

GUILHERME MACHADO XAVIER

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS FUNCIONAIS DOS
GENES DAS CITOCINAS *IL-1B*, *IL-6*, *IL-10* E *TNF-A* E A
SUSCEPTIBILIDADE AO LÍQUEN PLANO BUCAL**

BELO HORIZONTE

2007

GUILHERME MACHADO XAVIER

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS FUNCIONAIS DOS
GENES DAS CITOCINAS *IL-1B*, *IL-6*, *IL-10* E *TNF-A* E A
SUSCEPTIBILIDADE AO LÍQUEN PLANO BUCAL

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Farmacologia, Bioquímica e
Molecular do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Farmacologia, Bioquímica
e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

BELO HORIZONTE

2007

Agradecimentos

A Deus pela saúde e disposição.

A minha mãe pelo apoio incondicional, pelo carinho, pelos conselhos de valor inestimável.

Ao meu irmão pela amizade e momentos de descontração.

A Carol pela compreensão, pelo carinho, pelo seu amor.

A minha avó Alice pelo amor de mãe, por seus cuidados e atenção.

Ao meu pai e todos os familiares pela presença em todos os momentos.

Ao meu orientador Ricardo Santiago Gomez pelo acolhimento, pela prestatividade, pelo seu exemplo como profissional e ser humano e pelo conhecimento compartilhado.

Ao amigo e mestre André pela paciência, atenção e ensinamentos preciosos.

A todos aqueles que deram algo a mais para tornar este momento uma realidade: Walderez O. Dutra, Paulo Eduardo A. Souza, Paula Rocha Moreira, Alessandra Rosa de Sá, Martinho Campolina e Ricardo Mesquita.

Aos colegas do Laboratório, em especial: Carol, Eliza Carla, Fabrício, Flávio Juliano, Jeane, João, Leandro Napier, Luciano Marques, Marina Diniz e Sérgio Neves. Por todos os agradáveis momentos que passamos juntos e pela inestimável ajuda.

Aos pacientes, que gentilmente concordaram em participar desta pesquisa.

A cada um que tenha participação direta ou indireta em minha formação de Mestre.

Dedicatória

A minha família.

A minha namorada, Carol.

Estas pessoas são a base da minha vida, meus grandes professores.

Lista de abreviações

A	Adenina
C	Citosina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
G	Guanina
kD	Kilodalton
mm	Milímetros
OR	<i>Odds ratio</i>
pb	Pares de base
PGE2	Prostaglandina E2
PGs	Prostaglandinas
RNA	Ácido ribonucléico
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
T	Timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimerase

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1 - Resumo dos dados clínicos dos pacientes com LPB e do grupo controle Incluídos no estudo.	33
Tabela 2 - Seqüência de primers, enzimas de restrição e referências usadas para cada polimorfismo.	33
Tabela 3 - Distribuição dos genótipos e da frequência alélica em pacientes com LPB e do grupo controle utilizando o teste Qui-quadrado de tendência.	34
Tabela 4 - Associação entre diferentes genótipos polimórficos e o risco para LPB usando análise de regressão logística.	35

Sumário

	Página
1. Introdução	09
1.1 Líquen plano bucal	10
1.2 Citocinas	13
1.3 Polimorfismos genéticos e citocinas	16
1.3.1 Interleucina - 1 β	19
1.3.2 Interleucina – 6	21
1.3.3 Interleucina – 10	25
1.3.4 Fator de necrose tumoral - α	26
2. Objetivos	29
3. Artigo - Polimorfismo de citocinas e líquen plano bucal	31
4. Considerações finais	38
5. Conclusões	43
6. Referências bibliográficas	45
7. Anexos	65
Anexo A - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% - gene <i>IL-1B</i>	66
Anexo B - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% - gene <i>IL-6</i>	67
Anexo C - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% - gene <i>IL-10</i>	68
Anexo D - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% - gene <i>TNFA</i>	69
Anexo E - Apresentações clínicas do LPB	70
Anexo F - Aspecto histológico do LPB	71

Resumo

O líquen plano (LP) é uma doença mucocutânea crônica, geralmente assintomática. A maioria dos pacientes com LP são adultos de meia idade, sendo as crianças raramente afetadas. Embora a etiologia e os mecanismos relacionados à patogênese do LP não tenham sido completamente elucidados, estudos clínicos e imunohistoquímicos apontam para uma desregulação imune, envolvendo principalmente o componente celular do sistema imune e uma complexa rede de citocinas. Levando-se em consideração que as citocinas produzidas pelas células epiteliais e pelos linfócitos poderiam modular o curso clínico das lesões, assim como influenciar a susceptibilidade à doença, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de polimorfismos funcionais de citocinas importantes em processos inflamatórios crônicos, em pacientes com líquen plano bucal. Neste estudo foi extraído o DNA de 53 pacientes com líquen plano bucal (LPB) e de 53 pacientes saudáveis, que formaram o grupo controle. Inicialmente, o material genético foi amplificado pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*). A análise dos genótipos foi possível após a reação de digestão com enzimas específicas para cada gene. Os produtos da digestão foram visualizados através da eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% e coloração pelo Brometo de Etídio. Os resultados revelaram associação entre os genótipos homozigotos dos genes da IL-6 e TNF- α e o risco para desenvolvimento do LPB (OR 6.89 e 13.04, respectivamente). Nenhuma relação foi estabelecida entre pacientes com LPB e os polimorfismos genéticos dos genes da IL-1 β e IL-10. Os achados demonstram que fatores genéticos associados à produção de citocinas estão envolvidos no desenvolvimento do LPB.

1. Introdução

1. Introdução

1.1 - Líquen Plano

O líquen plano (LP) é uma doença mucocutânea crônica, primeiramente descrita por Wilson em 1869. É uma condição relativamente comum, que afeta a pele e a mucosa bucal, atingindo entre 0,5 e 1% da população mundial (BOUQUOT & GORLIN, 1986). Aproximadamente 50% dos pacientes com lesões na pele apresentam lesões bucais (ANDREASEN, 1968).

O líquen plano bucal (LPB) acomete mais freqüentemente as mulheres do que os homens (SCULLY & EL-KOM, 1985). Essa alteração é rara em crianças, afetando em sua maioria, pacientes entre 40 e 70 anos de idade (KÖVESI & BANOCZY, 1973; SILVERMAN & GRIFFITH, 1974). O LPB ocorre mais comumente na mucosa jugal, língua e gengiva, sendo raras as lesões no palato (JUNGELL, 1991; ZEGARELLI, 1993).

Na boca o LP pode ser dividido em seis tipos (anexo E): reticular, erosivo, papular, em placa, atrófico e bolhoso (destacando-se as duas primeiras). A forma reticular normalmente não causa sintomas e envolve a mucosa jugal posterior bilateralmente. Outras superfícies da mucosa oral podem estar envolvidas ao mesmo tempo, como o dorso e a porção lateral da língua, a gengiva e o palato. O LP reticular é assim chamado em função do seu padrão característico de linhas brancas entrelaçadas (também denominadas de estrias de Wickham). Estas lesões são tipicamente não-estáticas, aumentando e diminuindo por semanas ou

meses. O padrão reticular pode não ser evidente em alguns locais, como o dorso da língua, onde as lesões se apresentam mais como placas ceratóticas com a atrofia das papilas. O LP erosivo, embora não seja tão comum quanto a forma reticular, é mais significativo para o paciente, porque as lesões normalmente são sintomáticas. Clinicamente existem áreas atróficas e eritematosas, com ulceração central em vários graus. A periferia das regiões atróficas é normalmente cercada por finas estrias radiantes. Se o componente erosivo for grave, poderá ocorrer separação epitelial que resulta em uma apresentação relativamente rara de LP bolhoso; representado por vesículas ou bolhas que variam de poucos milímetros a vários centímetros de diâmetro, que tendem a se romper facilmente dando origem a úlceras. O tipo papular caracteriza-se por pequenas pápulas puntiformes com aproximadamente 0,5 mm de tamanho. O LP do tipo placa lembra clinicamente as leucoplasias, apresentando-se como placas brancas homogêneas que ocorrem freqüentemente no dorso da língua e mucosa jugal. O tipo atrófico caracteriza-se por uma lesão eritematosa difusa, podendo apresentar estrias em torno da mesma e ocorrendo mais freqüentemente na gengiva (ANDREASEN, 1968; MALLAOGU, 2000).

É viável ressaltar que alguns autores adotam uma classificação clínica mais simplificada. Sendo os tipos placa e papular agrupados juntamente com o reticular e o tipo bolhoso juntamente com o erosivo. Assim, apenas três formas clínicas seriam consideradas: reticular, erosivo e atrófico (SILVERMAN *et al.*, 1985 CHAINANI-WU *et al.*, 2001).

As características histológicas (anexo F) do LPB são típicas, porém não específicas. Graus variáveis de ortoceratose e paraceratose podem estar presentes na superfície do epitélio. A degeneração ou liquefação da camada basal do epitélio, papilas epiteliais serrilhadas, infiltrado linfocitário e macrofágico em banda subepitelial são características marcantes (SCULLY & EL-KOM, 1985; WALSH *et al.*, 1990b; GREER *et al.*, 1999; LODI *et al.*, 2005).

Embora a etiologia e os mecanismos relacionados à patogênese do LP não terem sido completamente elucidados, estudos clínicos e imunohistoquímicos (REGEZI *et al.*, 1978; WALSH *et al.*, 1990a; PORTER *et al.*, 1997) apontam para uma desregulação imune, envolvendo principalmente a porção celular do sistema imune e uma complexa rede de citocinas (SUGERMAN *et al.*, 2002; SANTORO *et al.*, 2003). Técnicas de biologia molecular indicam que o infiltrado linfocitário compreende, principalmente, células T CD3⁺, incluindo Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, embora a proporção exata desses dois grupos celulares seja variável de acordo com a fase da doença (WALSH *et al.*, 1990a) Os linfócitos CD4⁺ estariam presentes numa fase inicial e os CD8⁺ seriam recrutados numa fase mais tardia. No epitélio, a maioria dos linfócitos é CD8⁺, sendo que a maior proporção dessas células se encontra na camada superficial da lâmina própria (JUNGELL, 1990).

Ambos os tipos celulares de linfócitos T, CD4⁺ e CD8⁺, produzem e respondem a uma série de mediadores inflamatórios e citocinas, que se relacionam com a retenção de linfócitos, morte de queratinócitos basais, e até mesmo com a expressão das diferentes formas clínicas do LPB (WALSH *et al.*, 1990a, WALSH *et al.*, 1990b).

Estudos na literatura indicam que a expressão simultânea de RNAm de citocinas pró e anti-inflamatórias ocorre tanto no LPB, quanto em cultura de células T provenientes da lesão. Estes achados refletem um complexo ambiente intralesional de citocinas que interagem entre si (SIMARK-MATTSSON, 1998; SIMARK-MATTSSON, 1999).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram, ainda, que variantes alélicas dos genes de citocinas estão relacionadas com uma maior ou menor produção das mesmas (WILSON *et al.*, 1992; TAGORE *et al.*, 1999). Além disso, alguns autores acreditam que esta variação genética pode até mesmo contribuir para susceptibilidade à doença e influenciar seu curso clínico (YANG *et al.*, 1996; EIJNDEN *et al.*, 2003; CARROZZO *et al.*, 2004). Estudos prévios envolvendo LP (CARROZZO *et al.*, 2004; KRASOWSKA *et al.*, 2005) e diferentes condições inflamatórias e mediadas pelo sistema imune como doença periodontal (MOREIRA *et al.*, 2005), estomatite aftosa recorrente (GUIMARÃES *et al.*, 2007), doença do enxerto contra o hospedeiro (TAKAHASH *et al.*, 2000) e lúpus eritematoso (SCHOTTE *et al.*, 2001) demonstraram uma associação entre a expressão de variantes genéticas de citocinas e a doença.

1.2 Citocinas

Citocinas são proteínas (geralmente glicoproteínas), de peso molecular relativamente baixo (8 a 25kD) e, freqüentemente, consistem de uma única cadeia polipeptídica. Sabe-se que as citocinas orquestram a complexa rede de interações celulares que regulam a imunidade humoral, a celular e a resposta de

fase aguda. Uma pequena concentração das mesmas é suficiente para mediar os passos chaves da resposta imune. Entre eles podemos ressaltar a apresentação de antígenos e a ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos T, B e células da linhagem monocítica. Além disso, as citocinas regulam processos biológicos importantes como reparo tecidual, fibrose, morfogênese e inflamação (MAES *et al.*, 1998).

A nomenclatura das citocinas já esteve baseada nos tipos celulares que as produziam; portanto, monocinas, linfocinas e interleucinas eram termos utilizados para identificarmos produtos de macrófagos, linfócitos e leucócitos, respectivamente. Algumas citocinas são fatores quimiotáticos para certos tipos celulares [por exemplo: interleucina-8; (IL-8)] e são denominadas quimiocinas; já outras receberam funções biológicas, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), o fator de crescimento transformante (TGF) e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF).

Com o advento das técnicas moleculares, tornou-se claro que a mesma proteína pode ser sintetizada por linfócitos, monócitos e por uma variedade de tipos celulares, incluindo células endoteliais e algumas células epiteliais. Por isso, o termo genérico citocinas tem sido preferido para designar essa classe de mediadores (OLLIER, 2004).

Algumas citocinas promovem inflamação e são chamadas de pró-inflamatórias, ao passo que outras, por suprirem tal atividade, são chamadas de anti-inflamatórias. Interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13) são potentes ativadoras de LB; entretanto, elas também são

importantes agentes anti-inflamatórios por possuírem a habilidade de suprimirem genes das citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), TNF, interferon- γ (IFN- γ) e quimiocinas (DINARELLO, 1989).

A secreção de citocinas é um evento breve e autolimitado, não existindo como moléculas pré-formadas, e sim necessitando de ativação transcricional. Uma vez sintetizadas, elas são rapidamente secretadas. As ações das citocinas são, muitas vezes, pleiotrópicas, redundantes, sinérgicas e antagônicas e se realizam através de ligações de alta afinidade a receptores específicos, localizados nas membranas das células-alvo (OLLIER, 2004).

O pleiotropismo refere-se à habilidade de uma citocina em atuar sobre diferentes tipos celulares. Essa propriedade permite que tal citocina medie diversos efeitos biológicos; entretanto, limita o seu uso terapêutico. Redundância, por sua vez, significa que múltiplas citocinas exercem os mesmos efeitos funcionais. Entretanto, antagonistas contra uma única citocina podem não apresentar conseqüências funcionais em outras citocinas de função equivalente. Sinergismo explica que uma ou mais citocinas podem desempenhar efeitos aditivos umas sobre as outras. Antagonismo implica em duas ou mais citocinas inibirem o efeito uma da outra (OLLIER, 2004).

Diferentes citocinas utilizam vias de sinalização especializadas, tal como a via *Janus Kinases (JAKs)/Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs)*. A porção citoplasmática de muitos receptores de citocinas está associada aos membros dos receptores de tirosina-quinase da família das JAKs.

Após a ligação, os JAKs tornam-se ativados por fosforilação. Uma vez ativados, eles fosforilam resíduos específicos de tirosina nos receptores de citocinas. Esses resíduos servem como porta para a entrada dos fatores de transcrição conhecidos como STATs. Proteínas STATs específicas e, até então, inativas são recrutadas aos receptores das citocinas e, então, fosforiladas. Ao mesmo tempo que são liberadas do receptor, as STATs dimerizam-se e são translocadas para o núcleo. Nesse local, dímeros de STATs se ligam a seqüências específicas próximas aos promotores dos genes induzidos por citocinas, resultando na indução de sua produção (WATANABE & ARAI, 1996).

Citocinas possuem efeitos locais e sistêmicos, apresentando padrões de secreção autócrinos (efeitos sobre a célula de origem), parácrinos (efeitos sobre as células do microambiente) e endócrinos (efeitos sobre células distantes) (OLLIER, 2004).

Duff (1998) mostrou que muitos genes de citocinas abrigam polimorfismos genéticos e que essas variações podem influenciar seus níveis de síntese e secreção explicando, portanto, as diferenças inter-individuais estáveis existentes nos seres humanos frente a um estímulo padrão.

1.3 Polimorfismos genéticos e citocinas

Uma complexa rede de citocinas interage de forma dinâmica para regular a resposta imune e outras vias biológicas do organismo. Desta forma, não é

surpreendente que uma variação no nível de citocinas tenha sido relacionada com o processo e a susceptibilidade à doença. Uma questão fundamental é se esta variação do "pool" de citocinas pode ser considerada a causa primária da doença ou reflete uma mudança inflamatória secundária. Isto pode ser desvendado pela investigação de polimorfismos dos genes de citocinas com o intuito de determinar se a base genética das citocinas está associada à doença (OLLIER, 2004).

Existem duas categorias de variação descontínua com base em simples diferenças alélicas. Em uma população natural, a existência de duas ou mais variantes descontínuas comuns é chamada de polimorfismo. Variantes excepcionais e raras são chamadas mutantes. Assim, o polimorfismo tem sido conceituado como alterações na carga genética dos indivíduos, nos quais estes exibem variações dentro de um padrão ainda considerado biologicamente normal (KORNMAN *et al.*, 1997).

Estas variações na seqüência do DNA podem ou não causar alterações na função do produto protéico (WORMHOUDT *et al.*, 1999; MILLER *et al.*, 2001). Aqueles que têm efeitos significativamente funcionais sobre o produto gênico são os tipos mais úteis nos estudos associados a doenças, ao passo que outros, localizados fora dos limites do gene, funcionam simplesmente como marcadores úteis para estudos genéticos.

Um polimorfismo na região promotora poderá alterar a proporção da transcrição. Um polimorfismo localizado nos limites intron/exon pode produzir proteínas incompletas ou inativas como resultado de um splicing incorreto do ácido ribonucéico mensageiro (RNAm). Polimorfismos caracterizados por

completas deleções gênicas eliminam qualquer atividade funcional da enzima, enquanto polimorfismos que são duplicações do gene inteiro podem resultar em elevados níveis de atividade (MILLER *et al.*, 2001).

As técnicas mais usadas para se detectar a ocorrência de polimorfismos genéticos envolvem os polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs), descritos primeiramente por Botstein *et al.* (1980), e os polimorfismos de número variável de repetições em tandem (VNTRs).

Os RFLPs são polimorfismos de ponto que criam ou destroem sítios de restrição enzima-específicos. Como as enzimas de restrição têm seqüências de reconhecimento específicas no DNA, as alterações da seqüência do DNA genômico acarretam na criação ou destruição de sítios de clivagem alterando, desse modo, o tamanho de um ou mais fragmentos de DNA oriundos da ação da enzima de restrição (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

Os VNTRs são polimorfismos por inserção/deleção que consistem numa série de comprimentos de fragmentos alélicos, relacionados entre si por um número variável de seqüências de DNA repetidas em tandem no intervalo entre dois sítios de restrição (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

Os VNTRs e os RFLPs são detectados de forma similar, através da amplificação da região de interesse pela técnica da PCR e posterior tratamento com enzimas de restrição que reconhecem sítios específicos e originam fragmentos de DNA com comprimentos variados. Enquanto os RFLPs revelam polimorfismos devido à presença ou ausência de um sítio de restrição, os VNTRs

revelam polimorfismos devido a números diferentes de repetições situadas entre dois sítios de restrição (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

Polimorfismos funcionais em genes de citocinas e outros mediadores inflamatórios, que podem confirmar diferenças interindividuais na síntese e secreção dessas proteínas, têm sido associados a doenças que apresentam uma patogênese inflamatória (PARKHILL *et al.*, 2000; CARROZZO *et al.*, 2004; KRASOWSKA *et al.*, 2005). Portanto, a investigação e a caracterização dos elementos específicos alterados podem proporcionar biomarcadores aplicáveis em diagnóstico e prognóstico, estimando o risco em indivíduos (KORNMAN *et al.*, 1997).

1.3.1 – Interleucina-1 β

A IL-1 β madura é uma molécula de 17,5kD. A sua atividade biológica está no efeito sinérgico de duas proteínas pró-inflamatórias agonistas IL-1 α e IL-1 β , codificadas pelos respectivos genes *IL-1A* e *IL-1B* que se encontram arranjados em *cluster*, juntamente com o gene *IL-1RN*, no braço longo do cromossomo 2 humano em uma região de 430 kilobases (Kb) (NICKLIN *et al.*, 1994; DI GIOVINE *et al.*, 2000).

As fontes primárias de IL-1 β são os monócitos, macrófagos e células dendríticas. Linfócitos B, células *natural killer* (NK) e queratinócitos também produzem essa citocina (DINARELLO, 1989). A IL-1 β está envolvida na ativação de células endoteliais e conseqüente aumento da expressão de *intercellular*

adhesion molecule-1 (ICAM-1) e selectina-E, proporcionando a migração e recrutamento celulares (FIGUEREDO *et al.*, 1999). Além disso, a IL-1 β apresenta também as funções de ativadora de membros da família *mitogen-activated protein* (MAP) kinases, de potente indutora de prostaglandina E2 (PGE2) e de MMPs, assim como da reabsorção óssea osteoclástica (DINARELLO, 1989; LANG *et al.*, 2000; WALKER *et al.*, 2000; TAYLOR *et al.*, 2002). Outros estudos ainda sugerem que essa citocina pode estimular a liberação de outros mediadores pró-inflamatórios, como a IL-8 e TNF- α (FIGUEREDO *et al.*, 1999). Níveis aumentados de IL-1 β têm sido detectados no fluido crevicular gengival de pacientes com doença periodontal (FIGUEREDO *et al.*, 1999) e tem sido estabelecida uma associação entre a gravidade da doença e a produção aumentada de IL-1 β (KORNMAN *et al.*, 1997). Os efeitos descritos da IL-1 β aumentam a resposta inflamatória e podem causar a degeneração do ligamento periodontal e osso alveolar na doença periodontal (FIGUEREDO *et al.*, 1999).

Recentemente, polimorfismos dentro dos genes desse *cluster* foram descritos e algumas dessas variações genéticas têm sido associadas a diferenças nos níveis produzidos de IL-1 β e IL-1 α (MOLVIG *et al.*, 1988; ENDRES *et al.*, 1989), levando alguns indivíduos a apresentarem uma resposta inflamatória mais exacerbada que outros, frente ao mesmo estímulo. Polimorfismos funcionais no *locus* -511 e +3954 do gene da IL-1 β já foram descritos (DI GIOVINE *et al.*, 2000). O polimorfismo funcional mais estudado é o *single nucleotide polymorphism* (SNP) que resulta na troca de uma citosina por

uma timina na posição +3954, no exon 5 do gene, e destrói um sítio de restrição para a enzima de restrição *Thermus aquaticus* YTI (*Taq I*) (POCIOT *et al.*, 1992). Nesse tipo de polimorfismo, células de indivíduos homocigotos para o alelo 2 (T) produzem quatro vezes mais IL-1 β e células heterocigotas duas vezes mais do que células de indivíduos homocigotos para o alelo 1 (C) (POCIOT *et al.*, 1992).

A resposta inflamatória que é direcionada em grande parte pela IL-1 é, portanto, geneticamente determinada, com alguns indivíduos tendo uma resposta mais exacerbada do que outros quando submetidos a um mesmo estímulo (LANG *et al.*, 2000). Nos diversos estudos avaliando a presença do alelo polimórfico, o mesmo tem sido relacionado com inúmeras entidades patológicas, tais como artrite reumatóide, psoríase, doença periodontal, fibrose pulmonar, estomatite aftosa recorrente e lúpus eritematoso (KORNAMAM *et al.*, 1997; COX *et al.*, 1999; WHYTE *et al.*, 2000; GUIMARÃES *et al.*, 2007).

1.3.2 – Interleucina-6

A IL-6 é uma glicoproteína com peso molecular variando de 20 a 30 kD, dependendo do tipo celular de origem (SEHGAL *et al.*, 1987). É uma citocina pleiotrópica que funciona em ambas as imunidades inata e adaptativa (VAN DER POLL & VAN DE VENTER, 1998).

Essa citocina não é espontaneamente produzida por células normais intactas (KUPPER, 1990), sendo que sua síntese e liberação requerem estímulo inflamatório seguido, por exemplo, de ativação celular por LPS bacteriano ou por

citocinas de reabsorção óssea, tais como IL-1 β e TNF- α (KISHIMOTO, 1989; LITTLEWOOD *et al.*, 1991).

A IL-6 é produzida por muitos tipos celulares, tais como células T e B, células NK, monócitos e macrófagos, adipócitos, mastócitos, células endoteliais, células da medula óssea, células endometriais, leiomiócitos, queratinócitos, células mesangiais, condrócitos, osteoblastos, astrócitos, células da micróglia e células da pituitária (BAUER & HERMANN, 1991).

Segundo Crowl *et al.* (1991), a IL-6 possui várias ações na imunidade inata, onde estimula a síntese de proteínas de fase aguda por hepatócitos, contribuindo para os efeitos sistêmicos da inflamação: Resposta de Fase Aguda. Além disso, ela inibe a produção de TNF- α e IL-1 por células sanguíneas mononucleares, através da indução de seus receptores antagonistas (SCHINDLER *et al.*, 1990; TILG *et al.*, 1994).

Na imunidade adaptativa, essa citocina induz ativação, proliferação e diferenciação de LT, com produção de linfócitos T citotóxicos (LTc) e estimula o crescimento de LB que se diferenciam em plasmócitos, células produtoras de anticorpos (SCHINDLER *et al.*, 1990).

A IL-6 é produzida localmente no osso, após estimulada por IL-1 e TNF (LOWIK *et al.*, 1989) e promove reabsorção óssea tanto sozinha quanto em sinergismo com esses fatores de reabsorção (ISHIMI *et al.*, 1990; FEYEN *et al.*, 1989). Ela estimula a formação de osteoclastos a partir de GM-CSF (KURIHARA *et al.*, 1990) e aumenta o seu número tanto *in vivo*, levando a doenças

sistêmicas (JORDAN *et al.*, 1995), quanto *in vitro* (KURIHARA *et al.*, 1990). A IL-6 tem-se mostrado potente indutora de fosfolipase A2, intermediária na via final da produção de leucotrienos, PGs, e fator ativador de plaquetas (CROWL *et al.*, 1991). Entretanto, dados na literatura vêm também sugerindo um papel anti-inflamatório para a IL-6 (SCHINDLER *et al.*, 1990; BALTO *et al.*, 2001). Ela não estimula diretamente a produção de colagenase ou estromielisina, embora potencialize a produção de PGE2 e colagenase, por condrócitos estimulados por IL-1 e TNF (VAN DE LOO *et al.*, 1997).

Podemos também ressaltar que a IL-6 é deficiente em induzir expressão de moléculas de adesão sobre células endoteliais e suprime o exsudato agudo de neutrófilos (FATTORI *et al.*, 1994). Ela induz produção do receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) *in vivo* e *in vitro* (TILG *et al.*, 1994). Existem evidências de que proteínas de fase aguda, reguladas por IL-6, também possuem propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras e atuam como antiproteinases e captadoras de oxigênio (TILG *et al.*, 1997). Tanto IL-1 quanto TNF- α , mas não IL-6, têm sido encontradas como estimuladoras de níveis constantes de RNAm osteoprotegerina, fator crítico para indução de osteoclastogênese por várias linhagens osteoblásticas humanas (SANKATA *et al.*, 1999).

A IL-6 possui outras múltiplas atividades biológicas, consistentes com suas atividades pleiotrópicas: indução da proliferação de leiomiócitos dos vasos sanguíneos, promoção do crescimento das células mesangiais, efeito anti-viral, efeito ionotrópico negativo sobre as células do músculo cardíaco, estímulo da

megacariopoiese, febre, secreção de fator de crescimento para astrócitos, promoção do crescimento de queratinócitos e indução da secreção de corticotropina pelas células da glândula pituitária (VAN DER POLL & VAN DE VENTER, 1998).

O gene da *IL-6* humana se localiza no cromossomo 7 e polimorfismos em sua região promotora podem resultar em variações interindividuais no que diz respeito à sua transcrição e expressão. Dentre esses polimorfismos, encontramos os SNPs -597 (G/A), -572 (G/C) e -174 (G/C) e o polimorfismo da região microssatélite -373 AnTn.

A transcrição dessa citocina é regulada pelos fatores de transcrição fator nuclear IL-6 (NFIL-6), NFκB, Fos/Jun, CRBP e receptor de glicocorticóide (TERRY *et al.*, 2000). Já foi demonstrado que o polimorfismo -174 (G/C) parece reduzir a transcrição de *IL-6* pelo fato de se localizar próximo ao sítio de ligação do receptor para glicocorticóide, um domínio de regulação negativa do promotor capaz de suprimir a transcrição do gene da *IL-6* (RAY *et al.*, 1990).

A presença do alelo guanina (G) pode estar associada à artrite crônica juvenil precoce sistêmica (FISHMAN *et al.*, 1998), artrite reumatóide (HIRANO *et al.*, 1988) e psoríase (GROSSMAN *et al.*, 1989). O alelo C mostra associação com riscos reduzidos para a doença de Alzheimer (PAPASSOTIROPOULOS *et al.*, 1999).

1.3.3 – Interleucina-10

IL-10 é uma citocina com peso molecular estimado em 18,647 kD que se encontra profundamente envolvida na regulação das reações inflamatórias e respostas imunes. É uma molécula-chave no que diz respeito à diminuição do potencial patológico dos processos auto-imunes, através da inibição de muitos eventos da resposta inflamatória (MOORE *et al.*, 1993).

Ela apresenta efeitos inibitórios sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e α , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α) por monócitos e neutrófilos e IFN- γ por LT, e regula negativamente a expressão de moléculas ativadoras e coestimulatórias sobre monócitos e células dendríticas (MOORE *et al.*, 1993). A IL-10 também bloqueia a ação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e β por aumentar a liberação de IL-1ra solúvel (MARIE *et al.*, 1996). A IL-10 possui atividades de fator de crescimento sobre LB e mastócitos, e inibe ou aumenta as atividades de LT, dependendo das condições de ativação e das subclasses, se CD4 ou CD8 (MOORE *et al.*, 1993).

IL-10 é produzida por LTs de memória e *naïve*, clones pertencentes aos sub-tipos T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2), células NK, LB, linhagens de células B transformadas pelo vírus *Epstein-Barr*, linfoma de Burkitt, monócitos, trofoblastos, células epiteliais bronquiais, e certas células tumorais incluindo melanomas e carcinomas de várias origens (MOORE *et al.*, 1993).

O gene da *IL-10* humana está localizado no cromossomo 1q e consiste de cinco exons separados por quatro introns. Vários polimorfismos têm sido

observados nesse gene, na região flanqueadora 5'. Eles incluem duas áreas 6-11 (CA)_n em regiões microssatélites, nas posições -1109 e -3942, assim como três SNP, nas posições -1082 (G/A), -819 (C/T) e -592 (C/A) (ESKDALE *et al.*, 1997; HURME *et al.*, 1998). Tais polimorfismos têm sido relacionados à produção aumentada de IL-10 por monócitos e células T e também por pacientes portadores ou sujeitos a desenvolverem lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, doença meningocócica (ESKDALE *et al.*, 1997; WESTENDORP *et al.*, 1997; MEHRAN *et al.*, 1998; CRAWLEY *et al.*, 1999) e pode ser um fator prognóstico para rejeição seguida de transplante renal (SANKARAN *et al.*, 1999).

1.3.4 – Fator de necrose tumoral- α

TNF- α é uma citocina de 17kD e é o principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias gram-negativas e outros microrganismos. Ela é responsável por muitas das complicações sistêmicas de várias infecções, tais como septicemia, choque séptico e falência múltipla dos órgãos. Essas reações do hospedeiro estão associadas a níveis séricos aumentados dessa citocina (BALKWILL, 2002).

A principal função fisiológica e local do TNF é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos aos sítios de infecção e ativar essas células a erradicar microrganismos. Essa citocina também induz a expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais, estimula a secreção de quimiocinas por células endoteliais e macrófagos e produção de IL-1 por

fagócitos mononucleares. Seus efeitos sistêmicos, em quantidades moderadas, incluem indução de febre (pirógeno endógeno), síntese de proteínas plasmáticas pelos hepatócitos (resposta de fase aguda) e caquexia. Já a produção dessa citocina em grandes quantidades pode resultar em insuficiência cardíaca, trombose intravascular e choque séptico (BALKWILL, 2002).

Os tipos celulares que a produzem incluem, além de monócitos e macrófagos, LT, LB, astrócitos, fibroblastos, basófilos, mastócitos, células NK, células de kupfer, leiomiócitos, células epidérmicas e alguns tipos de células tumorais (BALKWILL, 2002).

O gene *TNFA* está localizado na região de classe III do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), no braço curto do cromossomo 6. Nove polimorfismos já foram descritos dentro da região promotora do *TNFA*, nas posições -1301, -863, -857, -575, -376, -308, -244 e -238, em relação ao sítio de transcrição (BAYLEY *et al.*, 2001).

O polimorfismo na posição -308 (G/A) foi associado à produção alterada de TNF- α , estando o alelo 2 (A) associado de seis a sete vezes à maior atividade transcricional no gene do que a variante (G) (WILSON *et al.*, 1997). Skoog *et al.* (1999) também demonstraram um outro polimorfismo funcional na posição -863 (C/A), associado a níveis reduzidos de TNF- α circulante.

O alelo alto produtor (A) do gene *TNFA* tem sido relacionado a uma série de doenças; entre elas o LPB (CARROZZO *et al.*, 2004), asma (AOKI *et al.*,

2006), lúpus eritematoso sistêmico (ROOD *et al.*, 2000) e esquizofrenia (SACCHETTI *et al.*, 2007).

2. Objetivo

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi investigar uma possível associação entre os polimorfismos genéticos funcionais dos genes da *IL-1B* +3954 (C/T), *IL-6* -174 (G/C), *IL-10* -1082 (G/A) e do *TNFA* -308 (G/A) com o líquen plano bucal em uma amostra de pacientes brasileiros.

**3. ARTIGO - POLIMORFISMO DE
CITOCINAS E LÍQUEN PLANO BUCAL**

Investigation of functional gene polymorphisms interleukin-1b, interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor in individuals with oral lichen planus

Guilherme Machado Xavier, Alessandra Rosa de Sá, André Luiz Sena Guimarães, Tarcília Aparecida da Silva, Ricardo Santiago Gomez

Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Oral lichen planus (OLP) is a chronic inflammatory oral mucosal disease. There are some studies in the literature demonstrating association between cytokines genes polymorphisms and susceptibility to develop some immune-mediate conditions. The purpose of this study was to investigate cytokine gene polymorphisms in a sample of Brazilian patients with OLP. Fifty-three patients with OLP (mean age = 43.1 years; range 20–68 years) and 53 healthy volunteers (mean age = 42.9 years; range 21–67) were genotyped for IL-1b +3954 (C/T), IL-6 -174 (G/C), IL-10 -1082 (G/A) and TNFA -308 (G/A) gene polymorphisms. Statistical analysis was based on the use of logistic regression (P-values below 0.05 were considered as significant). IL-6 and TNFA homozygous genotypes were significantly more often detected in OLP patients. These genotypes were associated with an increased risk of OLP development (OR 6.89 and 13.04, respectively). IL-1 β and IL-10 gene polymorphisms were not related to OLP development. Our findings clearly demonstrate an association between inheritance of IL-6 and TNFA gene polymorphisms and OLP occurrence, thus giving additional support for genetic basis of this disease.

J Oral Pathol Med (2007)

Keywords: oral lichen planus; gene polymorphism; genetic; cytokines

Introduction

Lichen planus (LP) is a chronic inflammatory mucocutaneous condition of unknown aetiology. Clinical and immunohistochemical studies (1–3) strongly support a role for immune deregulation in the pathogenesis of oral

lichen planus (OLP), specifically involving the cellular arm of the immune system and a complex cytokine network (4, 5). Data from the literature have indicated the importance of NF κ B-dependent cytokines, IL-1 β , IL-6 and TNF- α , in the exacerbation and perpetuation of OLP (4, 5). Some authors also believe that IL-10 can inhibit NF κ B activation and that this leads to its anti-inflammatory effects (6–8). Data from the published literature indicate that simultaneous expression of mRNAs for both pro- and anti-inflammatory cytokines occur in OLP and in cultured T-cell lines from the lesion reflecting a complex intralesional environment of counteracting cytokines (9, 10).

Studies *in vitro* and *in vivo* demonstrated that allelic variants of cytokine genes were related to either higher or lower production of cytokines (11, 12) and some authors believe that this genetic variation can even contribute to disease's susceptibility and may influence its course (13, 14). Previous studies regarding OLP (13, 15) and different inflammatory and immune-mediated conditions, such as periodontal disease (16), recurrent aphthous stomatitis (17), graft-versus-host disease (18) and systemic lupus erythematosus (19) showed an association between genetic variations in expression of cytokines and the disease.

Considering that immunological alterations are reported in OLP pathogenesis and IL-1b, IL-6, IL-10 and regulation (4–8) together with evidence demonstrating that genetic factors are associated with the disease (13, 14, 20), the purpose of the present study was to investigate a possible association between functional polymorphisms related to these cytokines and OLP in a sample of Brazilian patients.

Methods

Subjects and sample collection

Fifty-three subjects affected by OLP and 53 age and sex-matched control subjects (Table 1) were included in this study. The study protocol was approved by the

Correspondence: Prof. Ricardo Santiago Gomez, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, CEP 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel: +55 31 34992477, Fax: +55 31 34992472, E-mail: rsgomez@ufmg.br
Accepted for publication February 27, 2007

2

Table 1 Summary of the clinical data of oral lichen planus (OLP) and control patients included in the study

Characteristics	Values	
	Control	OLP
Age		
Median age years	42	45
Years range	21–67	20–68
Standard deviation	10.6	10.6
Patient gender		
Male, n (%)	17 (32.1)	17 (32.1)
Female, n (%)	36 (67.9)	36 (67.9)
Clinical OLP		
Reticular n (%)	–	44 (83.1)
Erythematous n (%)	–	2 (3.7)
Erosive n (%)	–	7 (13.2)
Sites committed		
Unique site, n (%)	–	16 (30.2)
Multiple sites, n (%)	–	37 (69.8)
Dermatological manifestations		
Present n (%)	–	6 (11.3)
Absent n (%)	–	47 (88.7)
Symptoms		
Present n (%)	–	7 (13.2)
Absent n (%)	–	46 (86.8)

Institutional Ethics Committee, and informed consent was obtained from the patients. The patients and controls were recruited from the Oral Diagnosis Clinic, at the Universidade Federal de Minas Gerais. Both the experimental and control groups were of the same geographical area and had identical socio-economic status. Ethnicity was not established, respecting the hazards of judging Brazilians by colour, race and geographical origin (21). The diagnosis of OLP was confirmed histologically. No patient was suspected to have drug or restoration related lichenoid reaction, and no patient showed histological signs of dysplasia. All patients were asked to inform about OLPs clinical symptoms, and clinically evaluated for dermatological involvement. Exclusion criteria for both groups included the presence of any other significant local or systemic diseases, excluding dental caries. No individual in either group presented chronic periodontitis. Oral mucosa swabs were removed

once from the subjects' oral mucosa. The swabs were performed using sterile plastic tips, and placed immediately in Eppendorf microtubes containing 500 µl of Krebs buffer. The pellet was then obtained after 5 min of centrifugation at 13 000 g and stored at –20°C until processing.

DNA isolation

DNA extraction was carried out as aforementioned (17). Initially, 450 µl of lyses buffer [6.0 M GuSCN, 65 mM Tris–HCl pH 6.4, 25 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1.5% TritonX-100] and 20 µl silica (SiO₂; Sigma S-5631: USB, Cleveland, OH, USA) were added to the microcentrifuge tube containing the oral mucosa swab pellet. The tube was mixed and incubated for 10 min at 56°C, centrifuged at 3000 g for 1 min and the supernatant discharged. The pellet with the DNA adsorbed in the silica was washed twice with a 450 µl washing buffer (6.0 M GuSCN, 65 mM Tris–HCl), twice with 70% ethanol, once with a 450 µl acetone, and then dried at 56°C for 10 min. Finally, 100 µl of TE buffer (10 mM Tris–HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) was added and incubated at 56°C for 10 min to elute the DNA. After incubation the solution was vortexed and centrifuged at 5000 g for 2 min and approximately 90 µl of supernatant containing DNA was transferred to a new tube. The DNA samples were stored at –20°C until genotyping.

Genotyping

The polymorphisms were assessed by polymerase chain reaction (PCR) amplification and digestion. The sequences of PCR primers are shown in Table 2. The PCR was carried out in a total volume of 50 µl, containing approximately 400 ng of DNA, primers (20 pmol/reaction), and 25 µl of Pre-mix buffer (Phoneutria Biotecnologia, Belo Horizonte, Brazil). According to the manufacturer, the Pre-mix buffer contained 50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl pH 8.4, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, deoxynucleoside triphosphates and 1.25 units of Taq DNA polymerase. The conditions for amplification consisted of 94°C for 3 min followed by 35 cycles of 94 C for 30 s, 54 C for 35 s and 72 C for 30 s.

Table 2 Primer sequence, reference and restriction enzymes used for each polymorphism

Genes	Primers (references)	Restriction enzyme (condition)	Genotypes
IL-1β +3954 (C/T)	5'-CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA-3' 5'-GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG-3' (42)	TaqI ^a (65°C/4 h)	TT –182 + 12 bp CT –182 + 97 + 85 + 12 bp CC –97 + 85 + 12 bp
IL-6 –174 (G/C)	5'-CAGAAGAACTCAGATGACCTG-3' 5'-GTGGGGCTGATTGGAAACC-3' (44)	hsp92II ^a (37°C/8 h)	CC –229 + 122 + 51 + 29 bp GC –229 + 173 + 122 + 51 + 29 bp GG –229 + 173 + 29 bp
IL-10 –1082 (G/A)	5'-CCAAGACAACACTACTAAGGCTCCTTT-3' 5'-GCTTCTTATATGCTAGTCAGGTA-3' (45)	XagI ^b (37°C/4 h)	AA –280 + 97 bp GA –280 + 253 + 97 + 27 bp GG –253 + 97 + 27 bp
TNFA –308 (G/A)	5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3' (37)	NcoI ^a (37°C/12 h)	AA –107 bp GA –107 + 87 + 20 bp GG –87 + 20 bp

^aPromega, Madison, WI, USA; ^bMBI fermentas

The run was terminated by final elongation at 72°C for 5 min. In all steps the lid temperature was 103°C. The products were digested with restriction enzyme according to the manufacturer's protocols (see Table 2). The visualization of the product was performed in a 6.5% polyacrylamide gel electrophoresis staining with ethidium bromide (0.5 µg/ml).

Statistical analysis

As suggested in the literature for case-control studies (22), we performed initially a chi-square test for trend. The significance of differences in the allele frequencies between the two groups was assessed by use of an approximate binomial proportions test as described before (23, 24). To evaluate the risk of OLP according to single nucleotide polymorphisms, logistic regression models were fitted. The associations were expressed by odd ratios (ORs) and adjusted for age and gender, with the corresponding 95% CIs. The genotypes considered as referents were those associated with less cytokine production in accordance with the literature. The P-values < 0.05 were considered significant for both tests. The logistic regression analysis was assessed, using SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), version 14.0, and the univariate analysis were performed using BIOSTAT 3.0 software (Optical Digital Optical Technology, Belém, Brazil).

Results

The distribution of allele frequencies and genotypes of all polymorphisms in patients with OLP and control are shown in Tables 3 and 4. The alleles associated with a higher producer genotype from IL-6 and TNFA polymorphisms were significantly more often detected in OLP subjects (Table 3). A significant increase in the IL-6 and TNFA homozygous genotypes were observed in the group with OLP in the univariate analysis (Table 3). In the multivariate model, adjusted for age and gender, the IL-6 GG genotype (high producer genotype) represented a sixfold increased risk (OR 6.89) when compared to CC+GC genotype (Table 4). The TNFA 'AA' genotype (high producer genotype) was also associated with an increased risk of OLP development (OR 13.04) (Table 4). When we analysed the TNFA genotype combinations, we could also observe a statistically significant increased risk for OLP (Table 4). No association between number of lesions, dermatological manifestation or severity of OLP and polymorphisms was observed (data not shown).

Discussion

The IL-6 gene is mapped to chromosome 7p21-24 and has an upstream promoter containing 303 bp (25). In 1998, a functional polymorphism in the promoter region of the IL-6 gene at position -174 (-174 G>C) was identified (26). Many studies have attempted to connect IL-6 -174 G/C genotype to serum levels. The G>C substitution was found to decrease protein expression by reducing promoter activity (26, 27). An overproduction

Table 3 Distribution of the genotypes and allele frequency in patients with oral lichen planus (OLP) and control subjects

Polymorphism genotype	OLP (n = 53)		Control (n = 53)		P-value
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
IL-1b +3954(C/T)					
CC	31 (58.5)		31 (58.5)		
CT	20 (37.7)		20 (37.7)		
TT	02 (03.8)		02 (03.8)		1.0000 ^a
Allele frequency					
C	82 (77.4)		82 (77.4)		
T	24 (22.6)		24 (22.6)		1.0000 ^b
IL-6 -174 (G/C)					
CC	01 (01.9)		02 (03.8)		
GC	08 (15.1)		29 (54.7)		
GG	44 (83.0)		22 (41.5)		<0.0001 ^a
Allele frequency					
C	10 (09.4)		33 (31.1)		
G	96 (90.6)		73 (68.9)		<0.0001 ^b
IL-10 -1082 (G/A)					
AA	20 (37.7)		27 (51.0)		
AG	26 (49.1)		15 (28.3)		
GG	07 (13.2)		11 (20.7)		0.6913 ^a
Allele frequency					
A	66 (62.3)		69 (65.1)		
G	40 (37.7)		37 (34.9)		0.6683 ^b
TNFA -308 (G/A)					
GG	22 (41.5)		37 (69.8)		
AG	22 (41.5)		15 (28.3)		
AA	09 (17.0)		01 (01.9)		0.0007 ^a
Allele frequency					
A	40 (37.7)		17 (16.0)		
G	66 (62.3)		89 (84.0)		0.0004 ^b

A significance level of P = 0.05 was used

^aAnalysed by chi-square test for trend; ^banalysed by binomial proportions test.

of IL-6 is involved in the pathogenesis of inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, Castleman's disease, juvenile idiopathic arthritis and Crohn's disease (28).

Our results showed that OLP patients had a significantly higher frequency of IL-6 -174 polymorphism(G/G) (high producer genotype). This finding does not confirm published data from Carozzo et al. (13). We might speculate that this disparity might be related to the population heterogeneity. As increased levels of IL-6 are found in the serum and saliva of OLP patients (29, 30), our data support the view that IL-6 may be relevant to OLP pathogenesis. It is well-known that IL-6 is a pro-inflammatory cytokine strongly generated in OLP lesions that has effects on cellular and humoral immunities (29). Its participation on OLP development may include T-cell growth and differentiation, apoptosis of keratinocytes from the basal layer and epithelial proliferation, resulting in hyperplasia (29).

TNF-α is a central mediator of acute inflammation and anti-tumour immunity (31). The gene-encoding TNF-α (TNFA) is located in the major histocompatibility complex class III region of chromosome 6 (32). Previous studies described three polymorphic regions in the human TNF-α promoter at -238 (33), -308 (12) and 488 (34) sites, which leads to the substitution of guanine by adenosine in the uncommon alleles. These alterations

4 Table 4 Association between different polymorphic genotypes and risk to oral lichen planus (OLP) using logistic regression analysis

Polymorphism	OLP (n = 53)	Control (n = 53)	OR ^a	95% CI ^a		P-value
	n (%)	n (%)		Min.	Max.	
IL-1 β +3954 (C/T)			Referent			
CC	31 (58.5)	31 (58.5)	0.94	0.35	2.56	0.909
CT	20 (37.7)	20 (37.7)	1.27	0.13	12.37	0.837
TT	2 (3.8)	2 (3.8)	1.08	0.12	9.92	0.942
CC+CT against TT	51 (96.2) vs. 2 (3.8)	51 (96.2) vs. 2 (3.8)	1.00	0.45	2.28	0.983
CC against CT+TT	31 (58.5) vs. 22 (41.5)	31 (58.5) vs. 22 (41.5)				
IL-6 -174 (G/C)			Referent			
CC	1 (1.9)	2 (3.8)	0.61	0.04	8.51	0.712
GC	8 (15.1)	29 (54.7)	3.99	0.31	50.86	0.286
GG	44 (83.0)	22 (41.5)	6.89	2.67	17.76	0.000
CC+CG against GG	9 (17) vs. 44 (83)	31 (58.5) vs. 22 (41.5)	NA	-	-	-
CC against CT+GG	1 (1.9) vs. 52 (98.1)	2 (3.8) vs. 51 (96.2)				
IL-10 -1082 (G/A)			Referent			
AA	20 (37.7)	27 (51)	2.21	0.79	6.20	0.133
AG	26 (49.1)	15 (28.3)	0.79	0.22	2.84	0.717
GG	7 (13.2)	11 (20.7)	0.56	0.17	1.83	0.335
AA+AG against GG	46 (86.8) vs. 7 (13.2)	42 (79.3) vs. 11 (20.7)	1.73	0.77	3.88	0.186
AA against AG+GG	20 (37.7) vs. 33 (62.3)	27 (51) vs. 26 (49)				
TNFA -308 (G/A)			Referent			
GG	22 (41.5)	37 (69.8)	2.51	0.92	6.85	0.073
GA	22 (41.5)	15 (28.3)	13.04	1.29	131.37	0.029
AA	9 (17)	1 (1.9)	9.41	1.03	85.85	0.047
GG+GA against AA	44 (83) vs. 9 (17)	52 (98.1) vs. 1 (1.9)	3.27	1.45	7.34	0.004
GG against GA+AA	22 (41.5) vs. 31 (58.5)	37 (69.8) vs. 16 (30.2)				

A significance level of P = 0.05 was used.
CI, confidence interval; NA, not applicable.
^aAdjusted for gender and age.

that can regulate gene expression have been associated with inflammatory and malignant conditions (35). Data from literature demonstrate that the allele at -308A is associated with high TNF- α production (36, 37). Our results demonstrated that OLP patients had a significantly higher frequency of TNFA-308 polymorphism (A/A), which is associated with a higher cytokine production (38, 39). Krasowska et al. (15) did not find any correlation between TNFA genotype distribution, allele frequency and LP. On the other hand, our findings are in accordance with Carrozzo et al. (13), who observed that -308A TNF- α allele was more frequent in OLP patients. Significantly, other studies indicated a high level of TNF- α protein in involved oral mucosa (40), in the serum (41) and in the oral fluids of OLP patients (42). Carrozzo et al. (13) also observed that OLP patients with skin involvement presented the -308 TNFA G/A genotype with significantly higher percentage (82%) than patients with exclusive oral lesions (30%), suggesting that the simultaneous presence of cutaneous lesions could be caused by higher TNF- α production. The low number of individuals with dermatological manifestations in our study made this association difficult to be demonstrated. Taken together, all these data support the idea that TNF- α plays a key regulatory role in the initiation and progression of OLP. Our results also confirmed that IL-1 β and IL-10 gene polymorphisms are not related to OLP development (13).

IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α are NF- κ B dependent cytokines which play an important role on OLP

pathogenesis (4, 5). The treatment of OLP with dexamethasone reduces these pro-inflammatory cytokine levels in saliva (43). The effect of this treatment over individuals with distinct cytokines genotypes seems to be an interesting target for further studies.

There is an important limitation to the present study that should be considered. As our investigation was restricted to a genetic analysis, no speculation could be performed about the functional relations between cytokines, such as synergistic effects. In conclusion, our findings clearly demonstrate an association between inheritance of IL-6 and TNFA gene polymorphisms and OLP occurrence, thus giving additional support for genetic basis of this disease.

References

- Regezi JA, Deegan MJ, Hayward JR, Arbour A. Lichen planus: immunologic and morphologic identification of the submucosal infiltrate. *Oral Surg* 1978; 46: 44-52.
- Porter SR, Kirby A, Olsen I, Barrett W. Immunologic aspects of dermal and oral lichen planus. *Oral Surg* 1997; 83: 358-66.
- Walsh LJ, Savage NW, Ishii T, Seymour GJ. Immunopathogenesis of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990; 19: 389-96.
- Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ et al. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 350-65.
- Santoro A, Majorana A, Bardellini E et al. NF-kappaB expression in oral and cutaneous lichen planus. *J Pathol* 2003; 201: 466-72.

6. Schottelius AJG, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin JRA. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of κ B kinase activity and nuclear factor κ B DNA binding. *J Biol Chem* 1999; 274: 31868–74.
7. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor κ B (NF κ B) activation in human monocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 9558–63.
8. Lentsch AB, Shanley TP, Sarma V, Ward PA. In vivo suppression of NF κ B and preservation of I κ B α by interleukin-10 and interleukin-13. *J Clin Invest* 1997; 100: 2443–8.
9. Simark-Mattsson C, Bergenholtz G, Jontell M et al. Distribution of interleukin-2, -4, -10, tumor necrosis factor- α and transforming growth factor- β mRNAs in oral lichen planus. *Arch Oral Biol* 1999; 44: 499–507.
10. Simark-mattsson C, Jontell M, Bergenholtz G, Heyden M, Dahlgren UI. Distribution of interferon- γ mRNA-positive cells in oral lichen planus lesions. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 483–8.
11. Tagore A, Gonsalkorale WM, Pravica V et al. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel diseases. *Tissue Antigens* 1999; 54: 386–90.
12. Wilson AG, Di Giovine FS, Blakemore M, Duff G. Single-base polymorphism in the human tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene detectable by NcoI restriction of the PCR product. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 353.
13. Carozzo M, Capei MU, Darnetto E et al. Tumor necrosis factor- α and interferon- γ polymorphisms contribute to susceptibility to oral lichen planus. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 87–94.
14. Eijnden SV, Carlier F, Van beers D, Dangoisse C, Laet C. Familial lichen planus. *Pediatr Dermatol* 2003; 20: 184–6.
15. Krasowska D, Chodorowska G, Koziol-Montewka M, Ksiazek A, Buraczynska M. The -308 promoter polymorphism in the tumor necrosis factor gene in patients with lichen planus. *Acta Derm Venereol* 2005; 85: 400–3.
16. Moreira PR, Desa AR, Xavier GM et al. A functional interleukin-1 β gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodont Res* 2005; 40: 306–11.
17. Guimaraes ALS, Correa-Silva JMN, Desá AR et al. IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNFA functional gene polymorphisms in individuals with recurrent aphthous stomatitis. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 268–72.
18. Takahashi H, Furukawa T, Hashimoto S et al. Contribution of TNF- α and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allohematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 1317–23.
19. Schotte H, Schluter B, Rust S, Assmann G, Domschke W, Gaubitz M. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2001; 40: 393–400.
20. Bermejo-Fenoll A, Lopez-Jornet P. Familial oral lichen planus: presentation of six families. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 106: e12–5.
21. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 177–82.
22. Zou GY, Donner A. The merits of testing Hardy-Weinberg equilibrium in the analysis of unmatched case-control data: a cautionary note. *Ann Hum Genet* 2006; 70: 923–33.
23. Sasaki T, Tahira T, Suzuki A et al. Precise estimation of allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms by a quantitative SSCP analysis of pooled DNA. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 214–8.
24. Shaw SH, Carrasquillo MM, Kashuk C, Puffenberger EG, Chakravarti A. Allele frequency distributions in pooled DNA samples: applications to mapping complex disease genes. *Genome Res* 1998; 8: 111–23.
25. Bowcock AM, Kidd JR, Lathrop GM et al. The human interferon- β 2/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6'' gene: DNA polymorphism studies and localization to chromosome 7p21. *Genomics* 1988; 3: 8–16.
26. Fishman D, Faulds G, Jeffery R et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1369–76.
27. Belluco C, Olivieri F, Bonafe M et al. -174 G>C polymorphism of interleukin-6 gene promoter affects interleukin-6 serum level in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2173–6.
28. Nishimoto N, Kishimoto T, Yoshizaki K. Anti-interleukin 6 antibody treatment in rheumatic disease. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: i21–7.
29. Gu GM, Martin MD, Darveau RP, Truelove E, Epstein J. Oral and serum IL-6 levels in oral lichen planus patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98: 673–8.
30. Rhodus NL, Cheng B, Myers S, Bowles W, Ho V, Ondrey F. A comparison of the pro-inflammatory, NF- κ B-dependent cytokines: TNF- α , IL-1- α , IL-6, and IL-8 in different oral fluids from oral lichen planus patients. *Clin Immunol* 2005; 114: 278–83.
31. Sugermann PB, Savage NW, Seymour GJ, Walsh LJ. Is there a role for tumor necrosis factor- α (TNF- α) in oral lichen planus? *J Oral Pathol Med* 1996; 25: 219–24.
32. Oh BR, Sasaki M, Perinchery G et al. Frequent genotype changes at -308, and 488 regions of the tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene in patients with prostate cancer. *J Urol* 2000; 163: 1584–7.
33. Pociot F, D'alfonso S, Compasso S, Scorza R, Richiardi PM. Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF alpha gene promoter. *Scand J Immunol* 1995; 42: 501–4.
34. Fanning GC, Bunce M, Black CM, Welsh KI. Polymerase chain reaction haplotyping using 3' mismatches in the forward and reverse primers: application to the biallelic polymorphism of tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha. *Tissue Antigens* 1997; 50: 23–31.
35. Azmy IAF, Balasubramanian SP, Wilson AG et al. Role of tumor necrosis factor gene polymorphisms (-308 and -238) in breast cancer susceptibility and severity. *Breast Cancer Res* 2004; 6: R395–400.
36. Jongeneel CV, Beutler B. Genetic polymorphism in the human TNF region: correlation or causation? *J Inflamm* 1995–1996; 46: 3–6.
37. Brinkman BM, Zuijjeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *J Inflamm* 1995–1996; 46: 32–41.
38. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, Mcdevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3195–9.
39. Louis E, Franchimont D, Piron A et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 401–6.

- 6
40. Fayyazi A, Schweyer S, Soruri A et al. T lymphocyte and altered keratinocyte express interferon-gamma and interleukin 6 in lichen planus. *Arch Dermatol Res* 1999; 291: 485-90.
 41. Karagouni EE, Dotsika EN, Sklavounou A. Alteration in peripheral blood mononuclear cell function and serum cytokines in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 28-35.
 42. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 396-402.
 43. Rhodus NL, Cheng B, Bowles W, Myers S, Miller L, Ondrey F. Proinflammatory cytokine levels in saliva before and after treatment of (erosive) oral lichen planus with dexamethasone. *Oral Dis* 2006; 12: 112-6.
 44. Klein W, Tromm A, Griga T et al. The polymorphism at position -174 of the IL-6 gene is not associated with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 45-7.
 45. Koch W, Kastrati A, Bottiger C et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001; 159: 137-44.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil. Dr RS Gomez is research fellow of CNPq.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

4. Considerações finais

Na literatura há uma série de estudos que relacionam de alguma forma o genótipo do indivíduo a uma determinada doença (PARKHILL *et al.*, 2000; CARROZZO *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2005; KRASOWSKA *et al.*, 2005, GUIMARÃES *et al.*, 2007). O LPB é uma alteração auto-imune cuja etiologia não é estabelecida. Na literatura encontramos relações entre a etiologia do LPB e alterações emocionais (ROJO-MORENO *et al.*, 1998; CHAUDHARY, 2004; IVANOVSKI *et al.*, 2005). Entretanto, não há um consenso sobre esta relação (ALLEN *et al.*, 1986, PERDIGÃO *et al.*, 2007). Estudos recentes procuraram enfocar a influência de fatores genéticos sobre a ocorrência desta doença (EIJNDEN *et al.*, 2003; CARROZZO *et al.*, 2004; KRASOWSKA *et al.*, 2005; BERMEJO-FENOLL & LÓPEZ-JORNET, 2006; PERDIGÃO *et al.*, 2007). Há, em suma, uma tendência em considerar o LPB como uma alteração decorrente de uma desregulação imune, englobando principalmente o componente celular do sistema imune e uma complexa rede de citocinas (SIMARK-MATTSSON, 1998; SIMARK-MATTSSON, 1999; SUGERMAN *et al.*, 2002; SANTORO *et al.*, 2003; SANTORO *et al.*, 2005).

Estudos envolvendo técnicas de biologia molecular possibilitaram a caracterização do infiltrado inflamatório presente no LPB. Os tipos celulares presentes, principalmente linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, produzem e respondem a uma série de mediadores inflamatórios e citocinas. (JUNGELL, 1990; WALSH *et al.*, 1990a; WALSH *et al.*, 1990b; SIMARK-MATTSSON, 1998; SIMARK-MATTSSON, 1999).

Tendo por base que as citocinas são importantes coadjuvantes do mecanismo para o desenvolvimento do LPB, a investigação de polimorfismos funcionais em genes que codificam essas citocinas é muito importante.

Os polimorfismos investigados neste estudo são do tipo SNP, caracterizado pela troca de uma única base nitrogenada. Tendo em vista os polimorfismos estudados, *IL-1B* +3954 (C/T) - anexo A, *IL-6* -174 (G/C) - anexo B, *IL-10* -1082 (G/A) - anexo C e *TNFA* -308 (G/A) - anexo D, essa modificação na estrutura gênica é responsável por uma alteração funcional na transcrição da citocina. Neste trabalho investigamos a associação entre os polimorfismos acima citados e o LPB através da técnica de PCR.

A prática de se testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg com a proposta de se identificar erros de genotipagem não foi adotada neste estudo, pois o que se tem em princípio ao testar este equilíbrio seria a seleção aleatória de amostra, ausência de seleção de acordo com o genótipo e ausência de mutação ou migração, sendo que todas estas situações são condições raras em populações humanas. O mais apropriado seria considerar, *a priori*, que desvios da equação de Hardy-Weinberg existem, devendo-se apenas realizar o teste qui-quadrado ajustado. Ainda segundo Zou & Donner (2006), a realização da equação de Hardy-Weinberg seguida pelo qui-quadrado ajustado pode gerar confusão e resultados falso-positivos.

Inicialmente, através de uma análise estatística univariada, nossos resultados demonstraram que os alelos associados com uma produção aumentada tanto da *IL-6*, quanto do *TNF- α* , foram mais frequentemente

detectados em indivíduos com LPB. Em seguida, a análise multivariada revelou um risco aumentado para os indivíduos que apresentaram os genótipos alto produtores tanto da *IL-6*, quanto do *TNFA* (OR 6,89 e 13.04, respectivamente) em desenvolver LPB. É viável salientar que as análises estatísticas realizadas não revelaram resultados estatisticamente significativos tanto para o gene da *IL-1B*, quanto para o gene da *IL-10*.

Krasowska *et al.* (2005) não observaram nenhuma relação entre a distribuição genotípica, frequência alélica e pacientes com LP quando analisaram o polimorfismo *TNFA* -308 (G/A). Por outro lado, a relação entre este polimorfismo e o LPB já foi previamente estabelecida por Carrozzo *et al.* (2004). Estes autores, entretanto não constataram nenhuma associação entre o polimorfismo *IL-6* -174 (G/C) e o LPB. Além disso, assim como no presente estudo, Carrozzo *et al.* (2004) não relataram resultados estatisticamente significativos envolvendo os polimorfismos *IL-1B* +3954 (C/T) e *IL-10* -1082 (G/A).

É conveniente ressaltar que outros estudos, com metodologias diferentes, confirmaram um alto nível de $TNF-\alpha$ no soro, na saliva e na mucosa de pacientes envolvidos com LPB (KARAGOUNI *et al.*, 1994; PEZELJ-RIBARIC *et al.*, 2004). Em conjunto, todos os dados expostos sobre o $TNF-\alpha$ corroboram com a idéia de que esta citocina desempenha um papel regulatório chave tanto na iniciação quanto na progressão do LPB.

Os resultados envolvendo o polimorfismo *IL-6* -174 (G/C) permitem a especulação de que os achados são coerentes com o quadro de pacientes com LPB. Isto porque trabalhos distintos revelaram altos níveis desta citocina no soro e

na saliva de pacientes com LPB (GU *et al.*, 2004; RHODUS *et al.*, 2005). Gu *et al.* (2004) acreditam ainda que, no LPB, esta citocina é responsável pelo crescimento e diferenciação de células T, apoptose de queratinócitos da camada basal e proliferação epitelial, resultando em hiperplasia.

Uma importante limitação deste trabalho deve ser considerada. Como a investigação realizada restringiu-se à análise genética, nenhuma conclusão pode ser estabelecida sobre as relações funcionais entre as citocinas; como por exemplo os efeitos sinérgicos. Apesar desta limitação, os polimorfismos são candidatos para investigações de susceptibilidade genética e podem se tornar marcadores para a identificação de populações susceptíveis e/ou contribuir para o conhecimento da patogênese dos processos estudados.

5. Conclusões

5. Conclusões

Os polimorfismos *IL-6* -174 (G/C) e *TNFA* -308 (G/A) estão associados com a presença do LPB.

Os polimorfismos *IL-1B* +3954 (C/T) e *IL-10* -1082 (G/A) não se associam com o desenvolvimento do LPB.

6. Referências bibliográficas

6. Referências bibliográficas

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 4º ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000.

Allen CM, Beck FM, Rossie KM, Kaul TJ. Relation of stress and anxiety to oral lichen planus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1986; 61: 44-46.

Andreasen JO. Oral lichen planus: A clinical evaluation of 115 cases. Oral Surg 1968; 25 (1): 31-42.

Aoki T, Hirota T, Tamari M, Ichikawa K, Takeda K, Arinami T, et al. An association between asthma and TNF-308G/A polymorphism: meta-analysis. J Hum Genet 2006; 51(8): 677-85.

Awad MR, Webber S, Boyle G, Sturchioc C, Ahmed M, Martell J, et al. The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome. J Heart Lung Transplant 2001; 20 (6): 625-30.

Azmy IA, Balasubramanian SP, Wilson AG, Stephenson TJ, Cox A, Brown NJ, et al. Role of tumor necrosis factor gene polymorphisms (-308 and -238) in breast cancer susceptibility and severity. Breast Cancer Research 2004; 6: R395-400.

Balkwill, F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? Cytokine & Growth Factor Reviews 2001; 13: 135-41.

Balto K, Sasaki H, Stashenko P. Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. Infect Immun 2001; 69: 744-50.

Bauer J, Herrmann F. Interleukin-6 in clinical medicine. *Ann Hematol* 1991; 62: 203-10.

Bayley JP, De Rooij H, Van Den Elsen PJ, Huizinga TW, Verweij CL. Functional analysis of linker-scan mutants spanning the -376, -308, -244, and -238 polymorphic sites of the TNF-alpha promoter. *Cytokine* 2001; 21 (14): 316-23.

Belluco C, Olivieri F, Bonafe M, Giovagnetti S, Mammano E, Scalerta R, et al. -174 G > C polymorphism of interleukin 6 gene promoter affects interleukin 6 serum level in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2173-6.

Bermejo-Fenoll A, López-Jornet P. Familial oral lichen planus: presentation of six families. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 106: e12-5.

Billiau A. Interferon-gamma in autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7(1): 25-34.

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PM, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 495-503.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis, RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980; 32: 314-31.

Bouquot JE, Gorlin RJ. Leukoplakia, lichen planus, and other keratoses in 23616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo* 1986; 61: 373-81.

Bowcock AM, Kidd JR, Lathrop GM, Daneshvar L, May LT, Ray A, et al. The human "interferon-beta 2/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6" gene: DNA polymorphism studies and localization to chromosome 7p21. *Genomics* 1988; 3: 8-16.

Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *J Inflamm* 1995-1996; 46: 32-41.

Carrozzo M, Uboldi de Capei M, Dametto E, Fasano ME, Arduino P, Broccoletti R, et al. Tumor necrosis factor- α and interferon- γ polymorphisms contribute to susceptibility to oral lichen planus. *The journal of Investigative Dermatology* 2004; 122: 87-94.

Chainani-Wu N, Silverman S, Lozadanur F, Mayer P, Watson JJ. Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *J Am Dent Assoc.* 2001;132(7): 901-9.

Chaudhary S. Psychosocial stressors in oral lichen planus. *Australian Dental journal* 2004; 49(4): 192-5.

Chevillard, C. Two new polymorphisms in the human interferon gamma (IFN-gamma) promoter. *Eur J Immunogenet* 2002; 29(1): 53-6.

Cox A, Camp NJ, Cannings C, Di Giovine FS, Dale M, Worthington J, et al. Combined sib-TDT and TDT provide evidence for linkage of the interleukin-1 gene cluster to erosive rheumatoid arthritis *Hum.Mol.Genet* 1999; 8: 1707-13.

Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1101-8.

Crowl RM, Stoller TJ, Conroy RR, Stoner CR. Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J Biol Chem* 1991; 266: 2647-51.

Dinarello CA. Interleukin 1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol* 1989; 44: 153-205.

Di Giovine FS, Camp N, Cox A, Chaudhary A, Sorrell JA, Crane A, et al. Detection and population analysis of IL-1 and TNF gene polymorphisms. *Cytokine molecular biology*. In: Practical Approach Series. Oxford: Oxford University, 2000.

Duff GW. Molecular genetics of cytokines: cytokines in chronic inflammatory disease. In: *The cytokine handbook*, 1998.

Eijnden SV, Carlier F, Van Beers D, Dangoisse C, Laet C. Familial lichen planus. *Pediatric Dermatology* 2003; 20: 184-6.

Endres S, Cannon JG, Ghorbani R, Dempsey RA, Sisson SD, Lonnemann G, et al. *In vitro* production of IL-1 beta, IL-1 alpha, TNF and IL-2 in healthy subjects: distribution, effect of cyclooxygenase inhibition and evidence of independence gene regulation. *Eur J Immunol* 1989; 19: 2327-33.

Eskdale J, Worsworth P, Bowman S, Field M, Gallagher G. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1997; 49: 635-9.

Eversole LR. Immunopathology of oral mucosa ulcerative, desquamative, and bullous diseases: selective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 77: 555-71.

Fanning GC, Bunce M, Black CM, Welsh KI. Polymerase chain reaction haplotyping using 3' mismatches in the forward and reverse primers: application to the biallelic polymorphism of tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha. *Tissue Antigens* 1997; 50: 23-31.

Fattori E, Cappelletti M, Costa P, Sellitto C, Cantoni L, Carelli M, et al. Defective inflammatory response in interleukin-6-deficient mice. *J Exp Med* 1994; 180:1243-50.

Fayyazi A, Schweyer S, Soruri A, Duong LQ, Radzun HJ, Peters J, et al. T lymphocyte and altered keratinocyte express interferon-gamma and interleukin 6 in lichen planus. *Arch Dermatol Res* 1999; 291: 485-90.

Feyen JH, Elford P, Di Padova FE, Trechsel U. Interleukin-6 is produced by bone and modulated by parathyroid hormone. *J Bone Miner Res* 1989; 4: 633-8.

Figueredo C, Ribeiro M, Fischer R, Gustafsson A. Increased interleukin-1 β concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J Periodontol* 1999; 70: 1457-63.

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1369-76.

Greer RO, McDowell JD, Hoernig G. Oral lichen planus: A premalignant disease? *Pathology Case Reviews* 1999; 4(1): 28-34.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart W. *Introdução à genética*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002.

Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli Piperno A, Murphy DP, May LT, et al. Interleukin-6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 6367-71.

Guimarães AL, Correia-Silva J de F, Sá AR, Victoria JM, Diniz MG, Costa F de O, et al. IL-1B, IL-6, IL-10 and TNFA functional gene polymorphisms in individuals with recurrent aphthous stomatitis. *Archives of Oral Biology* 2007; 52(3): 268-72.

Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, et al. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1797-1801.

Hurme M, Lahdenpohja N, Santtila S. Gene polymorphisms of interleukins 1 and 10 in infectious and autoimmune diseases. *Ann Med* 1998; 30: 469-73.

Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 1990; 145: 3297-303.

Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 1994; 145(6): 1301-8.

Ivanovski K, Nakova M, Warburton G, Pesevska S, Filipovska A, Nares S, et al. Psychological profile in oral lichen planus. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 1034–40.

Jongeneel CV, Beutler B. Genetic polymorphism in the human TNF region: correlation or causation? *J Inflamm* 1995–1996; 46: 3-6.

Jordan M, Otterness IG, NG R, Gessner A, Rollinghoff M, Beuscher HU. Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* 1995; 154: 4081-90.

Jungell P. Imunoelectron microscopic study of basement membrane in oral lichen planus. *J Cutan Pathol* 1990; 17: 72-6.

Jungell P. Oral lichen planus. A review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1991; 20: 129-35.

Karagouni EE, Dotsika EN, Sklavounou A. Alteration in peripheral blood mononuclear cell function and serum cytokines in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 28-35.

Kinane DF, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G. Analysis of genetic polymorphism at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *J Periodont Res* 1999; 34: 379-86.

Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989; 74:1-10.

Kövesi G, Banoczy J. Follow-up studies in oral lichen planus. *Int J Oral Surg* 1973; 2: 13-9.

Kornman KS, Hart TC. Genetics factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology* 2000 1997; 14: 202-15.

Krasowska D, Chodorowska G, Koziol-Montewka M, Ksiazek A, Buraczynska M. The -308 promoter polymorphism in the tumour necrosis factor gene in patients with lichen planus. *Acta Derm Venereol* 2005; 85: 400-3.

Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994; 368: 339-42.

Kupper TS. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues: mechanisms and speculations. *J Clin Invest* 1990; 86: 1783-9.

Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol* 1990; 144: 4226-30.

Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Sorrell J, Duff GW, Kornman KS. Effect of interleukin-1 polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J Periodont Res* 2000; 35: 102-7.

Lentsch AB, Shanley TP, Sarma V, Ward PA. In Vivo Suppression of NFkB and Preservation of Ikb α by Interleukin-10 and Interleukin-13. *J Clin Invest* 1997; 100: 2443-8.

Littlewood AJ, Russel J, Harvey GR, Hughes DE, Russel RGG, Gowen M. The modulation of the expression of IL-6 and its receptor in human osteoblasts *in vitro*. *Endocrinology* 1991; 129: 1513-20.

Gu GM, Martin MD, Darveau RP, Truelove E, Epstein J. Oral and serum IL-6 levels in oral lichen planus patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98: 673-8.

Guimarães ALS, de Sá AR, Victória JMN, Correia-Silva JF, Pessoa PS, Diniz MG, et al. IL-1B, IL-6, IL-10 and TNFA functional gene polymorphisms in individuals with recurrent aphthous stomatitis. *Archives of Oral Biology* 2007; 52: 268-72.

Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, et al. The polymorphism at position -174 of the IL-6 gene is not associated with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 45-7.

Koch W, Kastrati A, Bottiger C, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001; 159: 137-44.

Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS) - stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 401-6.

Lowik CW, Van Der Pluijm G, Bloys H, Hoekman K, Bijvoet OL, Aarden LA, et al. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 162: 1546-52.

Maes M, Song C, Lin A, Jongh R, Gastel AV, Kenis G, et al. The effects of psychological stress on humans increased production of pro-inflammatory

cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine* 1998; 10 (4): 313-8.

Mallaoglu N. Oral lichen planus: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000; 38: 370-7.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 1^oed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

Marie C, Pitton C, Fitting C, Cavillon JM. IL-10 and IL-4 synergize with TNF-alpha to induce IL-1ra production by human neutrophils. *Cytokine* 1996; 8: 147-51.

McGuire W, Hill AVS, Allsoff CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994; 371: 508-11.

Mehrian R, Quismorio FBJr, Strassmann G, Stimmler RC, Gauderman WJ, Morrison J. Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 596-602.

Miller MC, Mohrenweiser HW, Bell DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters* 2001; 120: 269-80.

Molvig J, Baek L, Christensen P, Manogue KR, Vlassara H, Platz P, et al. Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin-1, tumour necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences. *Scand J Immunol* 1988; 27: 705-16.

Moore KW, O'Garra A, De Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 165-90.

Moreira PR, de Sá AR, Xavier GM, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, et al. A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodont Res* 2005; 40: 306–11.

Nicklin MJ, Weith A, Duff GW. A physical map of the region encompassing the human interleukin 1 alpha, beta and the interleukin 1 receptor antagonist genes. *Genomics* 1994; 19: 382-4.

Nishimoto N, Kishimoto T, Yoshizaki K. Anti-interleukin 6 antibody treatment in rheumatic disease. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: i21-7.

Oh BR, Sasaki M, Perinchery G, Ryu SB, Park YI, Carroll P, et al. Frequent genotype changes at -308, and 488 regions of the tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene in patients with prostate cancer. *The Journal of Urology* 2000; 163: 1584–7.

Ollier WER. Cytokine genes and disease susceptibility. *Cytokines* 2004; 28: 174-178.

Papassotiropoulos A, Bagli M, Jessen F, Bayer TA, Maier W, Rao ML, et al. A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999; 45: 666-8.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 177-82.

Parkhill JM, Hennig BJ, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 682-9.

Perdigão PF, Guimarães ALS, Victoria JMN, Xavier GM, Romano-Silva MA, Gomez RS. Serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) in patients with oral lichen planus. *Archives of Oral Biology* 2007; (In Press).

Pezelj-Ribaric S, Prso IB, Abram M, Glazar I, Brumini G, Simunovic-Soskic M. Salivary levels of tumor necrosis factor- α in oral lichen planus. *Mediators of Inflammation* 2004; 13(2): 131-3.

Pociot F, D'Alfonso S, Compasso S, Scorza R, Richiardi PM. Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF alpha gene promoter. *Scand J Immunol* 1995; 42: 501-4.

Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup JA. Taq I polymorphism in the human interleukin 1 beta gene correlates with secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 396-402.

Porter SR, Kirby A, Olsen I, Barrett W. Immunologic aspects of dermal and oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo* 1997; 83: 358-66.

Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet* 1999; 26(1): 1-3.

Ray A, La Forge KS, Sehgal PB. On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 5736-46.

Regezi JA, Deegan MJ, Hayward JR, Arbour A. Lichen planus: immunologic and morphologic identification of the submucosal infiltrate. *Oral Surg* 1978; 46: 44-52.

Rhodus NL, Cheng B, Bowles W, Myers S, Miller L, Ondrey F. Proinflammatory cytokine levels in saliva before and after treatment of (erosive) oral lichen planus with dexamethasone. *Oral Diseases* 2006; 12: 112–6.

Rhodus NL, Cheng B, Myers S, Bowles W, Ho V, Ondrey F. A comparison of the pro-inflammatory, NF- κ B-dependent cytokines: TNF- α , IL-1- α , IL-6, and IL-8 in different oral fluids from oral lichen planus patients. *Clinical Immunology* 2005; 114: 278–83.

Roitt I. *Immunology*. 5^o ed. 1998.

Rojo-Moreno JL; Bagán JV, Rojo-Moreno J, Donat JS, Milián MA, Jiménez Y. Psychologic factors and oral lichen planus – A psychometric evaluation of 100 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 86(6): 687-91.

Rood MJ, Van Krugten MV, Zanelli E, Van Der Linden MW, Keijsers V, Schreuder GM, et al. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1): 129-34.

Sacchetti E, Bocchio-Chiavetto L, Valsecchi P, Scassellati C, Pasqualetti P, Bonvicini C, et al. -G308A tumor necrosis factor alpha functional polymorphism and schizophrenia risk: meta-analysis plus association study. *Brain Behav Immun*. 2007; 21(4): 450-7.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable polymerase. *Science* 1988; 239: 487-91.

Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, Roberts IS, Short CD, Dyer PA, et al. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int* 1999; 56: 281-8.

Santoro A, Majorana A, Bardellini E, Festa S, Sappeli P, Facchetti F, et al. NF-kappaB expression in oral and cutaneous lichen planus. *J Pathol* 2003; 201:466-72.

Santoro A, Majorana A, Roversi L, Gentili F, Marrelli S, Vermi W, et al. Recruitment of dendritic cells in oral lichen planus. *J Pathol* 2005 205(4): 426-34.

Sasaki T, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Kukita Y, Baba S, et al. Precise Estimation of Allele Frequencies of Single-Nucleotide Polymorphisms by a Quantitative SSCP Analysis of Pooled DNA. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 214-8.

Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello, CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990; 75: 40-7.

Schotte H, Schluter B, Rust S, Assmann G, Domschke W, Gaubitz M. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2001; 40: 393-400.

Schottelius AJG, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS Jr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB Kinase activity and nuclear factor kappaB DNA Binding. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 31868-74.

Scully C, El-Kom M. Lichen planus: review and update on pathogenesis. *J Oral Pathol* 1985; 14(6): 431-58.

Sehgal PB, May LT, Tamm I, Vilcek J. Human beta 2 interferon and B- cell differentiation factor BSF-2 are identical. *Science* 1987; 235: 731-2.

Shaw SH, Carrasquillo MM, Kashuk C, Puffenberger EG, Chakravarti A. Allele frequency distributions in pooled DNA samples: applications to mapping complex disease genes. *Genome Res* 1998; 8: 111–23.

Silverman JS, Griffith M. Studies on oral lichen planus: Follow-up on 200 patients, clinical characteristics and associated malignancy. *Oral Surg* 1974; 37(5): 705-10.

Silverman JS, Lozada-Nur F, Gorsky M. A prospective follow-up study of 570 patients with oral lichen planus: persistence, remission, and malignant association. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 60: 30–4.

Simark-Mattsson C, Bergenholtz G, Jontell M, Eklund C, Seymour GJ, Sugerman PB, et al. Distribution of interleukin-2-4-10, tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta mRNAs in oral lichen planus. *Arch Oral Biol* 1999; 44: 499-507.

Simark-Mattsson C, Jontell M, Bergenholtz G, Heyden M, Dahlgren UI. Distribution of interferon- γ mRNA-positive cells in oral lichen planus lesions. *J. Oral Pathol. Med* 1998; 27: 483-8.

Skoog T, Van't Hoof FM, Kallin B, Jovinge F, Boquist S, Nilsson J, et al. A common functional polymorphism (C-->A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene associated with reduced circulating levels of TNF-alpha. *Hum Mol Genet* 1999; 8(8): 1443-9.

Stuber F, Udalova IA, Book M, Drutskaya LN, Kuprash DV, Turetskaya RL, et al. - 308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. *J Inflamm* 1996; 46: 42-50.

Sugermann PB, Savage NW, Seymour GJ, Walsh LJ. Is there a role for tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in oral lichen planus? *J Oral Pathol Med* 1996; 25: 219-24.

Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, et al. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 350-65.

Tagore A, Gonsalkorale WM, Pravica V, Hajeer AH, McMahon R, Whorwell PJ, et al. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel diseases. *Tissues Antigens* 1999; 54: 386-90.

Takahashi H, Furukawa T, Hashimoto S, Suzuki N, Kuroha T, Yamazaki F, et al. Contribution of TNF-alpha and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 1317-23.

Taylor SL. Genomics organization of the interleukin 1 locus. *Genomics* 2002; 79: 726-33.

Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin-6 transcriptional regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 18138-44.

Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 1994; 83: 113-8.

Tilg H, Dinarello CA, Mier JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today* 1997; 18: 428-32.

Van De Loo AJ, Kuiper S, Van Enkevort HJ, Arntz OJ, Van Den Berg WB. Interleukin-6 reduces cartilage destruction during experimental arthritis. *Am J Pathol* 1997; 151: 177-91.

Van Der Poll T, Van Deventer SJH. The role of interleukin-6 in endotoxin-induced inflammatory responses. *Prog Clin Biol Res* 1998; 397: 365-77.

Walker SJ, Van Dyke TE, Rich S, Kornman KS, Di Giovine FS, Hart TC. Genetic polymorphisms of the IL-1 α and IL-1 β genes in African-American LJP patients and an African-American control population. *J Periodontol* 2000; 71: 723-8.

Walsh LJ, Ishii T, Savage NW, Gemmell E, Seymour GJ. Immunohistologic analysis of epithelial cell populations in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990a; 19: 177-81.

Walsh LJ, Savage NW, Ishii T, Seymour GJ. Immunopathogenesis of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990b; 19: 389-96.

Walsh LJ, Davis MF, Xu LJ, Savage NW. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 266-72.

Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor κ B (NF κ B) activation in human monocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 9558-63.

Watanabe S, Arai K-I. Roles of the JAK-STAT system in signal transduction via cytokine receptors. *Current Opinion in Genetics & Development* 1996; 6(5): 587-96.

Westendorp RGJ, Langermans JAM, Huizinga TWJ, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997; 349: 170-3.

Whyte M, Hubbard R, Meliconi R, Whidborne M, Eaton V, Bingle C, et al. Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 755-8.

Wilson AG, Di Giovine FS, Blakemore M, Duff G. Single-base polymorphism in the human tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene detectable by NcoI restriction of the PCR product. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 353.

Wilson AG, Symons JA, Mcdowell TL, Mcdevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3195-9.

Wormhoudt LW, Commandeur JN, Vermeulen NP. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochromeP450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Critic Rev Toxicol* 1999; 29: 59-124.

Yang Y. Interleukin-4 induced proliferation in normal human keratinocytes is associated with c-myc gene expression and inhibited by genistein. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 367-72.

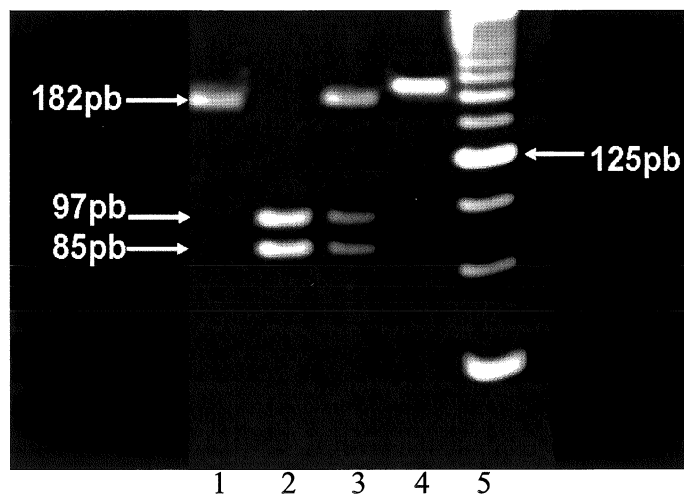
Zhao ZZ, Savage NW, Walsh LJ. Association between mast cells and laminin in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 163-7.

Zegarelli D.J. The treatment of oral lichen planus. *Ann Dent* 1993; 52 (2): 3-8.

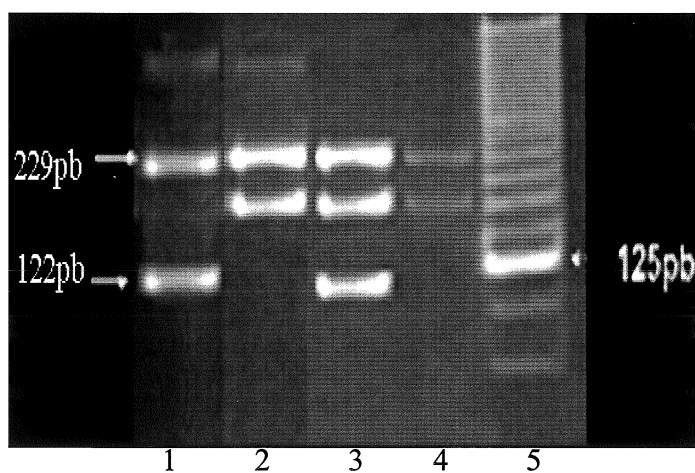
Zou GY, Donner A. The merits of testing Hardy-Weinberg equilibrium in the analysis of unmatched case-control data: a cautionary note. *Ann Hum Genet* 2006; 70(6): 923-33.

7. Anexos

Anexo A

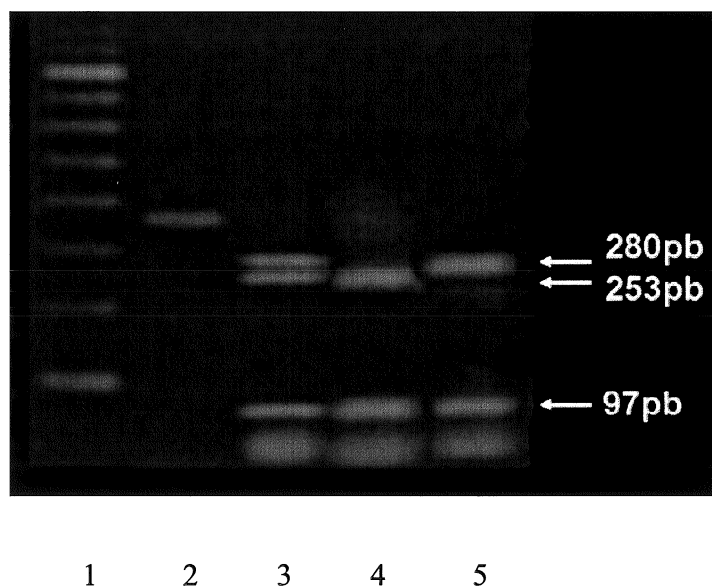


Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5%, referente às reações de digestão dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (C/T), *locus* +3954, no gene *IL1B*. Observa-se a banda de 182pb referente ao paciente com genótipo TT (canaleta 1); as bandas de 97pb + 85pb, referentes ao paciente com genótipo CC (canaleta 2); as bandas 182pb + 97pb + 85pb, referentes ao paciente com genótipo CT (canaleta 3) e a banda de 194pb referente ao produto de PCR. Na canaleta 5 encontra-se o padrão de peso molecular.

Anexo B

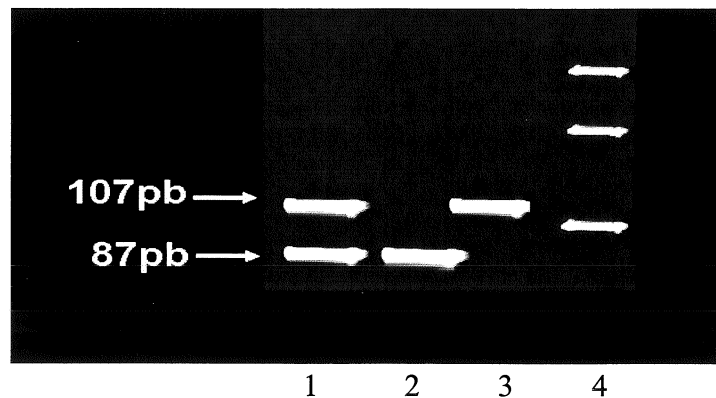
Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5%, referente às reações de digestão dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (G/C), *locus* -174, no gene *IL6*. Observam-se as bandas de 229pb + 122pb, referentes ao paciente com genótipo CC (canaleta 1); as bandas de 229pb + 173pb, referentes aos pacientes com genótipo GG (canaletas 2 e 4); e as bandas de 229pb + 173pb + 122pb, referentes ao paciente com genótipo GC (canaleta 3). Na canaleta 5 há o padrão de peso molecular.

Anexo C

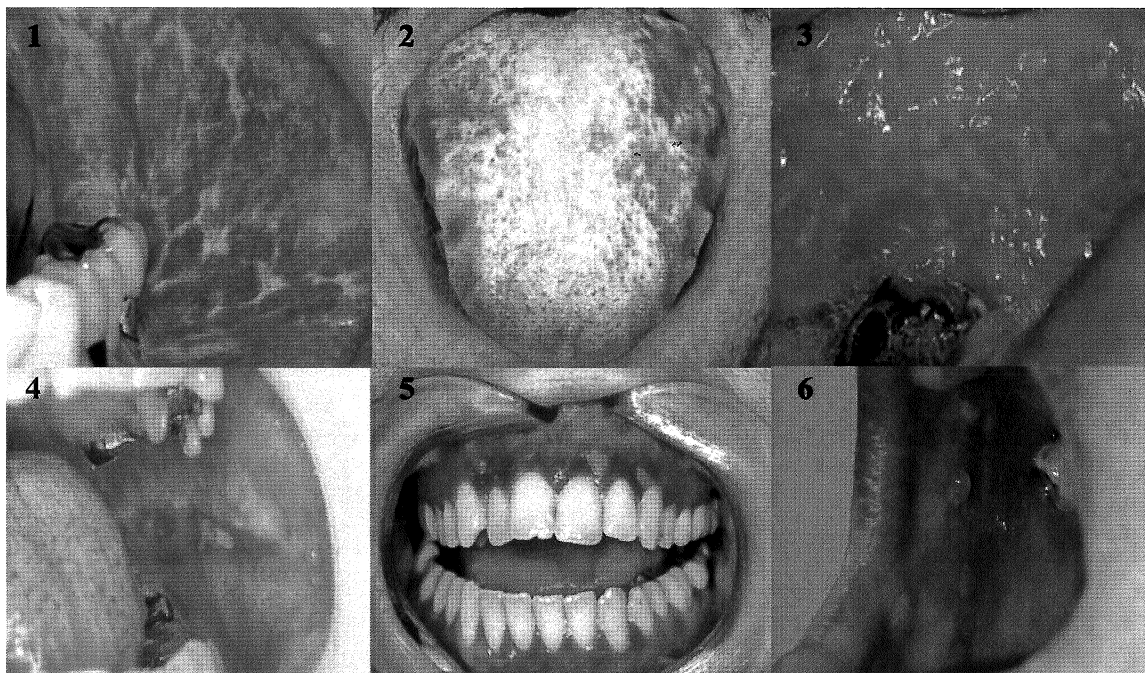


Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% referente às reações de digestão dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (G/A), *locus* -1082, no gene *IL10*. Observam-se as bandas de 280pb + 253pb + 97pb, referentes ao paciente com genótipo GA (canaleta 3); as bandas de 253pb + 97pb, referentes ao paciente com genótipo GG (canaleta 4); e as bandas de 280pb + 97pb, referentes ao paciente com genótipo AA (canaleta 5). Na canaleta 1 encontra-se o padrão de peso molecular. Na canaleta 2 podemos observar o controle negativo (produto de PCR sem a enzima de restrição).

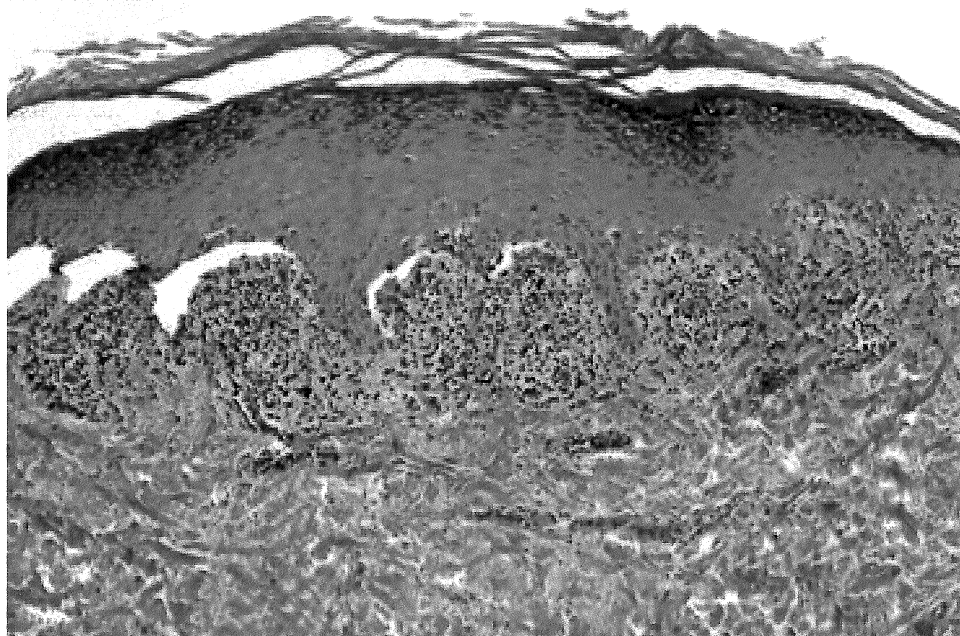
Anexo D



Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5%, referente às digestões dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (G/A), *locus* -308 no gene *TNFA*. Podemos observar as bandas de 107 pb + 87pb, referentes ao paciente com genótipo GA (canaleta 1); a banda de 87pb, referente ao paciente com genótipo GG (canaleta 2); e a banda de 107pb referente ao paciente com genótipo AA (canaleta 3). Na canaleta 4 encontra-se o padrão de peso molecular.

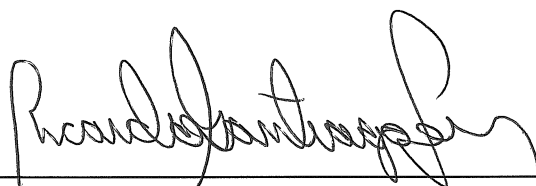
Anexo E

Apresentações clínicas do Líquen Plano Bucal. A figura 1 ilustra o LP Reticular, a 2 o LP em Placa, a 3 o LP papular, a 4 o LP Erosivo, a 5 o LP Atrófico e a 6 o LP bolhoso.


Anexo F

Aspecto histológico do Líquen Plano Bucal.

Dissertação defendida e aprovada, em 17 de agosto de 2007, pela
Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Ricardo Santiago Gomez (Orientador)



Prof. Sérgio Neves Drummond



Prof. Paula Rocha Moreira