

TELMA CRISTINA ARÃO

# Análise de microRNAs (miRNAs) em Líquen Plano Bucal

Faculdade de Odontologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2011

Telma Cristina Arão

# Análise de microRNAs (miRNAs) em Líquen Plano Bucal

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez.

Faculdade de Odontologia - UFMG

Belo Horizonte

2011

A662a Arão, Telma Cristina  
2011 Análise de microRNAs (miRNAs) em Líquen Plano Bucal / Telma  
T Cristina Arão. 2011.  
100 f.; il.  
Orientador: Ricardo Santiago Gomez  
Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Minas Gerais,  
Faculdade de Odontologia.  
1. Interferon gama – Teses. 2. Líquen plano bucal – Teses.  
3. MicroRNAs – Teses. I. Gomez, Ricardo Santiago. II. Universidade  
Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE DONTOLOGIA  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Dissertação intitulada "**Análise de microRNAs (miRNAs) em Líquen Plano Bucal**", área de concentração em **Patologia Bucal**, apresentada por **Telma Cristina Arão**, para obtenção do grau de **Mestre em Odontologia**, **APROVADA** pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Dr. Ricardo Santiago Gomez  
FO-UFMG - Orientador

Dra. Jeane de Fátima Correia Silva  
ICB-UFMG

Dra. Mônica Maria Demas Alvares Cabral  
FM-UFMG

Profa. Dra. Efigênia Ferreira e Ferreira  
Subcoordenadora do Colegiado do  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Belo Horizonte, 20 de julho de 2011.

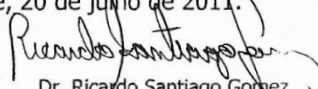


UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
 Faculdade de Odontologia  
 Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
 Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha  
 Belo Horizonte – MG – 31.270-901  
 Tel: (31) 3409 2470 Fax: (31) 3409 2472  
 Email: posgrad@odonto.ufmg.br

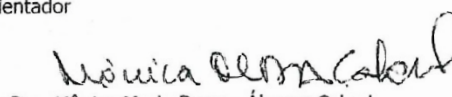


Ata da Comissão Examinadora para julgamento da Dissertação de Mestrado em Odontologia, área de concentração em **Patologia Bucal**, da candidata **Telma Cristina Arão**.

Aos 20 de julho de 2011, às 14:00 h, na sala de Pós-Graduação (3403) da Faculdade de Odontologia, reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores Dr. Ricardo Santiago Gomez, Dra. Jeane de Fátima Correia Silva e Dra. Mônica Maria Demas Álvares Cabral. O Professor Dr. Ricardo Santiago Gomez, Orientador da Dissertação, na qualidade de Presidente da sessão, apresentou a Comissão Examinadora e declarou abertos os trabalhos. À candidata foi dado o tempo de até 50 (cinquenta) minutos para fazer a exposição oral sobre o seu trabalho "**Análise de microRNAs (miRNAs) em Líquen Plano Bucal**". Encerrada a exposição, foi iniciada a arguição, dentro do limite de tempo de 30 (trinta) minutos, pelos Professores Dra. Jeane de Fátima Correia Silva, Dra. Mônica Maria Demas Álvares Cabral e Dr. Ricardo Santiago Gomez, com limite de 30 (trinta) minutos para a resposta. Terminadas as arguições, o Presidente suspendeu os trabalhos por 10 minutos para que os examinadores pudessem decidir pelo resultado a ser dado à candidata. A Comissão Examinadora opta pela aprovação..... da candidata. Para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada por mim Dr. Ricardo Santiago Gomez, Presidente e pelos demais membros desta comissão examinadora. Belo Horizonte, 20 de julho de 2011.

  
 Dr. Ricardo Santiago Gomez  
 FO-UFMG - Orientador

  
 Dra. Jeane de Fátima Correia Silva  
 ICB-UFMG

  
 Dra. Mônica Maria Demas Álvares Cabral  
 FM-UFMG

**ΕΠÍΓΡΑΦΕ**

*"Na vida, não vale tanto o  
que temos, nem tanto importa o que somos.  
Vale o que realizamos com aquilo que  
possuímos e, acima de tudo,  
importa o que fazemos de nós!"*

*Chico Xavier*

# **AGRADECIMENTOS**



**AGRADEÇO...**

*... A Deus por permitir mais essa oportunidade de aprendizado, reflexão e aprimoramento;*

*Aos meus Pais, Dalmo e Nízia, por toda dedicação e incentivo;*

*Às minhas irmãs, Denise, Débora e Tatiane, pela amizade;*

*Ao Arthur por todo carinho, apoio e companheirismo;*

*Ao Professor Ricardo Santiago Gomez, pelo qual carrego uma enorme gratidão e respeito. Agradeço-lhe pela confiança e pela oportunidade;*

*A Professora Carolina Gomes pela amizade, pelo zelo pelo Laboratório de Biologia Molecular e pelo auxílio na finalização do trabalho;*

*Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular, em especial, Elizete, Lucyana, Thiago, Kelma, Renata, Vanessa, Ana Carolina, Clarice e Marina. Meus sinceros agradecimentos pela troca de experiências, solidariedade e pelos bons momentos juntos;*

*À Cláudia pela sincera amizade, pelo carinho e pelo auxílio no desenvolvimento metodológico do trabalho.*

*Ao amigo João Artur pela ajuda nos experimentos de PCR em Tempo Real quantitativo;*

*À Jeane por todo auxílio e confiança;*

*Aos alunos de iniciação científica: Nayara, Marcela, Léo, Alessandra, Natália e Igor;*

*Aos professores de Patologia da Faculdade de Odontologia UFMG: Tarcília, Ricardo Mesquita, Cássia e Dorinha;*

*Aos amigos do mestrado, em especial, Silvinha, Fred, Vladimir, Fabrício e Márcio;*

*Aos funcionários da Faculdade de Odontologia UFMG, principalmente, Beth, Inês e Dani;*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro;*

*Aos amigos e professores do projeto de extensão TMO;*

*Aos pacientes que solidariamente aceitaram nosso convite em participar do trabalho, colaborando assim com os estudos e aprofundamento do conhecimento;*

*Aos meus familiares e amigos que compreenderam minha ausência;*

*(...) E a tantos outros que de maneira direta ou indireta também contribuíram para realização deste trabalho.*

# **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>FIGURA 1.</b> Hipótese para a imunopatogênese do líquen plano bucal (LPB).....	36
<b>FIGURA 2.</b> Biogênese e regulação gênica pelos microRNAs (miRNAs).....	41
<b>FIGURA 3.</b> Fluxograma dos experimentos realizados.....	56

## **LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS**

## LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

- GRÁFICO 1.** Expressão do miRNA-146a e miRNA-155 em líquen plano bucal. Quantificação relativa (RQ) do miRNA-146a e miRNA-155 normalizada pelo endógeno U47 em relação ao calibrador (eixo X) em amostras de líquen plano bucal (LPB).....58
- GRÁFICO 2.** Quantificação relativa (RQ) do miRNA-146a e miRNA-155 em líquen plano bucal (LPB) e mucosa normal.....59
- TABELA 1.** Características clínicas dos pacientes com líquen plano bucal (LPB) incluídos neste estudo.....49
- TABELA 2.** Características clínicas dos pacientes normais incluídos neste estudo.....50
- TABELA 3.** Níveis de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e quantificação relativa (RQ) do miRNA-146a e miRNA-155 em amostras de líquen plano bucal (LPB).....60

## **LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS**

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Ago2: proteína Argonauta 2

APCs: células apresentadoras de antígenos

CD: célula dendrítica

CD4<sup>+</sup>: linfócito T CD4<sup>+</sup>

CD8<sup>+</sup>: linfócito T CD8<sup>+</sup>

cDNA: DNA complementar

Ct: limiar de detecção a cada ciclo de amplificação

CTLA-4: antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos

CTL: linfócito T citotóxico

COEP: Comitê de Ética em Pesquisa

DECH: doença do enxerto contra o hospedeiro

DNA: ácido desoxirribonucléico

EDTA: ácido etilenodiano tetra-acético

ELISA: ensaio de imunoadsorção ligado à enzima / ensaio imunoenzimático

HCV: vírus da hepatite C

IFN- $\gamma$ : interferon-gama

IL-1: interleucina 1



IL-2: interleucina 2

IL-4: interleucina 4

IRAK-1: quinase associada ao receptor de interleucina-1

LFas: ligante Fas

LPB: líquen plano bucal

LP: líquen plano

LPS: lipopolissacarídeo

MHC I: complexo de histocompatibilidade do tipo I

MHC II: complexo de histocompatibilidade do tipo II

mL: mililitro

miRNAs: microRNAs

mRNAs: RNAs mensageiros

ng: nanograma

NK: *natural killer*

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBS: solução salina de fosfato

PCR: reação em cadeia polimerase

pg: picograma

PMSF: fenilmetilsulfonilflúor

Pol II: RNA polimerase II

Pre-miRNA: microRNA precursor

Pri-miRNA: miRNA primário

qRT-PCR: PCR em Tempo Real quantitativo

RISC: complexo de silenciamento de RNA

RNA: ácido ribonucléico

RQ: quantificação relativa

STAT1: fator de transcrição, transdutor de sinal e ativador de transcrição

SOCS-1: supressor de sinalização de citocina 1

Th1: linfócito T auxiliar 1

Th2: linfócito T auxiliar 2

TCR: receptor de célula T

THP1: linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana

TLR: receptor tipo Toll

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

TRAF-6: receptor associado ao fator 6 do fator de necrose tumoral

T<sub>reg</sub>: linfócito T regulatório

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

USA: Estados Unidos da América

UTR: região não traduzida

°C: graus Celsius

µg: micrograma

µL: microlitro

# SUMÁRIO

## SUMÁRIO

1. RESUMO.....	24
2. ABSTRACT.....	27
3. INTRODUÇÃO.....	29
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	32
4.1. Líquen plano .....	32
4.2. Líquen plano bucal.....	32
4.3. Líquen plano bucal: Resposta imune e Interferon-gama.....	37
4.4. MicroRNAs.....	39
4.5. MicroRNA-146a.....	42
4.6. MicroRNA-155.....	43
5. OBJETIVOS.....	45
5.1. Objetivo geral .....	45
5.2. Objetivos específicos .....	45
6. MATERIAL E MÉTODOS .....	47
6.1. Caracterização das amostras.....	47
6.2. Aspectos Éticos.....	48
6.3. Seleção dos miRNAs .....	50
6.4. Extração de RNA.....	51
6.5. Transcrição reversa.....	51
6.6. PCR em Tempo Real quantitativo (qRT-PCR).....	52
6.7. Escolha do endógeno.....	52
6.8. Teste da eficiência .....	53
6.9. Quantificação do microRNA .....	54
6.10. Teste imunoenzimático - ELISA .....	54
6.11. Análise estatística dos resultados .....	55
6.12. Fluxograma dos ensaios .....	56
7. RESULTADOS .....	58
8. DISCUSSÃO.....	63
9. CONCLUSÕES.....	68
10. ANEXOS .....	69

ANEXO A – Artigo.....	70
ANEXO B – Ficha Clínica Líquen Plano Bucal .....	88
ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	89
ANEXO D – Parecer COEP/UFMG.....	91
ANEXO E – Gel de RNA.....	92
REFERÊNCIAS.....	94

## **RESUMO**

## 1. RESUMO

O líquen plano bucal (LPB) é uma doença imunologicamente mediada que acomete a mucosa com uma variedade de manifestações clínicas em cerca de 0,1 a 4% da população adulta, principalmente, em pacientes do sexo feminino. Embora sua etiopatogênese ainda seja desconhecida, vários estudos demonstraram tratar-se de uma doença imunologicamente mediada por uma resposta, predominantemente, do tipo Th1, havendo expressão de elevados níveis da citocina interferon-gama (IFN- $\gamma$ ). Os microRNAs (miRNAs) são pequenas fitas de RNA que não codificam proteínas e atuam regulando a expressão de genes na fase pós-transcricional através da degradação ou silenciamento de RNAs mensageiros (mRNAs). Os miRNA-146a e miRNA-155 são importantes reguladores da resposta imune. Estudos revelam que estes podem atuar regulando, inclusive, a diferenciação de linfócitos T *naive*. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão dos miRNA-146a e miRNA-155 em amostras de LPB em relação a amostras de mucosa normal; além de correlacionar a expressão destes miRNAs aos níveis de IFN- $\gamma$  nas amostras LPB. Foram avaliados 31 indivíduos que apresentavam diagnóstico clínico e histopatológico de LPB e 6 indivíduos voluntários saudáveis. As amostras coletadas foram submetidas ao PCR em Tempo Real quantitativo (qRT-PCR) e parte delas ao teste imunoenzimático (ELISA). Os resultados revelaram uma elevada quantificação do miRNA-146a e do miRNA-155 nas amostras de LPB em relação às amostras de mucosa normal ( $p=0.0031$  e  $p=0.0120$ , respectivamente). Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre a dosagem de IFN- $\gamma$  e a quantificação relativa de ambos os



miRNAs avaliados. Desta maneira, os dados deste estudo sugerem uma possível participação do miRNA-146a e do miRNA-155 na patogênese do LPB. Entretanto, estudos futuros são necessários para melhor esclarecer os mecanismos envolvidos na regulação da resposta imune no LPB pelos miRNAs. Além disso, os dados deste estudo também poderão ser úteis no desenvolvimento de ferramentas moleculares que permitam um melhor entendimento da patogênese da doença e tratamentos mais eficazes.

**Palavras chaves:** miRNA-146a; miRNA-155; interferon-gama; líquen plano bucal; microRNAs.

# **ABSTRACT**

## 2. ABSTRACT

### **Increased miRNA-146a and miRNA-155 expressions in oral lichen planus**

Oral lichen planus (OLP) is a chronic inflammatory disease that is Th1-mediated and affects the oral mucosa with a variety of clinical presentations. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) is an important cytokine involved in the regulation of local immune response in OLP. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules whose function is the post-transcriptional regulation of certain subsets of mRNAs. Recently, some studies have demonstrated that miRNAs participate in immune system regulation. Considering that increased IFN- $\gamma$  expression is possibly associated with OLP pathogenesis and may be influenced by the action of miRNA-146a and miRNA-155, the purpose of the present study was to investigate the expression of these miRNAs together with its association with IFN- $\gamma$  expression in OLP lesions. Quantitative Real-Time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to verify the relative quantification of miRNA-146a and miRNA-155 in 31 OLP samples and 6 normal mucosa samples. ELISA assay also was performed to determine the IFN- $\gamma$  levels in some OLP samples. The results showed that the relative quantification of miRNA-146a and miRNA-155 was higher in OLP than in normal oral mucosa ( $p = 0.0120$  and  $p = 0.0031$ , respectively). However, both the miRNAs were not correlated with the IFN- $\gamma$  levels. In conclusion, our study brings to light the possibility of miRNA-146a and miRNA-155 involvement in the regulation of the immune response in OLP. Nevertheless, further studies are necessary to establish the functional significance of these findings in OLP development.

# **INTRODUÇÃO**

### 3. INTRODUÇÃO

O líquen plano (LP) é uma doença imunologicamente mediada que comumente acomete pele, anexos cutâneos e mucosas, dentre as quais a mucosa bucal. A etiopatogenia do LP ainda permanece incerta. Os tratamentos compreendem terapias apenas de alívio dos sintomas. Frequentemente, as lesões de LP cutâneo mostram-se autolimitantes, enquanto as lesões de líquen plano bucal (LPB) mostram-se crônicas, podendo exibir momentos de remissão (Parashar, 2011). As lesões de LPB podem ocorrer tanto isoladamente quanto, concomitantemente, com lesões cutâneas e/ou com lesões em outras mucosas como a esofágica e genital (Parashar, 2011).

O LPB exibe uma grande diversidade de manifestações clínicas, sendo seu diagnóstico realizado através da associação entre características clínicas e histopatológicas. Histologicamente, observa-se infiltrado inflamatório crônico disposto em banda subepitelial, causando degeneração e desorganização da camada basal. Estes achados descrevem uma patofisiologia de desregulação imunológica, com predomínio da reposta imune do tipo Th1, no qual uma diversificada rede de citocinas é liberada. A citocina interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), por ser a citocina que caracteriza a reposta imune do tipo Th1, é bastante estudada em lesões de LPB. O IFN- $\gamma$  é considerado a principal citocina responsável por desencadear, exacerbar e manter a cronicidade desta doença (Sugerman *et al.*, 2002). Alguns estudos demonstraram que alterações gênicas podem ser fatores predisponentes para o desencadeamento das lesões de LPB. Estudos *in vitro* e em *in vivo* propõem que variantes alélicas polimórficas de genes de citocinas possam estar relacionadas à alta ou baixa produção das mesmas, favorecendo a susceptibilidade ao desenvolvimento de várias

doenças, dentre as quais o LPB (Gomez *et al.*, 2007; Kinkong *et al.*, 2011). Entretanto, até o presente momento, nenhum estudo se propôs a avaliar como fatores epigenéticos estariam afetando a desregulação imune ocorrida no LPB. Recentemente, pequenas fitas RNA não codificadoras de proteínas, denominados microRNAs (miRNAs) tem sido alvo de vários estudos epigenéticos no intuito de melhor elucidar suas funções na regulação gênica. Estes miRNAs são responsáveis por regular a expressão de genes na fase pós-transcricional através da degradação ou silenciamento de RNAs mensageiros (mRNAs) alvos. Os miRNAs desempenham papel de fundamental importância na regulação de vários processos biológicos, tais como proliferação celular, apoptose, resposta imune e carcinogênese (Iborra *et al.*, 2010). Vários estudos já demonstram que ambos os miRNAs, miRNA-146a e miRNA-155, estão relacionados a regulação dos processos imunes e inflamatórios e, inclusive, tem sido alvos de estudos em algumas doenças caracterizadas por desordens imunológicas como lúpus eritematoso e artrite reumatóide (Sonkoly *et al.*, 2008; Iborra *et al.*, 2010). Cada vez mais, as funções biológicas dos miRNAs na imunidade tem sido exploradas, pois representam um importante alvo para potenciais agentes diagnósticos e terapêuticos futuros (Mack, 2007). Desta maneira, este presente estudo se propõe a avaliar a expressão do miRNA-146a e do miRNA-155 e sua possível correlação com os níveis de IFN- $\gamma$  no LPB.

# **REVISÃO DE LITERATURA**

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1. Líquen plano

O líquen plano (LP) é uma doença inflamatória crônica que acomete mucosas, pele e anexos cutâneos, exibindo uma variedade de manifestações clínicas (Katta, 2000). Esta doença foi primeiramente descrita por Erasmus Wilson em 1869 (Wilson, 1869; Scully *et al.*, 2000; Conrotto *et al.*, 2006; Parashar, 2011). Clinicamente, as lesões clássicas de LP cutâneo apresentam-se como pápulas, pruriginosas, de coloração púrpura, podendo haver estrias esbranquiçadas, denominadas “estrias de Wickham”. Pacientes acometidos pelo LP cutâneo, frequentemente, exibem lesões em mucosa bucal, porém esta concomitância nem sempre é verificada. (Vazquez-Lopez *et al.*, 2007; Parashar, 2011).

### 4.2. Líquen plano bucal

O líquen plano bucal (LPB) exibe uma inflamação crônica que afeta os tecidos bucais causando-lhes manifestações clínicas distintas, classificadas como reticular, erosiva, tipo placa, papular, atrófica e bolhosa (Andreasen, 1968; Lodi *et al.*, 2005).

A prevalência do LPB é de 0,1 a 4% na população, sendo mais frequente em pacientes do sexo feminino que masculino numa relação de 3:2. Trata-se de uma doença rara em crianças e que possui maior incidência entre a terceira e sexta década de vida (Parashar, 2011).

As manifestações clínicas mais comuns do LPB são: presença de estrias esbranquiçadas de aspecto rendilhado; placas brancas; bem como, presença de áreas eritematosas e ulceradas que também podem estar associadas às



estrias esbranquiçadas. Estas características definem as principais variantes clínicas do LPB que são as formas reticular, tipo placa e erosiva, respectivamente. Tais variantes clínicas podem coexistir em um mesmo paciente (van der Waal, 2009; Parashar, 2011).

Os sítios de maior acometimento são mucosa jugal, em geral, bilateralmente, além de língua e gengiva. É bastante utilizado o termo clínico “gengivite descamativa” quando as lesões de LPB se restringem às gengivas. Regiões tais como palato, assoalho bucal e semi-mucosa labial são sítios incomuns de acometimento (van der Waal, 2009; Parashar, 2011).

As lesões de LPB podem apresentar sintomatologia dolorosa, especialmente, na variante clínica erosiva cujos sintomas compreendem sensação de queimação e severa dor bucal. O tratamento de escolha para as lesões sintomáticas de LPB é, geralmente, a administração de corticóides tópicos, às vezes, por longos períodos de tempo na tentativa de alívio destes sintomas. Frequentemente, efeitos adversos como náuseas, candidíase e xerostomia ocorrem devido ao tratamento prolongado (Silverman *et al.*, 2000; Lodi *et al.*, 2005 b; Parashar, 2011).

As lesões de LPB, geralmente, exibem períodos de exacerbação intercalados a outros de remissão espontânea (Silverman *et al.*, 1991). Alguns autores correlacionam altos níveis de ansiedade, forte depressão e aumento das desordens psíquicas com quadros de exacerbação da doença (Rojo-Moreno *et al.*, 1998).

Embora a Organização Mundial de Saúde (OMS) tenha classificado o LPB como uma lesão potencialmente cancerizável, a literatura permanece controversa com relação às taxas de transformação maligna das lesões. Estas

variam de 0% a 5,3% em períodos de 3 a 6 anos de acompanhamento. Desta maneira, é recomendado um adequado acompanhamento clínico dos pacientes diagnosticados com LPB (OMS, 2005; Lodi *et al.* 2005 b; Parashar, 2011).

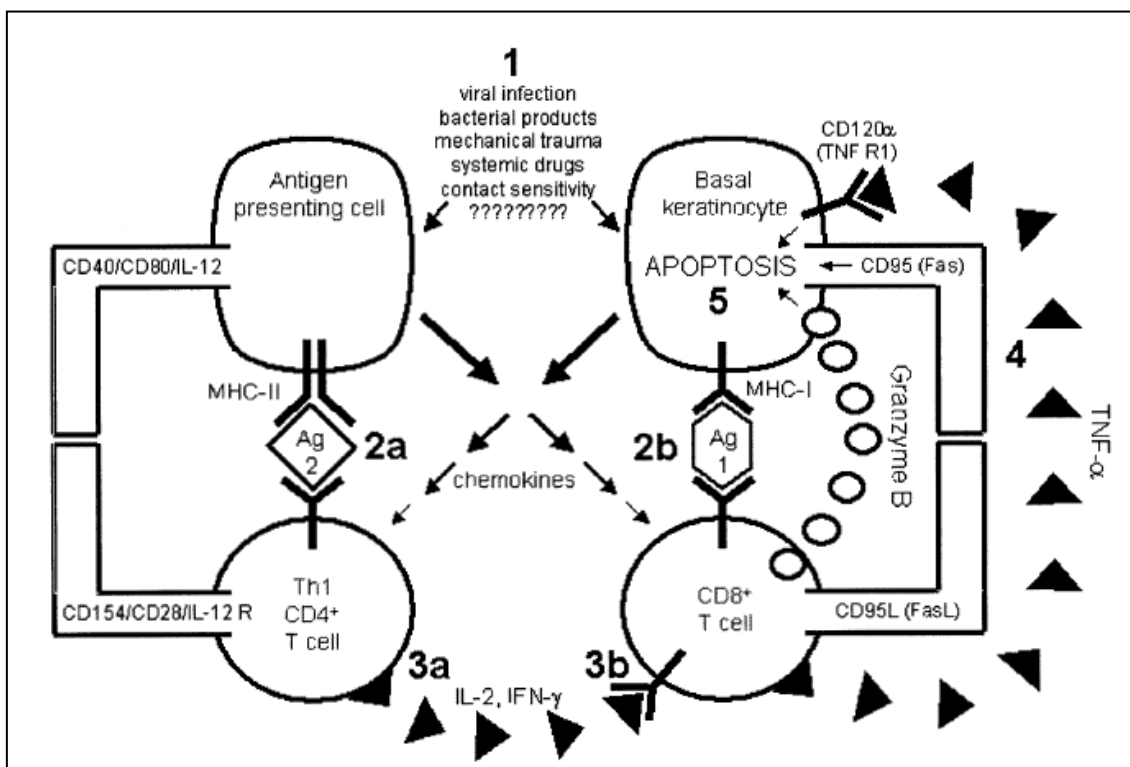
O exame histopatológico é necessário para a confirmação do diagnóstico clínico de LPB. Neste exame, observam-se graus variados de orto e/ou paraceratinização do epitélio, camada espinhosa de espessura variada, podendo ou não apresentar cristas interpapilares hiperplásicas denominadas “dentes de serra” (Scully *et al.*, 1985). Histopatologicamente, observa-se ainda, infiltrado de células inflamatórias mononucleares disposto em banda sub-epitelial constituído, predominantemente, por linfócitos e macrófagos. Degeneração e desorganização da camada basal do epitélio também são observadas (Eisen *et al.*, 2005). Corpos colóides, denominados corpúsculos Civatte, podem ser evidenciados nas camadas basais e supra-basal do epitélio (Jacques *et al.*, 2003). Krutchkoff & Eisenberg (1985) propõem o termo displasia líquenóide para descrever aquelas lesões que se assemelham histopatologicamente ao LPB, mas que exibem graus de displasia do epitélio. O termo lesão líquenóide bucal foi proposto por Finne *et al.* (1982) para designar outras condições, tais como doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e reação líquenóide ao amálgama, que possuem características clínicas e histopatológicas semelhantes ao LPB.

Vários aspectos da etiopatogenia do LPB ainda são desconhecidos. Desta maneira, esta tem sido alvo de vários estudos no intuito de melhor compreender seus mecanismos e permitir que haja o desenvolvimento de métodos diagnósticos e terapêuticos mais eficazes para a abordagem desta doença (Neppelberg *et al.*, 2007).

Lodi *et al.* (2005) propõem que vários fatores exógenos, dentre eles agentes infecciosos, como o vírus da hepatite C (HCV) e bactérias como a *Helicobacter pylori* possam estar relacionados ao desenvolvimento das lesões de LPB. Com relação à resposta imunológica presente na doença, tem-se bem estabelecido a participação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (linfócitos T auxiliares ou T *helpers* - Th), linfócitos T CD8<sup>+</sup> (linfócitos T citotóxicos) e secreção de um grande número de citocinas. No LPB a apresentação de antígenos às células T CD4<sup>+</sup> promove uma resposta imunológica celular, predominantemente, de linfócitos T auxiliares-1 (Th1), havendo a secreção das citocinas interleucina 2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (Constant *et al.*,1997). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> podem ser ativados via interação com as moléculas do complexo de histocompatibilidade maior de classe I (*Major Histocompatibility Complex* – MHC I) ou, ainda, através das citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$  secretadas pelos linfócitos Th1. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, uma vez ativados, induzem a apoptose dos queratinócitos basais e, conseqüentemente, o desenvolvimento das lesões bucais. As citocinas produzidas tanto pelos linfócitos quanto por outros tipos celulares, como os queratinócitos da camada basal destruída, propiciam a cronicidade da resposta inflamatória local (Thornhill, 2001; Sugerman *et al.*, 2002). A figura 1 corresponde à representação esquemática proposta por Lodi *et al.* (2005) acerca da imunopatogênese do LPB.

Sugerman *et al.* (1994) propõem que mecanismos de autoimunidade possam estar envolvidos na etiopatogênese do LPB. Algumas características clínicas desta doença, tais como cronicidade das lesões, predileção por pacientes adultos e do sexo feminino, bem como a presença de clones de linfócitos T autocitotóxicos, sugerem uma possível participação de antígenos-

próprios no desencadeamento de mecanismos de autoimunidade no LPB (Lodi *et al.*, 2005; Sugerman *et al.*, 1994).



**FIGURA 1.** Hipótese para a imunopatogênese do líquen plano bucal (LPB). Células apresentadoras de antígenos (APCs) e queratinócitos da camada basal seriam ativados por infecção viral, produtos bacterianos, trauma mecânico, drogas sistêmicas, sensibilidade por contato ou ainda agentes etiológicos não bem estabelecidos (1). As APCs e queratinócitos ativados secretariam quimiocinas cuja função seria atrair linfócitos que desencadeariam as lesões de LPB. As APCs apresentariam antígenos através do MHC de classe II aos linfócitos CD4<sup>+</sup> (2a). Os queratinócitos da camada basal apresentariam antígenos através do MHC de classe I aos linfócitos CD8<sup>+</sup> (2b). Os linfócitos CD4<sup>+</sup> do tipo Th1 secretariam IL-2 e IFN- $\gamma$  (3a), que se ligariam a seus respectivos receptores localizados nos linfócitos CD8<sup>+</sup> (3b). Os linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>, uma vez ativados, ou expressariam ligante Fas (FasL) ou secretariam granzimas B ou, ainda, estimulariam receptores de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (4) que induziria apoptose nos queratinócitos da camada basal do epitélio (5).

### 4.3. Líquen plano bucal: Resposta imune e Interferon-gama

O sistema imune é responsável por proteger o organismo contra possíveis agressões por via de respostas imunes dos tipos inata e adaptativa. Estas respostas estão intimamente relacionadas na tentativa de manter a homeostasia do organismo (Abba, 2003; King, 2005; Albiger *et al.*, 2007).

A resposta imune inata ocorre através dos receptores tipo Toll (TLRs) com liberação de diversos mediadores que exacerbam o processo inflamatório local e estimulam a migração de diferentes tipos celulares na tentativa de debelar o agente agressor (King, 2005). Entretanto, em determinadas situações, a resposta inata, por si só, é incapaz de eliminar o patógeno agressor, havendo a estimulação da resposta imune adaptativa. Esta, por sua vez, é uma resposta antígeno-específica que possui como principais células efetoras os linfócitos T auxiliares ou *helpers* (CD4<sup>+</sup>) e os linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) que secretam mediadores como citocinas e quimiocinas. Os linfócitos B também são células efetoras da resposta imune adaptativa celular cuja principal função é a produção de anticorpos e desencadeamento da resposta imune humoral (Abba, 2003).

Os linfócitos T ainda sem diferenciação são denominados linfócitos T *naive*. A diferenciação dos linfócitos T *naive* CD4<sup>+</sup> em linfócitos T auxiliares é iniciada pela interação entre os receptores de células T (TCR) e moléculas coestimuladoras às moléculas de MHCII que expressam peptídeos advindos dos antígenos. Este evento, associado à presença de específicas citocinas, permitem a diferenciação das diferentes linhagens de linfócitos T, dentre elas as linhagens de linfócitos Th1 e Th2 (Abba, 2003). As citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12

permitem a diferenciação dos linfócitos em Th1 que, uma vez diferenciados, caracteristicamente secretam grandes quantidades de IFN- $\gamma$ . Portanto, a resposta Th2 é caracterizada pela produção da citocina IL-4 (Korn *et al.*, 2009).

O LPB é descrito como uma desregulação imunológica que envolve uma resposta imune, predominantemente, do tipo Th1, havendo secreção de IFN- $\gamma$  e inflamação crônica nos tecidos (Lodi *et al.*, 2005).

O IFN- $\gamma$  ou interferon do tipo II é uma proteína homodímera, de ação pró-inflamatória produzida, principalmente, pelas células *natural killer* (NK), linfócitos Th1 e linfócitos T citotóxicos (Fayyazi *et al.* 1999; Schoenborn *et al.*, 2007). Esta citocina possui importante função tanto na resposta imune inata quanto adaptativa (Schroder *et al.*, 2004; Schoenborn *et al.*, 2007). Citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$ , possuem um papel fundamental na iniciação e propagação das lesões inflamatórias devido ao seu perfil desencadeador da resposta imunológica (Schroder *et al.*, 2004).

O IFN- $\gamma$  constitui uma das principais citocinas secretadas para que haja o desenvolvimento e progressão das lesões de LPB (Thornhill, 2001; Sugerman *et al.*, 2002).

Vários trabalhos, assim como o estudo de hibridização *in situ* realizado por Fayyazi *et al.* (1999), demonstraram a presença de IFN- $\gamma$  em amostras de LPB. Tao *et al.* (2008) observaram, através de ensaio imunoenzimático (ELISA), que pacientes com LPB erosivo apresentavam elevados níveis de IFN- $\gamma$  em relação ao grupo controle. Tais evidências confirmam a importância do estudo desta citocina no LPB.

O IFN- $\gamma$  coordena diversas funções celulares através da regulação de genes de relevância imunológica. Vários estudos recentes têm demonstrado

que reguladores gênicos denominados microRNAs (miRNA) são importantes na regulação da resposta imune, inclusive por atuarem na regulação do IFN- $\gamma$  (Dai *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2010; Schroder *et al.*, 2004).

#### 4.4. MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) fazem parte de um grande grupo de pequenos RNAs endógenos, não codificadores de proteínas que exibem, aproximadamente, de 18 a 24 nucleotídeos. Estes miRNAs agem impedindo a tradução de RNAs mensageiros (mRNAs) alvos. Desta maneira, são responsáveis pela regulação gênica na fase pós-transcricional (Bartel, 2004; Gartel, 2006; Zhang *et al.*, 2007, Wu *et al.* 2011). Os reais mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica através dos miRNAs ainda não foram completamente estabelecidos. Entretanto, estudos demonstram que essa regulação gênica pode ocorrer devido ao silenciamento de mRNAs causados pela interação parcial dos miRNA a sítios complementares do mRNA, ocorrendo, frequentemente, na região não traduzida 3' (3'UTR). Outro mecanismo proposto é a degradação do mRNA que ocorre devido a uma clivagem direta deste alvo. Esta clivagem se dá através da presença da proteína Argonauta 2 (Ago2) que associada ao complexo de indução de silenciamento de RNA (RISC) pode causar uma completa destruição do mRNA (Osada *et al.*, 2007; Pauley *et al.*, 2009).

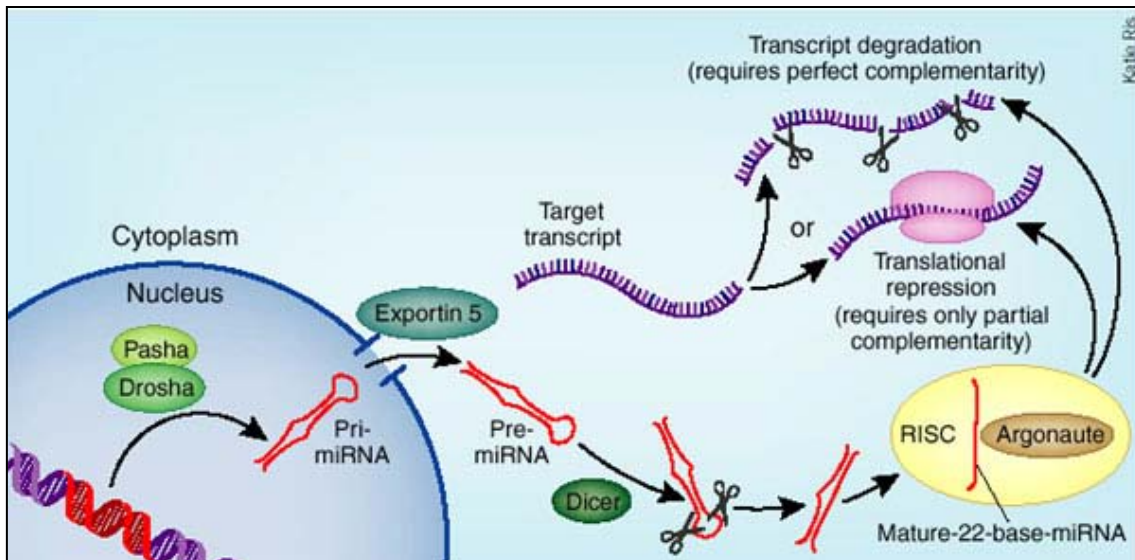
Os primeiros miRNAs descobertos foram identificados em nematódeos da espécie *Caenorhabditis elegans* no ano de 1993 (Ambros *et al.*, 1993; Mack, 2007). Atualmente, 1048 diferentes miRNAs da espécie humana já foram registrados no banco de dados miRBase database (Wu *et al.*, 2011).

Estudos têm demonstrado que os miRNAs possuem importantes atividades biológicas devido sua capacidade de regular de 20 a 30% de todos os genes humanos, sendo que um único miRNA é capaz de regular vários genes (Ambros, 2004; Harfe, 2005; Johnson *et al.*, 2005; Plasterk, 2006; Slack *et al.*, 2006; Loa *et al.*, 2007). Desta maneira, atualmente, um dos maiores desafios é entender as específicas funções biológicas de cada miRNA (Greene, *et al.*, 2010).

Os miRNAs são transcritos inicialmente pela RNA polimerase II (pol II), formando os miRNA primários (pri-miRNAs) que contém várias bases de nucleotídeos em seu comprimento. Esses pri-miRNAs possuem algumas estruturas em forma de alças que são clivadas ainda no núcleo celular pela enzima RNase III endonuclease (Drosha) e seu cofator DGCR8, liberando um miRNA precursor de 60-75 nucleotídeos (pre-miRNA) (Gregory *et al.*, 2005; Haber *et al.*, 2006; Slack *et al.*, 2006; Huppi, K. *et al.*, 2007; Mack, 2007).

O pre-miRNA é exportado para o citoplasma pelo fator nuclear de exportação (exportin-5), sendo, então, processado pela enzima Dicer (RNase III), resultando em um miRNA maduro e de dupla fita, contendo de 18-24 nucleotídeos. Apenas uma das fitas do miRNA maduro é incorporada ao complexo de indução de silenciamento de RNA (RISC), frequentemente, a segunda fita é degradada. Uma vez associados, o complexo miRNA-RISC está apto a desempenhar suas funções de regulação do RNA mensageiro (mRNA) alvo (Bartel, 2004; Garzon *et al.*, 2006; Haber *et al.*, 2006; Huppi *et al.*, 2007).





**FIGURA 2.** Biogênese e regulação gênica pelos microRNAs. O miRNA primário (pri-miRNA) é transcrito a partir de gene específico. Ainda no núcleo da célula, este é processado pela enzima Drosha e exportado para o citoplasma onde, então, é processado pela enzima Dicer. Após a separação da fita dupla de miRNA, uma das fitas se associa ao complexo de silenciamento de RNA (RISC) e reprime a produção de proteínas quer seja por degradação ou silenciamento do RNA mensageiro (mRNA) alvo (Mack, 2007).

As funções biológicas dos miRNAs na imunidade tem sido muito explorado, uma vez que representam um importante alvo para potenciais agentes diagnósticos e terapêuticos (Mack, 2007). Ainda, segundo Lu *et al.*, (2009), os miRNAs possuem importantes funções na diferenciação das linhagens de linfócitos T auxiliares e nas funções desempenhadas por estes linfócitos. A resposta imune mediada por linfócitos T tem sido associada com a expressão de específicos miRNAs, dentre eles o miRNA-146a e miRNA-155. Entretanto, mais estudos são necessários para estabelecer o real papel desempenhado por cada miRNA envolvido nos mecanismos de regulação da resposta imune (Curtale *et al.*, 2010).

#### 4.5. MicroRNA-146a

O miRNA-146a foi identificado como fundamental para regulação da imunidade inata. Estudo em linhagem celular humana de leucemia monocítica aguda (THP1 cells) demonstrou que este miRNA possui função fundamental na sinalização induzida por receptores tipo Toll (TLR). Elevada expressão do miRNA-146a foi observada em resposta a TLR localizados na superfície celular (TLR2, TLR4 e TLR5). O mesmo não foi identificado em TLR de sinalização intracelular (TLR3, TLR7 e TLR9), sugerindo que este miRNA possa estar relacionado a diminuição da resposta inflamatória a patógenos extracelulares, tais como os bacterianos. (Taganov *et al.*, 2006).

Este miRNA-146a possui dois alvos bem estabelecidos que são as proteínas TRAF-6 e IRAK-1. Esta é uma quinase associada ao receptor de interleucina-1 (IL-1) e aquela é um membro da família de fatores associados ao receptor de fator de necrose tumoral (TNF). Ambas são componentes da resposta inata e estão relacionadas ao TLR-4 (Pauley *et al.*, 2009).

Alguns estudos demonstram que o miRNA-146a também está envolvido na diferenciação dos linfócitos T auxiliares. Lu *et al.*, (2010) propuseram que este miRNA, em linfócitos T regulatórios (T<sub>reg</sub>), possa estar diminuindo o fator de transcrição STAT1, transdutor de sinal e ativador de transcrição 1, que é um fator de transcrição requerido para diferenciação de células T *naive* em células Th1.

Entretanto, Monticelli *et al.* (2005) propuseram que o miRNA-146a possui função de diferenciação de linfócitos T *naive* em linfócitos Th1 efetores, em células hematopoiéticas de animais da família de murinos. Desta maneira, mais estudos são necessários para definir a real função deste miRNA na

diferenciação dos linfócitos auxiliares.

#### 4.6. MicroRNA-155

O miRNA-155 é transcrito a partir do gene *MIR-155*, que está localizado no cromossomo humano 21q21.3. Este miRNA origina-se a partir do processamento de um RNA não codificador de proteína (pri-miRNA), denominado BIC (Kutty *et al.*, 2010). O miRNA-155 parece ser indispensável para uma resposta imunológica inata e adaptativa normal.

Rodriguez *et al.* (2007) demonstraram que ratos, com deficiência do miRNA-155, exibem células dendríticas com falhas na capacidade de apresentação de antígenos aos linfócitos T.

Sonkoly *et al.* (2010) verificaram que o miRNA-155 encontra-se aumentado em estudo com pacientes com dermatite atópica - doença inflamatória crônica que causa afecções na pele. Neste mesmo estudo, foi proposto que o miRNA-155 possua como alvo direto a proteína CTLA-4 que é o antígeno 4 associado aos linfócitos T citotóxicos cuja função é regular negativamente a proliferação de linfócitos T. Outro provável alvo do miRNA-155 é a proteína supressora de sinalização de citocina 1 (SOCS1) que regula negativamente a cascata de IL-2 em linfócitos T<sub>reg</sub>. É importante salientar que a citocina IL-2 faz-se importante para a homeostasia de linfócitos T<sub>reg</sub> (Lu *et al.*, 2009). Finalmente, tem sido relatado que *bic*/miRNA-155 module negativamente os níveis do fator de transcrição *c-Maf* em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, sendo este um evento que contribuiria para a atenuação da resposta Th2 em vivo, demonstrando que o miRNA-155 favoreceria uma resposta imune do tipo Th1 (Rodriguez *et al.*, 2007).

## **OBJETIVOS**

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo geral

- Avaliar a expressão dos miRNA-146a e miRNA-155 em amostras de LPB.

### 5.2. Objetivos específicos

- Verificar a possível correlação entre a expressão de ambos os miRNAs, miRNA-146a e miRNA-155, nas amostras de LPB.
- Avaliar a expressão dos miRNA-146a e miRNA-155 em amostras de LPB, comparativamente, à mucosa normal.
- Correlacionar a expressão dos miRNA-146a e miRNA-155 aos níveis da citocina IFN- $\gamma$ .
- Investigar relação entre a expressão dos miRNA-146a e miRNA-155 e os parâmetros clínicos da doença.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. Caracterização das amostras

Foram selecionados dois grupos amostrais com as seguintes características:

- **Grupo controle:** coletaram-se 6 fragmentos de mucosa bucal normal a partir de exodontias de terceiros molares totalmente inclusos realizadas no bloco cirúrgico da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Nenhum destes pacientes relatou história atual ou pregressa de lesões mucocutâneas características de LP. Os fragmentos de tecido coletados foram seccionados em duas partes, sendo a primeira acondicionada em formaldeído 10% para exame histopatológico e confirmação da ausência de inflamação e a segunda armazenada em *RNAholder (BioAgency)* e mantido a -80 °C até os ensaios. A tabela 2 caracteriza as amostras normais incluídas neste estudo.

- **Grupo caso:** coletaram-se 31 amostras de pacientes diagnosticados clínico e histologicamente com LPB, independente da variante clínica da doença (casos: 17 reticular, 10 em placa e 4 erosivo). Todos pacientes selecionados relataram ter lesões de LPB isoladamente. A idade média destes pacientes é 49,26 anos, variando de 26 a 92 anos. A proporção homem/mulher é 0,24. Estes pacientes foram atendidos e submetidos à biópsia com finalidade diagnóstica na Clínica de Semiologia e Patologia Bucal – UFMG. A tabela 1 caracteriza as amostras de LPB incluídas neste estudo.

Os tecidos, logo após serem biopsiados, foram divididos em três fragmentos. O primeiro fragmento foi acondicionado em formaldeído a 10% para processamento de rotina e confirmação do diagnóstico. O outro foi armazenado em RNAholder (*BioAgency*) e mantido congelado a -80°C até a extração do RNA, e o último foi congelado *in natura* a -80°C até os ensaios imunoenzimáticos (ELISA). É importante ressaltar que devido à dificuldade de coletar fragmentos com quantidade considerável de tecido, o teste de ELISA não foi realizado em todas as amostras de LPB. Foram utilizadas apenas 7 amostras de LPB para esse ensaio.

Todos os pacientes com LPB incluídos neste estudo também responderam a um questionário (Anexo B) cuja finalidade é a realização de um estadiamento da doença e obtenção de dados acerca das condições sistêmicas dos mesmos.

## **6.2. Aspectos Éticos**

Esta pesquisa foi submetida à apreciação e aprovação, primeiramente, à Câmara do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas da Faculdade de Odontologia – UFMG e, em seguida, ao Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG (COEP/UFMG), obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS nº 196/96 e 304/00 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, parecer nº ETIC 0228.0.203.000-10 (Anexo D). Todos os participantes da pesquisa foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e foi solicitada a assinatura, de livre e espontânea vontade, de um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos C.1 e C.2).



A pesquisa foi executada de acordo com os princípios éticos em pesquisas que envolvem seres humanos, seguindo-se a declaração de *Helsinki* da Associação Médica Mundial (*World Medical Association Declaration of Helsinki*, version – 2002/ [www.wma.net/e/policy/b3.htm](http://www.wma.net/e/policy/b3.htm))

**TABELA 1.** Características clínicas dos pacientes com líquen plano bucal incluídos neste estudo.

<b>Amostra</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (Anos)</b>	<b>Variante clínica</b>
1	M	71	Placa
2	M	55	Reticular
3	F	58	Placa
4	F	41	Placa
5	F	48	Reticular
6	F	61	Placa
7	F	57	Reticular
8	F	52	Reticular
9	M	38	Placa
10	M	43	Reticular
11	F	81	Placa
12	F	35	Reticular
13	F	92	Reticular
14	F	41	Reticular
15	F	40	Placa
16	F	33	Reticular
17	F	42	Reticular
18	F	43	Reticular
19	M	48	Reticular
20	F	36	Placa
21	M	53	Reticular
22	F	56	Placa
23	F	52	Placa
24	F	33	Reticular
25	F	62	Erosivo
26	F	30	Erosivo
27	F	50	Erosivo
28	F	51	Reticular
29	F	26	Reticular
30	F	49	Erosivo
31	F	50	Reticular

M=masculino, F=feminino

**TABELA 2.** Características clínicas dos pacientes normais incluídos neste estudo.

Amostra	Sexo	Idade (Anos)
1N	F	20
2N	M	18
3N	F	19
4N	F	24
5N	F	19
6N	M	25

M=masculino, F=feminino

### 6.3. Seleção dos miRNAs

Inicialmente, foi realizado um levantamento na literatura sobre os principais miRNAs relacionados à resposta inflamatória, à citocina IFN- $\gamma$  e às alterações da resposta imune, pois são eventos relacionados ao desenvolvimento do LPB (Chan *et al.*, 2009). Simultaneamente, realizou-se uma busca em periódicos sobre os principais miRNAs, descritos para humanos, envolvidos com resposta imune e, por conseguinte, relacionados ao IFN- $\gamma$ , seguido de uma busca no banco de dados miRBase: *sequences release 12.0* (<http://microrna.sanger.ac.uk>).

Em seguida, cruzamos estas informações através de consulta a outro banco de dados, TargetScan 4.0 (<http://www.targetscan.org>). Após estas etapas, foram selecionados os miRNA-146a e miRNA-155.

Foi realizado um estudo do tipo transversal experimental para avaliar a expressão de cada um destes miRNAs em amostras de tecido de LPB e mucosa bucal normal, utilizando a técnica de PCR em Tempo Real quantitativo (qRT-PCR). A citocina IFN- $\gamma$  foi dosada por teste ELISA também a partir de amostras de LPB.

#### 6.4. Extração de RNA

A extração de RNA total foi realizada segundo o protocolo recomendado pelo fabricante do reagente TRIzol<sup>®</sup> (*Invitrogen Life Technologies, Inc.*, Carlsbad, CA, USA), seguida de armazenamento à temperatura de -80°C.

As amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro BioSpec-mini (*Shimadzu*<sup>®</sup>) cuja pureza considerada foi de 1,9 a 2,0 (leitura 260/280 nm) (Bandrés *et al.*, 2006). A integridade dos RNAs obtidos foi avaliada através de eletroforese por meio de gel de poliacrilamida 15%, utilizando-se 1µg de cada RNA extraído. Posteriormente, o gel foi revelado em solução brometo de etídio e analisado em transluminador de UV. Foram observadas duas bandas distintas representando o RNA ribossomal 28S e 18S, confirmando a integridade e qualidade do RNA (Anexo E).

#### 6.5. Transcrição reversa

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA extraído das amostras, via transcrição reversa utilizando um kit específico para cada microRNA (*TaqMan MicroRNA RT*, *Applied Biosystems Foster City, CA*)

Foram utilizados RT *primers* para cada microRNA estudado, permitindo a conversão somente do fragmento específico correspondente aos microRNAs de interesse.

Esse método se baseia na utilização de um *primer* com estrutura do tipo *stem-loop*. Essa conformação é para solucionar um ponto crítico em relação à detecção do miRNA maduro, que é o seu pequeno tamanho. O *stem-loop* do *primer* possui uma especificidade para apenas o miRNA maduro permitindo a

formação de uma junção *primer-miRNA*, estendendo a extremidade 5' do miRNA. Esse processo resulta em um amplicon maior, permitindo o uso de um método de detecção *TaqMan Assay*<sup>TM</sup> que permite quantificar a expressão do miRNA por PCR em Tempo Real quantitativo. Além disso, o fato de o *TaqMan Assay*<sup>TM</sup> possuir dois *primers* e uma sonda para PCR faz também com que o ensaio seja altamente específico, sendo capaz de distinguir miRNAs com alta similaridade entre si, até mesmo quando há diferenças de apenas uma base entre eles. As condições de reação utilizadas para a transcrição reversa foram 16°C por 30 minutos (desnaturação), 42°C por 30 minutos (anelamento *primers*), 85°C por 5 minutos (extensão), com volume final de reação de 15 µL. Foi utilizado 10 ng de RNA para cada reação.

#### **6.6. PCR em Tempo Real quantitativo (qRT-PCR)**

O cDNA convertido foi submetido ao método de PCR em Tempo Real quantitativo (*Quantitative Reverse Transcription PCR* - qRT-PCR), utilizando o sistema de detecção *TaqMan Assay*<sup>TM</sup> para quantificar a expressão de cada miRNA-146a e miRNA-155.

As condições de reação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 minutos, 60°C por 1 minuto (40 ciclos), para volume final de reação de 20 µL. Todo o estudo foi realizado em duplicata.

#### **6.7. Escolha do endógeno**

Para a escolha do endógeno foram testados dois miRNAs (U47, RNU48) que apresentam expressão regular em diferentes tecidos sugeridos pela

*Applied Biosystems.*

Foi realizado um teste em três amostras de LPB e três amostras de mucosa bucal saudável e uma amostra de hiperplasia fibrosa inflamatória.

As amostras foram submetidas ao mesmo processo de extração de RNA e transcrição reversa, e então realizado o PCR em Tempo Real quantitativo para verificação da cinética de amplificação dos miRNAs endógenos nos diferentes tecidos. O miRNA U47 foi escolhido como endógeno por apresentar uma amplificação regular e semelhante nas diferentes amostras.

#### **6.8. Teste da eficiência**

Após a seleção do endógeno, verificamos a eficiência de amplificação do endógeno em relação aos miRNAs alvos estudados. Para se obter a eficiência de amplificação foi utilizado o valor de *slope* que corresponde à inclinação da reta do gráfico obtido pelo qRT-PCR, passando por diferentes pontos de diluição, sendo o valor ideal igual a -3,33 e o valor de  $R^2$  que deve ser aproximadamente 0,99. O valor de eficiência tem que variar entre 88 e 105%.

Foram realizadas diluições seriadas de uma solução estoque com concentração conhecida, com duas séries com 5 pontos, diluídos 2 vezes (100ng - 50ng - 25 ng - 12,5 ng - 6,25 ng) e diluídos 10 vezes (100 ng - 10 ng - 0,1 ng - 0,01 ng - 0,001 ng) e a variação de Ct (*Threshold cycle* - limiar de detecção a cada ciclo de amplificação) esperada foi de 1 e 3,3; respectivamente, de acordo com a seguinte fórmula  $2^n = \text{fold dilution}$  (onde: *2-fold dilution series: n=1* e *10-fold dilution series: n=3,3*). Analisando o resultado obtido chegamos à concentração ideal de 10 ng no qual a eficiência do controle (endógeno) e dos miRNAs alvos foi próximo de 100%.

### 6.9. Quantificação do miRNA

Para a detecção da expressão do miRNA foi utilizado o *Step-One Real-time PCR 48-well plate (Applied Biosystems)* através da quantificação relativa pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e os resultados apresentados em  $\text{Log}_{10}$  (Livak & Schmittgen, 2001) para os miRNA-146a e miRNA-155 analisados (*TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assays, Applied Biosystem*).

A reação foi realizada utilizando *TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)* e as condições de reação foram seguidas segundo recomendações do fabricante, como descrito anteriormente. A expressão de cada miRNA foi normalizada com o endógeno U47. Com o valor de Ct normalizado foi realizada em comparação ao calibrador escolhido, de acordo com a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . O calibrador foi composto por um mistura de 3 amostras de sangue coletadas de pacientes voluntários saudáveis que não apresentava nenhum tipo de alteração clinicamente detectável.

O método Ct comparativo ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) é um método de quantificação relativa que descreve a mudança na expressão de um gene alvo em um grupo de amostra estudada, normalizada com um gene constitutivo, comparado com um grupo de referência (*Applied Biosystems User Bulletin Nº2 – P/N 4303859*).

Análises utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  têm sido amplamente utilizadas em estudos de expressão gênica (Livak & Schmittgen, 2001).

### 6.10. Teste imunoenzimático - ELISA

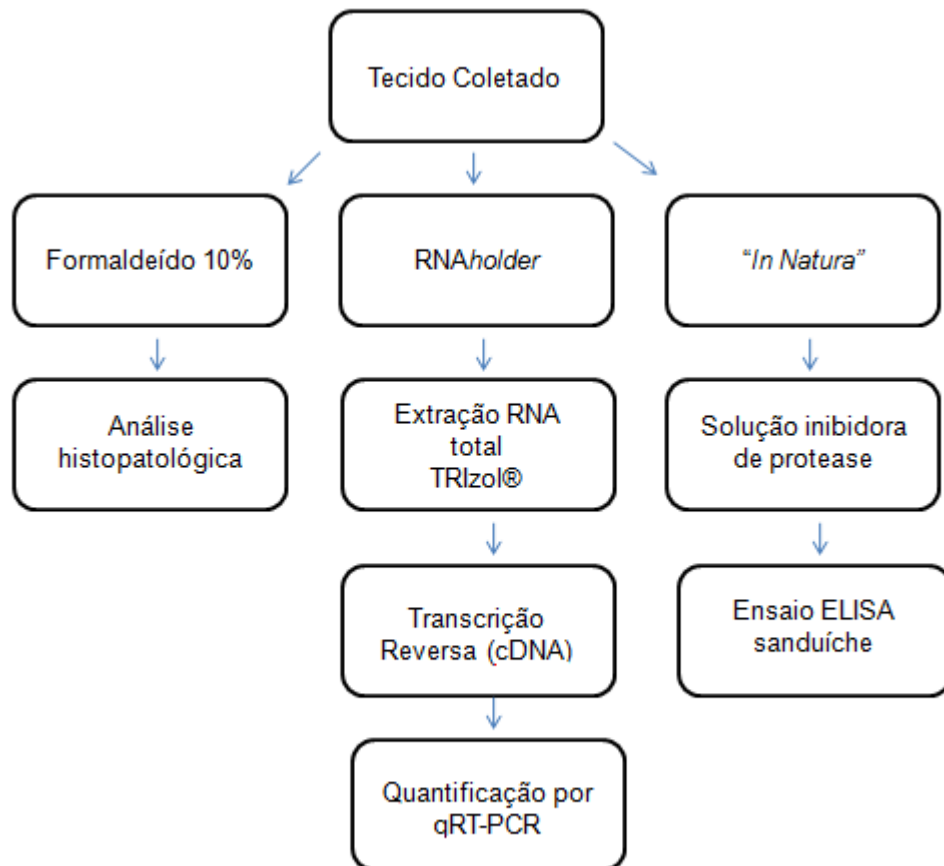
Para a realização do ensaio de ELISA as amostras de tecido congelados

*in natura* foram pesadas e, em seguida, adicionadas a uma solução inibidora de protease (0,1 mM PMSF; 0,1 mM cloreto de benzetonio; 10 mM EDTA; 0,01 mg/mL aprotinina A) e 0.05% Tween-20 na proporção de 1000  $\mu$ L (tampão) para cada 100  $\mu$ g<sub>(tecido)</sub>. A dosagem da citocina IFN- $\gamma$  foi realizada pela técnica de ELISA sanduíche, descrita por Ondrey *et al.* (1999), utilizando o kit *Human IFN-gamma DuoSet* (DY285) R&D. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as especificações do fabricante.

### **6.11. Análise estatística dos resultados**

A análise estatística foi realizada após tabulação dos dados, utilizando métodos não-paramétricos de análise, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis testes e coeficiente de correlação de Spearman, usando o programa BioEstat 4.0 software (Belém, Brasil). Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### 6.12. Fluxograma dos ensaios



**FIGURA 3.** Fluxograma dos experimentos realizados

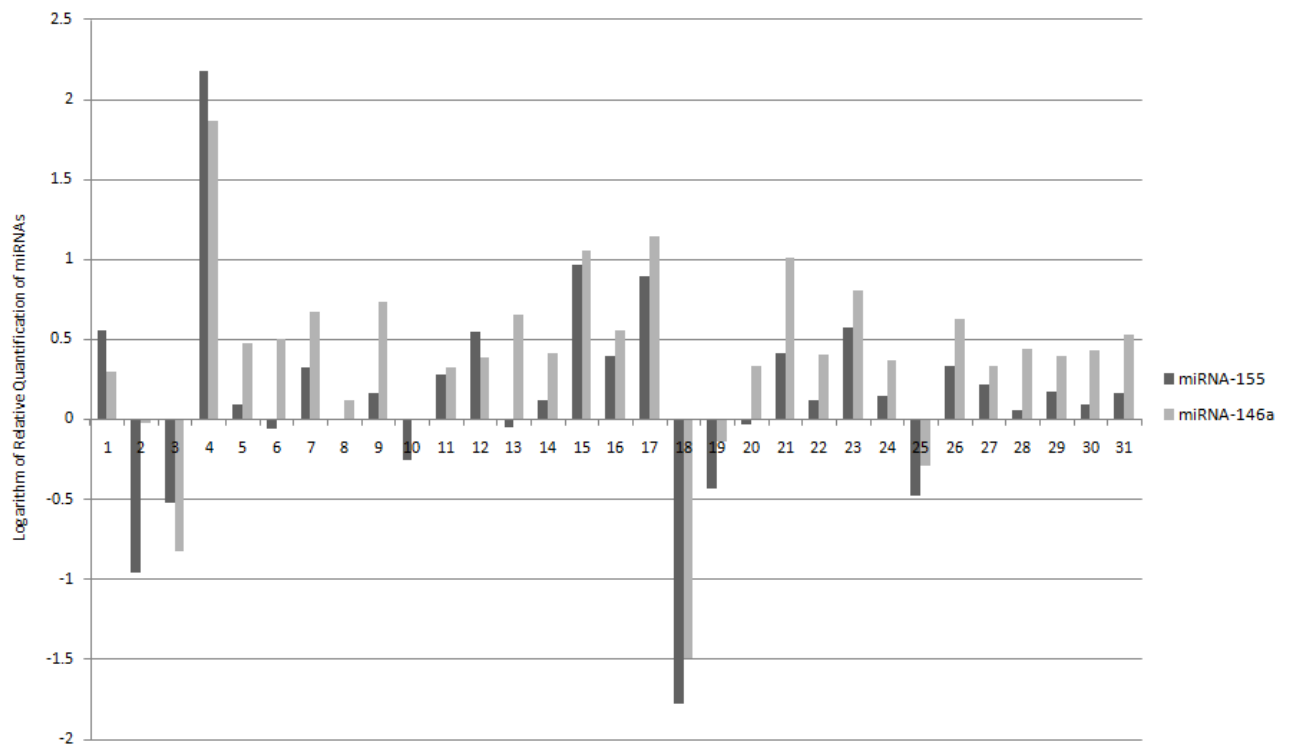


## **RESULTADOS**

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Quantificação Relativa (RQ) dos miRNA-146a e miRNA-155

No gráfico 1 observam-se os níveis de expressão dos miRNA-146a e miRNA-155 nas amostras de LPB (n=31), em relação ao calibrador - amostras de sangue de pacientes normais (abscissa). Foi observado que a maioria das amostras de LPB (67,7%) exibiram expressão aumentada, de ambos os miRNA-146a e miRNA-155 avaliados, em relação ao calibrador.

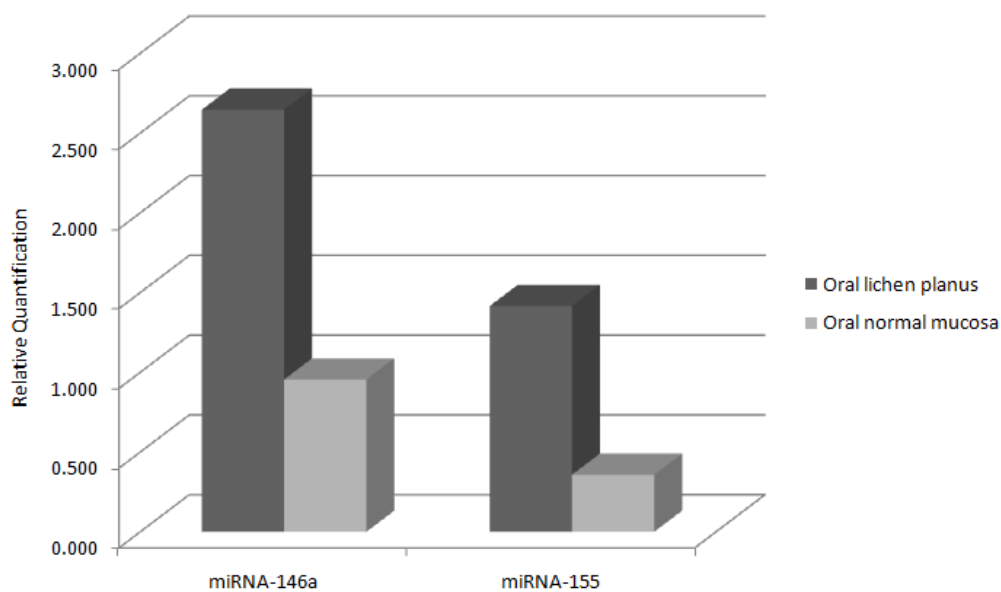


**GRÁFICO 1.** Expressão do miRNA-146a e miRNA-155 em líquen plano bucal. Quantificação relativa (RQ) do miRNA-146a e miRNA-155 normalizada pelo endógeno U47 em relação ao calibrador (eixo X) em amostras de líquen plano bucal (n = 31).

## 7.2. Correlação entre a quantificação relativa (RQ) do miRNA-146a e miRNA-155

Verificou-se forte correlação entre as RQ dos miRNAs analisados, pelo coeficiente de correlação de Spearman=0,699 e  $p < 0,0001$ .

## 7.3. Quantificação relativa (RQ) dos miRNA-146a e miRNA-155 em amostras de líquen plano bucal (LPB) em relação a amostras de mucosa bucal normal



**GRÁFICO 2.** Quantificação relativa (RQ) do miRNA-146a e miRNA-155 em líquen plano bucal e mucosa normal. A quantificação relativa do miRNA-146a e miRNA-155 em líquen plano bucal foi maior que em mucosa normal (Teste Mann-Whitney,  $p = 0,0120$  e  $p = 0,0031$ , respectivamente).

Todas as amostras de LPB ( $n=31$ ) exibiram maior quantificação relativa

(RQ) dos miRNA-146a e miRNA-155 em relação às amostras de mucosa bucal normal (n=6). Resultado estatisticamente significativo foi obtido com  $p=0,0120$  e  $p=0,0031$ , respectivamente, pelo teste Mann-Whitney.

#### 7.4. Correlação entre os a quantificação relativa (RQ) dos miRNA-146a e miRNA-155 e a dosagem da citocina IFN- $\gamma$

A tabela 3 mostra cada amostra de LPB submetida ao ensaio de ELISA (n=7), com suas respectivas dosagens de IFN- $\gamma$  e valores de RQ de cada miRNA analisado.

**Tabela 3.** Níveis de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e quantificação relativa do miRNA-146a e miRNA-155 em amostras de líquen plano bucal

Amostras LPB	IFN- $\gamma$ nível (pg/mL)	RQ miRNA-146a	RQ miRNA-155
#23	186,89	6,433	3,714
#24	83,81	2,332	1,392
#25	116,39	0,513	0,331
#26	210,711	4,247	2,165
#27	119,996	2,157	1,639
#28	270,913	2,746	1,131
#29	35,08	2,471	1,471

RQ= quantificação relativa; pg/mL=picograma por mililitro.

Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre a RQ dos miRNA146a e miRNA-155 e os níveis de IFN- $\gamma$  dentre as amostras analisadas ( $p=0,2151$  e  $p=0,2143$ , respectivamente. Correlação de Spearman).

### **7.5. Correlação entre a quantificação relativa dos miRNA-146a e miRNA-155 e parâmetros clínicos**

Não foram observados resultados estatisticamente significativos entre os parâmetros clínicos, tais como as diferentes variantes clínicas do LPB e sexo dos pacientes, em relação à RQ de ambos os miRNAs analisados. (Testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis).

## **DISCUSSÃO**

## 8. DISCUSSÃO

A compreensão da etiologia e patogênese do LPB ainda é um desafio para pesquisas na área de Patologia Bucal. Embora, prováveis causas para a doença tenham sido propostas, até o presente momento, nenhuma pôde ser confirmada. Isto demonstra a complexidade dos mecanismos envolvidos na desregulação imune que desencadeia as lesões.

Os miRNAs representam um importante grupo de reguladores gênicos que desempenham importantes funções biológicas, inclusive para a regulação da resposta imune (Mack, 2007). É descrito que alguns deles atuem tanto na diferenciação das células hematopoiéticas (Chen *et al.*, 2004) quanto na diferenciação das linhagens de linfócitos T auxiliares, bem como, nas funções desempenhadas por estes linfócitos (Lu *et al.*, 2009). O miRNA-146a e o miRNA-155 mostram-se indispensáveis para uma resposta imune normal (Kutty *et al.*, 2010), sendo assim importantes alvos de estudo no LPB.

Neste presente trabalho, observamos que cerca de 67,7% das amostras de LPB exibiram maior expressão tanto do miRNA-146a, quanto do miRNA-155, comparativamente, às amostras de sangue de pacientes normais. Forte correlação também foi observada entre a expressão destes miRNAs. Além disso, todas as amostras de LPB exibiram maior expressão de ambos os miRNA, em relação à mucosa normal. Desta maneira, estes dados sugerem uma possível participação destes miRNAs na patogênese da doença.

Resultados semelhantes são observados na literatura em relação a outras lesões também desencadeadas por algum tipo de desregulação imunológica. Tang *et al.* (2009) demonstraram que o miRNA-146a está aumentado em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Pauley *et al.* (2008)

verificaram que o mesmo acontece em pacientes com artrite reumatóide. Elevada expressão do miRNA-155 também é observada em pacientes com dermatite atópica (Sonkoly *et al.*, 2010). Vários trabalhos de revisão de literatura apontam o miRNA-146a e o miRNA-155 como tendo estreita relação durante a regulação da resposta imune (Sonkoly *et al.*, 2008; Pauley *et al.*, 2009). O miRNA-146a, tem sido descrito como relacionado à criação de um *feedback* negativo na resposta imune frente a patógenos extracelulares (Taganov *et al.*, 2006). Além disso, também é relatado que ele tenha dois alvos diretos, IRAK-1 e TRAF-6, ambos, relacionados à resposta imune inata, por controlarem a sinalização de TLR4 (sinalizador de superfície celular). Portanto, se extrapolarmos os achados de nosso trabalho, seria possível especularmos que os receptores do tipo Toll de superfície, uma vez ativados, induziriam a transcrição do miRNA-146a no LPB com o intuito de regular o desencadeamento da resposta imune local. Diversos estudos tentam encontrar o antígeno desencadeador da resposta imune no LPB.

O LPB é descrito como uma doença inflamatória crônica, caracterizada por um desequilíbrio imunológico que leva à exacerbação da resposta Th1 e, conseqüentemente, secreção de IFN- $\gamma$  (Lodi *et al.*, 2005). Vários mecanismos tem sido propostos na tentativa de explicar a participação dos miRNA-146a e miRNA-155 na diferenciação das linhagens de linfócitos T auxiliares. A literatura ainda é controversa com relação ao real papel desempenhado pelo miRNA-146a na diferenciação de uma resposta Th1/Th2. Segundo Lu *et al.* (2010), este miRNA reduz o fator de transcrição STAT1, em linfócitos T<sub>reg</sub> e, conseqüentemente, diminui a resposta do tipo Th1. Entretanto, Monticelli *et al.* (2005), em estudo com células hematopoiéticas de murinos, propuseram que o



miRNA-146a possui função de diferenciação de linfócitos T *naive* em linfócitos Th1 efetores. Sendo assim, novos estudos são necessários para estabelecer a real função desempenhada pelo miRNA-146a na diferenciação de linfócitos T auxiliares.

O miRNA-155 parece estar relacionado a diferenciação de linfócitos Th1. Segundo Rodriguez *et al.* (2007) o miRNA-155 tem como alvo direto o fator de transcrição *c-Maf*, em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Esta proteína *c-Maf* é imprescindível para desencadeamento da resposta imune do tipo Th2. Desta maneira, seria possível especularmos que o aumento da expressão do miRNA-155 no LPB poderia contribuir para o predomínio da resposta Th1 na doença, em resposta a antígenos ainda não conhecidos. Contudo, é necessário enfatizar que apenas um estudo funcional conseguiria afirmar ao certo qual o papel do miRNA-146a e do miRNA-155 na diferenciação de linfócitos T no LPB.

Neste estudo, não foi observada correlação estatisticamente significativa entre expressão dos miRNAs e os parâmetros clínicos do LPB. Também não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre os níveis da citocina IFN- $\gamma$  e a quantificação relativa de ambos os miRNAs. Estes resultados, talvez, devam-se ao pequeno número de amostras de LPB utilizadas, principalmente, para a dosagem por ELISA. Devemos ainda considerar a hipótese de que a regulação desempenhada pelos miRNAs sobre o IFN- $\gamma$  seja indireta, conforme citado por Lu *et al.* (2009). Eles propõem que o miRNA-155 atue diretamente sobre a proteína SOCS1, causando-lhe diminuição e, indiretamente, induza aumento nas citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$ , pois a proteína SOCS1 age como regulador negativo de ambas as citocinas citadas. Outro dado de grande relevância é a avaliação da real consequência de

atuação do miRNAs sobre os níveis das proteínas. Baek *et al.* (2008) propõem que embora o miRNAs atuem na repressão pós-transcricional de alguns genes, são pequenas as mudanças detectáveis ao nível protéico, afirmando que o papel dos miRNAs seria, principalmente, na regulação de ajustes mais sutis na produção de proteínas.

Nossos achados sugerem uma possível participação dos miRNA-146a e miRNA-155 no desenvolvimento das lesões de LPB. Entretanto, estudos futuros são necessários para avaliar o reais significado destes miRNAs na etiopatogênese desta doença.

## **CONCLUSÕES**

## 9. CONCLUSÕES

Observamos elevadas expressões do miRNA-146a e do miRNA-155 nas amostras de LPB, comparativamente às amostras de mucosa normal. Também, ambos os miRNAs avaliados, estavam aumentados, na grande maioria das amostras de LPB, comparativamente às amostras de sangue periférico de pacientes saudáveis.

Identificamos forte correlação entre ambos os miRNAs, miRNA-146a e do miRNA-155, avaliados na doença.

Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre a expressão dos miRNAs e os níveis de IFN- $\gamma$ .

Também, não foi observada correlação estatisticamente significativa entre a expressão dos miRNAs e os parâmetros clínicos do LPB.

Desta maneira, estudos futuros são necessários para avaliar o real significado representado pelo aumento da expressão do miRNA-146a e miRNA-155 na etiopatogênese do LPB.

**ANEXOS**

## **ANEXO A**

### **Artigo**

#### **Increased miRNA-146a and miRNA-155 expressions in oral lichen planus**

Telma Cristina Arão <sup>1</sup>, André Luiz Sena Guimarães <sup>2</sup>, Alfredo Maurício Batista de Paula <sup>2</sup>, Carolina Cavaliéri Gomes <sup>3</sup>, Ricardo Santiago Gomez <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup> School of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

Correspondence: Professor Ricardo S. Gomez, Laboratório de Biologia Molecular, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Pampulha, CEP 31.270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; Tel: 55 31 3409 2477; Fax: 55 31 3409 2430; E-mail: rsgomez@ufmg.br

**ABSTRACT**

Oral lichen planus (OLP) is a chronic inflammatory disease T helper 1 lymphocytes (Th1)-mediated. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) plays a central role in local immune response in this disease. MicroRNAs (miRNAs) are endogenously expressed non-coding RNAs that have important biological and pathological functions due to their potential mechanism regulating gene expression. Recently, some studies have demonstrated that miRNA-146a and miRNA-155 participate in immune response regulation, and are important in several chronic inflammatory and autoimmune diseases. The purpose of the present study was to investigate the expression of the miRNA-146a and miRNA-155 in 31 OLP lesions compared to normal oral mucosa and blood samples. Quantitative real-time polymerase chain reaction was used to analyze miRNA expressions. Our results showed increased expression of miRNA-146a and miRNA-155 in OLP lesions. In conclusion, this data highlights the possibility of miRNA-146a and miRNA-155 involvement in the regulation of the immune response in OLP.

Keywords: auto-immune diseases, mir-146a; mir-155; oral lichen planus, microRNAs, miRNAs.

## INTRODUCTION

Lichen planus (LP) is a chronic inflammatory disease affecting the skin, scalp, nails, and mucosae [15]. Oral lichen planus (OLP) affects the oral mucosa with a variety of clinical presentations, including reticular, plaque-like, and ulcerative lesions (erosive). This disease affects 0.1 – 4.0% of the adult population and is more common among women [10,27]. OLP is characterized histologically by a dense subepithelial lymphocytic infiltrate, degeneration of basal keratinocytes, and basement membrane disruption [22].

Although the etiology and mechanisms of OLP pathogenesis have not been fully discovered, it has already been demonstrated that a complex cytokine network is important for the exacerbation and perpetuation of the disease. The inflammatory response in OLP is characterized by the exacerbation inflammatory response of CD4<sup>+</sup> T helper 1 lymphocytes (Th1) and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes (CTLs) representing a delayed-type hypersensitivity reaction to an as-yet-undetermined antigen [22]. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) is an important cytokine in the regulation of local immune response in OLP [10]. It is also a potent pro-inflammatory cytokine regarded as the signature cytokine of Th1 cells and has been extensively studied in several other chronic inflammatory disease [1,13,19,28].

microRNAs (miRNAs) are 20–22-nucleotide-long, non-coding RNA molecules whose function is the post-transcriptional regulation of certain subsets of messenger RNAs (mRNAs) through imperfect binding to the 3' untranslated region (UTR), thus targeting them for degradation or translational repression [16]. Given that miRNAs appear to constitute one of the largest



classes of gene regulatory molecules, understanding their mode of action and their physiological roles is essential. Recently, it has become evident that miRNAs play an important role in regulating immune response as well as in immune cell development [5,12,20,23]. It has been suggested that over- or underexpression of miRNAs may induce deregulation of specific mRNAs. These factors may affect human immune response and then result in many pathogenic disorders [8].

miRNA-146a and miRNA-155 influence immune regulation, including the signaling pathways mediated by kinases and transcription factors [6,20]. Monticelli *et al.* [12] reported miRNA expression patterns in diverse murine hematopoietic cell types exposed to conditions of Th1 and Th2 differentiation. miRNA-146a was notably upregulated in Th1 but not in Th2 cells. They proposed that miRNA-146a might have a function in the differentiation of naïve T cells into Th1 effector cells. However, Lu *et al.* [11] proposed that miRNA-146a decreases IFN- $\gamma$ -mediated Th1 response in regulatory T cells (T<sub>reg</sub>).

miRNA-155 is encoded by the *MIR-155* gene, which is localized to the human chromosome band 21q21.3. This miRNA is processed from an exon of the noncoding RNA known as BIC [7]. Inflammatory mediators such as lipopolysaccharides (LPSs), TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  can induce the expression of miRNA-155 in macrophages [14,25]. Also, it has been demonstrated that *bic*/miRNA-155 modulates the levels of the transcription factor *c-Maf* in CD4<sup>+</sup> T cells, and this is likely to contribute to the attenuation of Th2 cell responses in vivo [18].

Considering that increased Th1 response is reported in OLP lesions, together with the fact that miRNA-146a and miRNA-155 favors such response,

the purpose of the present study was to investigate the expression of these miRNAs in OLP comparing to normal oral mucosa and blood samples.

## **METHODS**

All the patients and control subjects had attended the Dentistry School of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. The experiments were undertaken according to ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (<http://wma.net/e/policy/b3.htm>)<sup>[29]</sup> and were approved by the ethical committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 0228.0.203.000-10). All participating subjects gave their informed consent.

Table 1 displays the case group. The case group comprised 31 patients (mean age, 49.26 years; range, 26–92; female to male ratio 4.16) with clinical and histopathological features of OLP, according to criteria previously described [15,26]. Among the OLP samples, 17 cases were reticular, 4 were erosive, and 10 were plaque-like lesions. The control group comprised 6 healthy volunteers (5 women/1 man) without history or clinical features of mucocutaneous lichen planus or any other oral lesion. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from blood from healthy volunteers (3 women/1 man) and used as a calibrator pool in the quantitative real time PCR reactions.

Oral mucosa samples were collected during incisional biopsy procedures (case group) and after surgical removal of impacted third molars (control group). They were immediately placed in RNAHolder (BioAgency Biotecnologia, SP, Brazil) and stored at -80°C for posterior total RNA extraction. A second part of each sample was formalin fixed and paraffin embedded to confirm diagnosis.

### *RNA extraction and reverse transcription*

Total RNA was extracted using TRIzol® Reagent (Invitrogen, Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. The concentration of total RNA was determined by spectrophotometry, and the integrity of RNA was analyzed by electrophoresis on a 15% polyacrylamide gel, stained with ethidium bromide.

cDNA was synthesized from 10 ng of total RNA using gene-specific stem-loop primers to each miRNA [4] (TaqMan MicroRNA RT, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The conditions used were 30 min at 16°C, 30 min at 42°C, and 5 min at 85°C.

### *Quantitative real-time polymerase chain reaction*

The analyses of miRNA expressions were performed using TaqMan MicroRNA Assay and individual TaqMan MicroRNA Assays (TaqMan MicroRNA Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for miRNA-146a and miRNA-155 in a Step-One Real Time PCR 48-well optical plate at 95°C for 10 min, followed by 15 s at 95°C, and 1 min at 60°C for 40 cycles

miRNA-155 and miRNA-146a expression was normalized to endogenous miRNA-U47 (TaqMan Micro RNA Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as internal control. The average threshold cycle (Ct) for two replicates per sample was used to calculate  $\Delta Ct$ . Relative quantification of these genes expression was calculated with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [9]. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy volunteers was used as a calibrator of the reactions and normal oral mucosa was included as a control group.

### *Statistical analyses*

Statistical analyses of data were performed using the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests and Spearman's rank-correlation coefficient, using the BioEstat 4.0 software (Belém, Brazil). A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

## **RESULTS**

Most of the samples of OLP (67.7%) showed increased expression of both miRNA-146a and miRNA-155 compared to the calibrator (PBMC). A positive correlation between miRNA-146a and miRNA-155 expression was observed ( $p < 0.0001$ ; Spearman's correlation coefficient = 0.699) (Figure 1). The relative quantification of miRNA-146a and miRNA-155 in OLP was higher than in normal oral mucosa in all samples ( $p = 0.0120$  and  $p = 0.0031$ , respectively) (Figure 2). The expression of miRNA-146a and miRNA-155 was not associated with the different clinical presentations of OLP (data not shown).

## **DISCUSSION**

The comprehension of etiology and pathogenesis of OLP is one of the major challenges in oral pathology. OLP is characterized by the imbalance between the level of Th1 and Th2 immune responses, involving a complex cytokine network important for the exacerbation and perpetuation of oral lesions.

miRNAs are increasingly being recognized as critical regulators of tissue-specific patterns of gene expression. Thus, miRNAs are known to influence

many cellular activities, including the development and regulation of immune response [20]. Therefore, the aim of this study is investigate the possible role of miRNA participation on OLP immunopathogenesis. We observed that the expression of miRNA-146a and miRNA-155 in OLP was increased in comparison with normal oral mucosa and blood samples. The increased miRNA expressions in the OLP lesions suggest a participation of these miRNAs in the pathogenesis of this disease.

Our results are in line with previously reported data [21] of increased miRNA-146a and miRNA-155 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts compared to those in osteoarthritis patients. Also, miRNA-146a and miRNA-155 expressions are altered in other chronic inflammatory and autoimmune diseases [7,17,20].

miRNAs 146a and 155 expression profiles have been implicated in the process of CD4<sup>+</sup> cell differentiation on subsets Th1/Th2. Rodriguez et al. [18] showed that miRNA-155-deficient mice dendritic cells failed to induce efficient T cell activation in response to an antigen. They also demonstrated that *bic/miRNA-155* modulates the levels of the transcription factor *c-Maf* in CD4<sup>+</sup> T cells, and this has been related to the attenuation of Th2 cell responses in vivo [18]. In addition, it has been suggested that miRNA-155 contributes to Th1 differentiation in CD4<sup>+</sup> T cells through IFN- $\gamma$  signaling [2]. The miRNA-146a mediates the downregulation of signal transducers and activators of transcription 1 (STAT1), a key transcription factor required for Th1 effector cell differentiation, in T<sub>reg</sub>. [11]. However, Monticelli *et al.* [12] proposed that miRNA-146a might have a function in the differentiation of naive T cells into Th1 effector cells in murine hematopoietic cells. In addition, a study with knockout

mice suggested the role of SOCS-1 as a modulator of IFN- $\gamma$  action [3]. In this context, if we extrapolate all these experimental findings, we could speculate that increased miRNA-155 and miRNA-146a expression in OLP may contribute to Th1 differentiation in response to an as-yet-undetermined antigen.

miRNA-146a and miRNA-155 seem to favour TH1 response, which is increased in Oral Lichen Planus. Although it is not possible to define the exact role of miRNA-146a and miRNA-155 in OLP, some hypothesis can be drawn. The induction of these miRNAs by an undetermined mechanism may cause an unbalance of cytokines, such as IFN- $\gamma$ , that initiate or amplify the local immune reaction against an antigen, which may contribute to the development of the disease.

Several other studies provided explanation for how these miRNAs could regulate the immune response in some chronic diseases through the action of others regulatory mechanisms. Tang *et al.* [24] showed that miRNA-146a overexpression contributes to abnormal activation of type I interferon signaling pathway in systemic lupus erythematosus. Also, increased miRNA-155 expression was associated with inflammatory cytokines in human retinal pigment epithelial cells by activating the JAK/STAT signaling pathway [7]. One of these mechanisms may be implicated in OLP pathogenesis.

In conclusion, the present study shows an increased expression of miRNA-146a and miRNA-155 in OLP. However, functional studies are necessary to demonstrate a causal relationship between these small noncoding RNA molecules and local cytokine expression in OLP. As miRNAs are important modulators of the immune system, they could be potential tools in the

future molecular therapy of this disease and may also facilitate the development of new intervention strategies for OLP.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported in part by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and from Conselho Nacional e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. Dr ALS Guimarães and Professor RS Gomez are research fellows of CNPq.

## REFERENCES

1. Bai J, Lin M, Zeng X, Zhang Y, Wang Z, Shen J, Jiang L, Gao F, Chen Q (2008) Association of polymorphism in the human IFN- $\gamma$  and IL-4 gene with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese cohort. *J Interferon Cytokine Res* 28(6):351-358.
2. Banerjee A, Schambach F, DeJong CS, Hammond SM, Reiner SL (2010) Micro-RNA-155 inhibits IFN- $\gamma$  signaling in CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* 40(1):225-231.
3. Carow B, Ye X, Gavier-Widén D, Bhujra S, Oehlmann W, Singh M, Sköld M, Ignatowicz L, Yoshimura A, Wigzell H, Rottenberg ME (2011) Silencing suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) in macrophages improves Mycobacterium tuberculosis control in an interferon-gamma (IFN-gamma)-dependent manner. *J Biol Chem* 286(30):26873-87.
4. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33(20):e179.
5. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303(5654):83-86.
6. Dai R, Phillips RA, Zhang Y, Khan D, Crasta O, Ahmed SA (2008) Suppression of LPS-induced interferon-gamma and nitric oxide in splenic lymphocytes by select estrogen-regulated microRNAs: a novel mechanism of immune modulation. *Blood* 112(12):4591-4597.
7. Kutty RK, Nagineni CN, Samuel W, Vijayasathya C, Hooks JJ, Redmond TM (2010) Inflammatory cytokines regulate microRNA-155 expression in human retinal pigment epithelial cells by activating JAK/STAT pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 402(2):390-395.



8. Leng RX, Pan HF, Qin WZ, Chen GM, Y DQ (2011) Role of microRNA-155 in autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev* doi:10.1016/j.cytogfr.2011.05.002.
9. Livak KJ & Schmittgen T (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25(4):402-408.
10. Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K (2005) Current controversies in oral lichen planus: Report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100(1):40-51.
11. Lu L, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, Yoshimura A, Baltimore D, Rudensky AY (2010) Function of miR-146a in Controlling  $T_{reg}$  Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses. *Cell* 142(6):914-929.
12. Monticelli S, Ansel KM, Xiao C, Socci ND, Krichevsky AM, Thai TH, Rajewsky N, Marks DS, Sander C, Rajewsky K, Rao A, Kosik KS (2005) MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol* 6(8):R71.
13. Mühl H & Pfeilschifter J (2003) Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon- $\gamma$ . *Int Immunopharmacol* 3(9):1247-1255.
14. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D (2006) MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(5):1604-1609.

15. Parashar P (2011) Oral lichen planus. *Otolaryngol Clin North Am* 44(1):89-107.
16. Pauley KM, Cha S, Chan EKL (2009) MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 32(3-4):189-194.
17. Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK (2008) Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 10(4):R101.
18. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA (2007) Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316(5824):608-611.
19. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75(2):163-189.
20. Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A (2008) MicroRNAs and immunity: Novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol* 18(2):131-140.
21. Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, Detmar M, Gay S, Kyburz D (2008) Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58(4):1001-1009.
22. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, Seymour GJ, Bigby M (2002) The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* 13(4):350-365.

23. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D (2006) NF<sub>κ</sub>B-dependent induction of microRNA mir146a, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(33):12481-12486.
24. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, Huang X, Zhou H, Vries N, Tak PP, Chen S, Shen N (2009) MicroRNA-146a Contributes to Abnormal Activation of the Type I Interferon Pathway in Human Lupus by Targeting the Key Signaling Proteins. *Arthritis Rheum* 60(4):1065-1075.
25. Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru DC, Adair B, Fabbri M, Alder H, Liu CG, Adrian G, Croce CM (2007) Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- $\alpha$  stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* 179(8):5082-5089.
26. van der Waal I (2009) Oral lichen planus and oral lichenoid lesions; a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 14(7):E310-314.
27. Xiao-An T, Chun-Yang L, Juan X, Xi Y, Xiao-Hua C, Yu-Tao J, Bin C (2009) Differential gene expression profiles of whole lesions from patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 38(5):427-433.
28. Youngnak-Piboonratanakit P, Azuma M, Dhanuthai K, Thongprasom K, Luckprom P, Sarideechaikul W, Luangjarmekorn L (2009) Expression of IFN- $\gamma$  before and after treatment of oral lichen planus with 0.1% fluocinolone acetonide in orabase. *J Oral Pathol Med* 38(9):689-694.
29. World Medical Association (2008) In: The World Medical Association's Declaration of Helsinki, Ethical Principles for Medical Research Involving

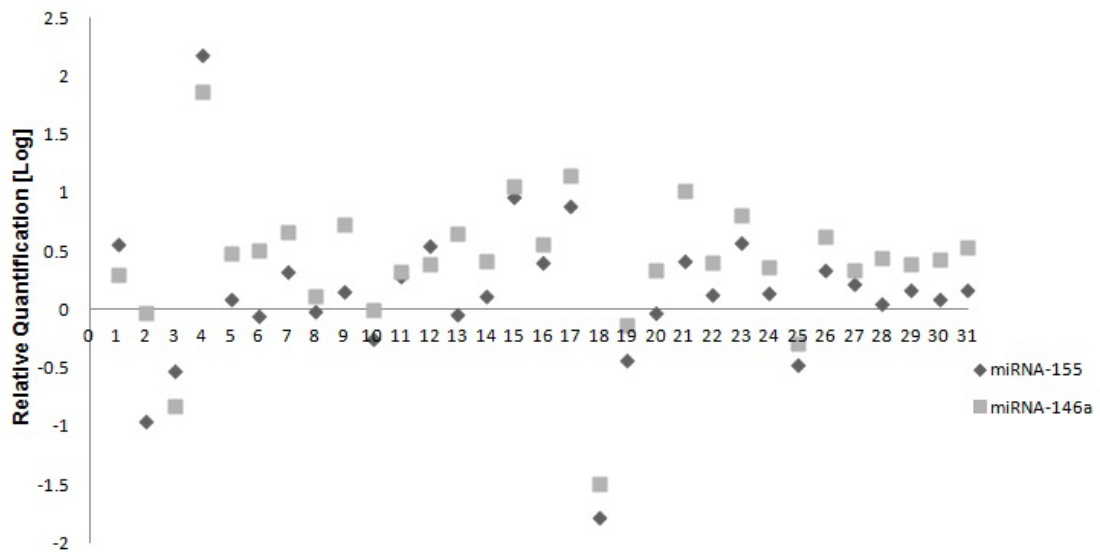
Human Subjects. World Medical Association. Available via DIALOG.  
<http://wma.net/e/policy/b3.htm>. Accessed 20 Jul 2011.

Table 1. Main clinical data of subjects with oral lichen planus included in the study

<b>Sample</b>	<b>Sex</b>	<b>Age (years)</b>	<b>Clinical forms</b>
1	M	71	Plaque
2	M	55	Reticular
3	F	58	Plaque
4	F	41	Plaque
5	F	48	Reticular
6	F	61	Plaque
7	F	57	Reticular
8	F	52	Reticular
9	M	38	Plaque
10	M	43	Reticular
11	F	81	Plaque
12	F	35	Reticular
13	F	92	Reticular
14	F	41	Reticular
15	F	40	Plaque
16	F	33	Reticular
17	F	42	Reticular
18	F	43	Reticular
19	M	48	Reticular
20	F	36	Plaque
21	M	53	Reticular
22	F	56	Plaque
23	F	52	Plaque
24	F	33	Reticular
25	F	62	Erosive
26	F	30	Erosive
27	F	50	Erosive
28	F	51	Reticular
29	F	26	Reticular
30	F	49	Erosive
31	F	50	Reticular

M: male; F: female

Figure 1. Relative quantification of miRNA-146a and miRNA-155 in oral lichen planus



Relative quantification of miRNA-146a and miRNA-155 in oral lichen planus normalized to endogenous miRNA-U47 and relative to the calibrator (PBMC= x axis) in oral lichen planus (n = 31). Most of the samples showed and increased expression of both miRNAs when compared to normal blood (PBMC).

Figure 2. Relative quantification of miRNA-146a and miRNA-155 in oral lichen planus and normal oral mucosa.

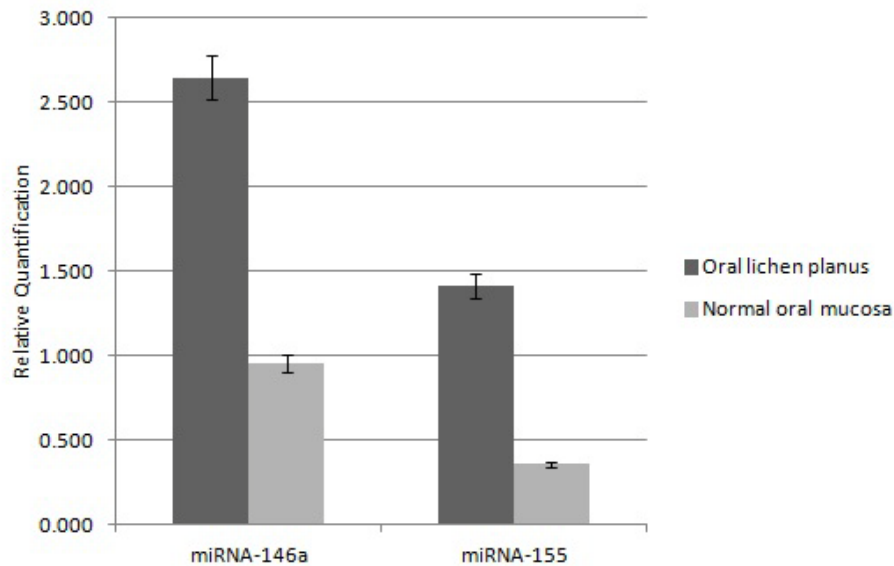


Figure 2. Relative quantification of miRNA-146a and miRNA-155 in oral lichen planus and normal oral mucosa. Increased expression of miRNA-146a and miRNA-155 is observed in oral lichen planus when compared to normal oral mucosa (Mann-Whitney's test,  $p = 0.0120$  and  $p = 0.0031$ ).

**ANEXO B****Ficha Clínica Líquen Plano Bucal****Dados Pessoais**

Código Paciente n.º \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

**Doença**

Diagnóstico clínico: \_\_\_\_\_

Variante clínica: \_\_\_\_\_

Tempo da doença: \_\_\_\_\_

**Regime medicamentoso**Paciente faz ou já fez uso de medicação de uso contínuo?  Sim †  Não †

Quais? \_\_\_\_\_

**História Médica**

Alterações sistêmicas: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Alergia a algum medicamento:  Sim †  Não †

Qual medicamento? \_\_\_\_\_

Fumante?  Sim †  Não  Etilista?  Sim †  Não**Manifestações clínicas bucais** Mucosa jugal †  Língua †  Lábio  Palato  Gengiva  Outros \_\_\_\_\_Nº. sítios envolvidos:  1†  2†  3†  4†  >4†Sintomas:  Ausente †  Presente † Estrias brancas  Eritema  Úlcera  Placas brancas †

Tamanho da lesão (em mm): \_\_\_\_\_

**Manifestações clínicas sistêmicas**Lesão pele:  Ausente †  Presente † Localização: \_\_\_\_\_Sintomatologia dolorosa:  Ausente †  Presente †**História familiar** História de algum tipo de doença ou em algum familiar (qual doença e qual o grau de parentesco dos familiares?)**Tratamento** \_\_\_\_\_



**ANEXO C.1****Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Odontologia****TERMO DE ESCLARECIMENTO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Paciente grupo caso)**

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa que tem o seguinte título: "Análise de microRNAs (mi-RNA) no líquen plano bucal". O líquen plano é uma doença que acomete a pele e a cavidade bucal de indivíduos adultos, podendo causar intensa dor e ardência na boca. Nesta doença, o organismo não reconhece algumas de suas células e tenta destruí-las, levando ao aparecimento das lesões. Precisamos estudar mais sobre líquen plano para que possamos entender melhor sua causa e assim melhorar o tratamento dos pacientes.

O objetivo deste estudo é a identificação de determinadas substâncias (microRNAs) que podem estar alteradas, levando ao desenvolvimento da doença.

Para realização deste estudo será necessário coletar uma parte deste tecido removido durante a biópsia, além da coleta de saliva e sangue. A coleta da saliva será realizada em tubos apropriados e descartáveis, sendo necessário que você mastigue um rolinho de algodão previamente esterilizado. Para a coleta das amostras de sangue será realizado uma punção venosa, utilizando materiais totalmente descartáveis e apropriados. Esta coleta de sangue será realizada na própria Faculdade de Odontologia UFMG em uma sala de coletas, sendo realizada por uma técnica em Enfermagem devidamente treinada, juntamente com a Pesquisadora responsável pelo trabalho. Todos os procedimentos serão realizados por pessoas devidamente capacitadas, o que não impede a possibilidade da ocorrência de hematomas após a coleta das amostras de sangue. Este estudo não oferecerá nenhum tipo de risco a sua saúde e não terá custos para você. Você poderá retirar o consentimento a qualquer momento da pesquisa, havendo continuidade normal do seu tratamento. O seu tratamento será realizado normalmente mesmo que haja recusa em assinar esse termo.

Esta pesquisa poderá contribuir para um melhor entendimento sobre como se desenvolve o líquen plano bucal, podendo melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

**TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO**

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a utilização de parte da lesão que foi removida através biópsia, da saliva e do sangue coletados para este projeto de pesquisa. Permito também, a utilização de todos dados obtidos e fotos para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome do paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

DOCUMENTADO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ N. \_\_\_\_\_

Pesquisadora: **Telma Cristina Arão.**

Telefone: (31) 34092477

Orientador: **Ricardo Santiago Gomez**

Telefone: (31) 34092477

COEP (Comissão de Ética em Pesquisa) Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG, Brasil. 31270-901 [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br) telefax 31 3409-4592

**ANEXO C.2****Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Odontologia****TERMO DE ESCLARECIMENTO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Paciente grupo controle)**

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa que tem o seguinte título: "Análise de microRNAs (mi-RNA) no líquen plano bucal". O líquen plano é uma doença que acomete a pele e a cavidade bucal de indivíduos adultos, podendo causar intensa dor e ardência na boca. Nesta doença, o organismo não reconhece algumas de suas células e tenta destruí-las, levando ao aparecimento das lesões. Precisamos estudar mais sobre líquen plano para que possamos entender melhor sua causa e assim melhorar o tratamento dos pacientes.

O objetivo deste estudo é a identificação de determinadas substâncias (microRNAs) que podem estar alteradas e compará-las às substâncias presentes em pacientes com ausência das lesões.

Para realização deste estudo será necessário coletar uma parte do tecido removido durante a exodontia de terceiros molares inclusos, além da coleta de saliva. A coleta da saliva será realizada em tubos apropriados e descartáveis, sendo necessário que você mastigue um rolinho de algodão previamente esterilizado. Todos os procedimentos serão realizados por pessoas devidamente capacitadas. Este estudo não oferecerá nenhum tipo de risco a sua saúde e não terá custos para você. Você poderá retirar o consentimento a qualquer momento da pesquisa, havendo continuidade normal do seu tratamento. O seu tratamento será realizado normalmente mesmo que haja recusa em assinar esse termo.

Esta pesquisa poderá contribuir para um melhor entendimento sobre como se desenvolve o líquen plano bucal, podendo melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

**TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO**

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a utilização de parte do tecido removido durante a exodontia de terceiros molares inclusos e da saliva coletada para este projeto de pesquisa.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome do paciente Assinatura do paciente

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ N. \_\_\_\_\_

Pesquisadora: **Telma Cristina Arão**. Telefone: (31) 34092477

Orientador: **Ricardo Santiago Gomez** Telefone: (31) 34092477

COEP (Comissão de Ética em Pesquisa) Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG, Brasil. 31270-901 [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br) telefax 31 3409-4592

## ANEXO D



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0228.0.203.000-10

Interessado(a): **Prof. Ricardo Santiago Gomez**  
Depto. Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas  
Faculdade - UFMG

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 24 de agosto de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Análise de MicroRNAs (mi-RNAs) em Líquen Plano Bucal**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

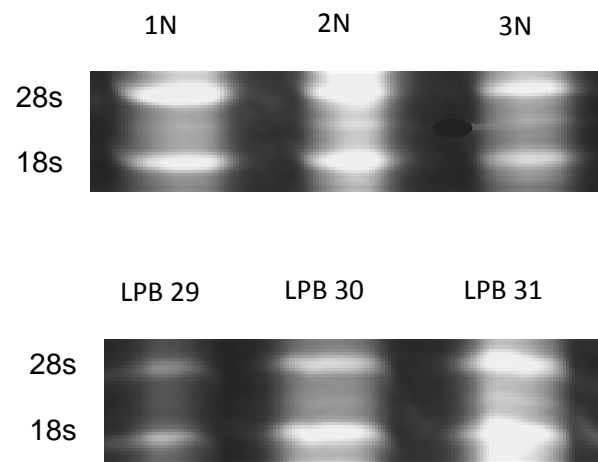
O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Teresa Marques Amaral', is positioned above the printed name.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
Coordenadora do COEP-UFMG

**ANEXO E**

## Gel de RNA



Gel de poliacrilamida a 15% corado com brometo de etídeo e submetido à análise sob transluminador de UV. As bandas 28s e 18s representam a integridade e qualidade do RNA extraído das amostras de mucosa normal 1N, 2N, 3N (primeiro gel) e amostras de LPB 29, 30, 31 (segundo gel).

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

1. Abba AK, Lichtmann AH. Cellular and molecular Immunology. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2003.
2. Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. 2007; *J.Intern.Med.* 261, 511-528.
3. Andreasen JO. Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases. 1968; *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*;25(1):31-42.
4. Ambros V, Lee RC, Feinbaum RL. The C elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993; 75:843–54.
5. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004; 431,350-355.
6. Baek D.; Villén J.; Shin C. ; Camargo F. D. Gygi S. P.; The impact of microRNAs on protein output. 2008; *Nature.* 455(7209): 64–71
7. Bai J, Lin M, Zeng X. Association of polymorphisms in the human IFN-gamma and IL-4 gene with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese cohort. 2008, *J Interferon Cytokine Res.* 28: 351–8.
8. Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zárate R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzó M, García-Foncillas J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer.* 2006; Jul 19;5:29.

9. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–97.
10. Chan L , Edward KL, Kaleb M P, MinorU S, Annie LC, Bubb M.R, Reeves W. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. 2009; *Arthritis Research & Therapy*.
11. Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med* 2005; 353:1768–71.
12. Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD41 T cell responses: the alternative approaches. 1997; *Annu Rev Immunol*. 15:297-322.
13. Conrotto D, Carbone M, Carrozzo M. Ciclosporin vs clobetasol in the topical management of atrophic and erosive oral lichen planus: a double-blind, randomized controlled trial. 2006; *Br J Dermatol* . 154: 139–145.
14. Curtale G; Citarella F; Carissimi C; Goldoni M; Carucci N; Fulci V; Franceschini D; Meloni F; Barnaba V; Macino G. An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. 2010; *Blood* 115: 265-27
15. Dai R., Phillips R.A., Zhang Y., Khan D., Crasta O., Ahmed S.A. Suppression of LPS-induced Interferon-gamma and nitric oxide in splenic lymphocytes by select estrogen-regulated microRNAs: a novel mechanism of immune modulation.2008; *Blood*. 112(12):4591-7.

16. Eisenberg, E.; Krutchkoff, D. J. Lichensid Lesions of Oral Mucosa. Diagnostic Criteria and Their Importance in the Allegid Relationship to Oral Câncer. 1992; *Oral surg.* 73(6) 699-704.
17. Eisen D, Carrozzo M, Bagan SJV, Thongprasom K. Number V. Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis* 2005; 11: 338–349.
18. Eisen D. The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. 2002; *J Am Acad Dermatol.* 46:207-14.
19. Eisen D. The evaluation of cutaneous, genital, scalp, nail, esophageal, and ocular involvement in patients with oral lichen planus. 1999; *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 88:431–6.
20. Fayyazi A, Schweyer S, Sorurl A. T lymphocytes and altered keratinocytes express interferon-gamma and interleukin 6 in lichen planus. *Arch Dermatol Res* 1999; 291: 485–90.
21. Finne K, Göransson K, Winckler L. Oral lichen planus and contact allergy to mercury. 1982; *Int J Oral Surg.* 11(4):236-9.
22. Gartel, A. L.; Kandel, E. S. RNA interferente in cancer. 2006; *Biomolecular Engineering.* 23, 17-32.
23. Garzon, R. MicroRNA expression and function in cancer. 2006; *Trends Mol. Med.* 1-8.
24. Gomez RS.; Xavier GM; Sá AR; Guimarães AL, da Silva TA. Investigation of functional gene polymorphisms interleukin-1beta, interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor in individuals with oral lichen planus.2007; *J Oral Pathol Med.*; 36(8):476-81.



25. Gregory, R. I.; Shiekhattar, R. MicroRNA Biogenesis and Cancer. 2005 *Cancer Res*; 65(9), 3509-12.
26. Greene CM; Oglesby IK, McElvaney NG. MicroRNAs in inflammatory lung disease--master regulators or target practice? 2010; *Respir Res* 28;11:148.
27. Haber, D. A.; Diederichs, S. Sequence variations of microRNAs in human cancer: alterations in predicted secondary structure do not affect processing. 2006; *Cancer Res*. 66(12).
28. Harfe, B.D. MicroRNAs in vertebrate development. 2005; *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 410-415.
29. Huppi, K. MicroRNAs and genomic instability. 2007; *Seminars in Cancer Biology*. 17, 65-73.
30. Iborra M.; Bernuzzi F.; Invernizzi P.; Danese S. MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: Crucial regulators in immune response; 2010 *Autoimmun Rev.* 11:58-60.
31. Jacques, C.M.C; Pereira, A.L.C.P; Cabral, M.G.; Cardoso, A.S.; silva, M.R. Oral Lichen Part I: epidemiology, clinics, etiology, immunopathogeny, and diagnosis.2003; *SKINmed*. 2(6) 342-349.
32. Johnson S. *et al.* Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family. 2005; *Cell*. 120, 635–647.
33. Katta R. Lichen planus. *Am Fam Physician*. 2000; 61: 3319–3324.
34. Kimkong I, Hirankarn N, Nakkuntod J, Kitkumthorn N .Tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms and susceptibility to oral lichen planus. 2010; *Oral Dis*. 17(2):206-9.

35. King, C.A.; Wills, M. Immunology I: innate immunity. 2005; *Surgery*. 23: 304-308.
36. Korn T.; Bettelli E.; Oukka M.; Kuchroo V. K. IL-17 and Th17 Cells; 2009 *Annu Rev Immunol.*;27:485-517.
37. Kutty K R; Nagineni C. N; Samuel W, Vijayasarathy D.; Hooks J J; Redmond T M. Inflammatory cytokines regulate microRNA-155 expression in human retinal pigment epithelial cells by activating JAK/STAT pathway. 2010 *Biochemical and Biophysical Research Communications* 402: 390-395.
38. Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Lichenoid dysplasia: a distinct histopathologic entity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;60(3):308–15.
39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  *Method Methods* 2001; 25:402-8.
40. Loa, K. et al. Real Time PCR profiling of 330 human micro-RNAs. *J. Biotechnol.* 2007; 2, 1-3.
41. Lodi G., Carrozzo M., Scully C., Griffiths M., Philip B., Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: Report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100:40-51.
42. Lodi G., Carrozzo M., Scully C., Griffiths M., Philip B., Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: Report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant

- transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 b; 100:164-78.
43. Lu LF, Liston A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology.* 2009; 127(3):291-8.
44. Lu L.F., Boldin M.P., Chaudhry A., Lin L.L., Taganov K.D., Hanada T., Yoshimura A., Baltimore D., Rudensky A.Y., 2010. Function of miR-146a in Controlling Treg Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses. *Cell.* 142(6):914-29.
45. Mack GS. MicroRNA gets down to business. *Nat Biotechnol.* 2011
46. miRBASE sequence database <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml> (version current at 19.07.07).
47. Monticelli S., Ansel K.M., Xiao C., Socci N.D., Krichevsky A.M., Thai T.H., Rajewsky N., Marks D.S., Sander C., Rajewsky K., Rao A., Kosik K.S. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. 2005, *Genome Biol.* 6:1-15.
48. Moudgil K.D., Kim E.Y. Regulation of autoimmune inflammation by pro-inflammatory cytokines. 2008; *Immunology Letters.* 120:1–5.
49. Neppelberg E, Loro LL, Oijordsbakken G, Johannessen AC. Altered CD40 and E-cadherin expression – putative role in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36: 153-160.
50. O’Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:1604–9.
51. Ondrey FG, Dong G, Sunwoo J et al. Constitutive activation of transcription factors NK- ( $\kappa$ ) B, AP-1, and NF-IL6 in human head

- and head neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Mol. Carcinog.* 1999; 26: 119-29.
- 52.** Organização Mundial de Saude (OMS), 2005
- 53.** Osada, H., Takahashi, T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2007; 28(1):2-12.
- 54.** Parashar P., 2011. Oral lichen planus. *Otolaryngol Clin North Am.*, 44(1):89-107.
- 55.** Pauley K.M.; Seunghee C.; Edward K.L.C. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity.* 32(2009) 189-194.
- 56.** Plasterk, R.H. Micro RNAs in animal development. *Cell.* 2006; 124, 877-881.
- 57.** Rodriguez A., Vigorito E., Clare S., Warren M.V., Couttet P., Soond D.R., van Dongen S., Grocock R.J., Das P.P., Miska E.A. (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316: 608-611.
- 58.** Rojo-Moreno JL, Bagan JV, Rojo-Moreno J, Donat JS, Milian MA, Jimenez Y. Psychologic factors and oral lichen planus. A psychometric evaluation of 100 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 86:687-91.
- 59.** Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferongamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 2007; 96: 41–101.
- 60.** Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, hume DA. Interferon gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 163–89.

61. Scully C; Carrozzo M. Oral mucosal disease: Lichen planus.2008; *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 46:15–21.
62. Scully C, Eisen D, Carrozzo M. Management of oral lichen planus. *Am J Clin Dermatol* 2000;1:287–306.
63. Scully C, Elkom M. Lichen planus: review and update on pathogenesis. *J Oral Pathol* 1985;14:431–58.
64. Shen N, Yuanjia T, Xiaobing L, Huijuan C, Xuming N, Min Y, Yanzhi G, Xinfang H, Haibo Z, Niek V, Tak PP, Shunle C. MicroRNA-146a Contributes to Abnormal Activation of the Type I Interferon Pathway in Human Lupus by Targeting the Key Signaling Proteins. *Arthritis & Rheumatism* 2009; 60( 4),1065–1075.
65. Silverman S, Jr. Oral lichen planus: A potentially premalignant lesion. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58(11):1286–1288.
66. Silverman Jr S, Gorsky M, Lozada-Nur F. A prospective study of findings and management in 214 patients with oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991; .72(6):665–70.
67. Simark M C, Jontell M, Bergenholtz G, Heyden M, Dahlgren UI. Distribution of interferon-gamma mRNA positive cells in oral lichen planus lesions. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 483–8.
68. Slack, F. J.; Esquela-Kerscher, A. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6: 259-269.
69. Sonkoly E.; Stahle M.; Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: Novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. 2008; *Seminars in Cancer Biology* 18:131-140.

70. Sugerman PB, Satterwhite K, Bigby M. Autocytotoxic T-cell clones in lichen planus. *Br J Dermatol* 2000;142:449-56.
71. Sugerman PB, Savage NW, Seymour GJ. Phenotype and suppressor activity of T-lymphocyte clones extracted from lesions of oral lichen planus. *Br J Dermatol* 1994;131:319-24.
72. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, et al. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 350–65.
73. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF- $\kappa$ B dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci* . 2006;103:12481–6.
74. Tao XA, Li CY, Rhodus NL, Xia J, Yang XP, Cheng B. Simultaneous detection of IFN-gamma and IL-4 in lesional tissues and whole unstimulated saliva from patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 83–7.
75. Targetscan 4.0 sequence database ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org))
76. Thornhill MH. Immune mechanisms in oral lichen planus. *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 174–7.
77. van der Waal I. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions; a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. 2009; *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.*, 14(7):310-4.
78. Vazquez LF, Gomez DS, Sanchez J, et al. Dermoscopy of active lichen planus. *Arch Dermatol* 2007; 143: 1092.

79. Walsh LJ, Ishii T, Savage NW, Gemmell E, Seymour R GJ. Immunohistologic analysis of epithelial cell populations in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990;19:177-81.
80. Wilson E. On lichen planus. *J Cutan Med Dis Skin* 1869; 3: 117–132
81. Wu BH, Xiong XP, Jia J, Zhang WF. MicroRNAs: New actors in the oral cancer scene 2011; *Oral Oncol.*47(5):314-9.
82. Yamamoto T, Yoneda K, Ueta E, Hirota J, OSAKI T: Serum cytokine levels in patients with oral mucous membrane disorders. *J Oral Pathol Med* 1991; 20:275–279.
83. Yamamoto T, Osaki T, Yoneda K, Ueta E: Cytokine production by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 1994; 23:309–315
84. Yamamoto T, Osaki T. Characteristic cytokines generated by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Invest Dermatol* 1995;104: 784-8.
85. Zhang HH, Wang XJ, Li GX, Yang E, Yang NM. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2007; 13, 2883-8.