brancas Eritema Úlcera Placas brancas

Tamanho da lesão (em mm): _____

Manifestações clínicas sistêmicas: Lesão pele: Ausente Presente

Localização: _____

Sintomatologia dolorosa: Ausente Presente**História familiar:** História de algum tipo de doença ou em algum familiar (qual doença e qual o grau de parentesco dos familiares?) e tratamento: _____