



UEPB

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

CAMPUS I- CAMPINA GRANDE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DOUTORADO EM ODONTOLÓGICA

LUAN ÉVERTON GALDINO BARNABÉ

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE CD4, CD8, GALECTINAS-1, -3 E -7 NO
LÍQUEN PLANO ORAL E REAÇÃO LIQUENOIDE ORAL**

CAMPINA GRANDE – PB

2022

LUAN ÉVERTON GALDINO BARNABÉ

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE CD4, CD8, GALECTINAS-1, -3 E -7 NO
LÍQUEN PLANO ORAL E REAÇÃO LIQUENOIDE ORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia da Universidade Estadual da
Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Odontologia –

Área de concentração Clínica Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves

CAMPINA GRANDE – PB

2022

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

B259a Barnabé, Luan Éverton Galdino.
Avaliação imunoistoquímica de CD4, CD8, Galectinas-1, -3 e -7 no líquen plano oral e reação liquenoide oral [manuscrito] / Luan Éverton Galdino Barnabé. - 2022.
73 p. : il. colorido.

Digitado.

Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.

"Orientação : Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves, Departamento de Odontologia - CCBS."

1. Líquen plano oral. 2. Reação liquenoide oral. 3. Galectinas. I. Título

21. ed. CDD 617.6

LUAN ÉVERTON GALDINO BARNABÉ

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE CD4, CD8, GALECTINAS-1, -3 E -7 NO
LÍQUEN PLANO ORAL E REAÇÃO LIQUENOIDE ORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia da Universidade Estadual da
Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Odontologia

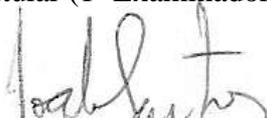
Área de concentração: Clínica Odontologia.

Aprovado em 22/07/2022

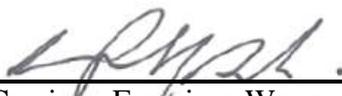
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Pedro Paulo de Andrade Santos
Membro Titular (1º Examinador externo - UFRN)



Prof. Dr. Joabe dos Santos Pereira
Membro Titular (2º Examinador externo - UFRN)



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka
Membro Titular (1º Examinador interno - UEPB)



Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez
Membro Titular (2º Examinador interno - UEPB)



Prof. Dra. Pollianna Muniz Alves
Membro Titular (Orientadora - UEPB)

*Dedico este trabalho a Teódula Barros
de Sousa, minha amada avó/mãe.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A **Prof^ª. Dr^ª. Pollianna Muniz Alves** que sempre será minha fonte de admiração. Professora é difícil resumir em poucas linhas esses mais de 7 anos ao seu lado. Conheci a senhora em 2011 no curso de odontologia da UFCG em Patos-PB, enquanto ministrava a disciplina de patologia geral, e mesmo que de maneira breve a senhora me marcou pelo seu conhecimento que emanava com uma facilidade e alegria que me fazia esperar a semana inteira pela sua aula. Fiquei muito triste quando soube que a senhora não estaria lá após aquele semestre. Anos depois, já formado e com um sonho de também ser professor, resolvi acompanhar meu melhor amigo (Klidenberg Júnior) na seleção do mestrado da UEPB e lembro o quanto fiquei apavorado por não conhecer nenhum dos possíveis orientadores, mas vi o nome da senhora e isso me tranquilizou. Na aula inaugural do mestrado, a senhora estava sentada no fundo da sala quando fui perguntar se ainda lembrava de mim, com uma memória excelente a senhora disse que sim e me veio a esperança de poder ser seu orientando. Nunca vai sair da minha memória o dia que mostrei a senhora minha primeira aula, sua expressão olhando para mim e dizendo: “Chocha né! Vamos melhorar.”. Não sei dizer, depois desse momento, tudo que aprendi com a senhora sobre a docência e sobre a vida. Dizer que a senhora foi apenas minha orientadora de mestrado e doutorado é tirar toda sua preocupação com meu bem-estar e minhas decisões. A senhora já esteve comigo no hospital durante as crises renais, me levou à rodoviária quando pedi minha avó e me deu conselhos sobre todos os âmbitos da minha vida. Também levei muitos puxões de orelha e percebi que não sou fácil, por isso peço desculpa por todo trabalho que lhe dei. A senhora me motivou a fazer o doutorado quando me disse que “Um bom professor não é só aquele que sabe dar aula, mas o que pesquisa para saber mais sobre o que ensina”. Ao longo desses anos a senhora me tornou mais adulto, maduro, comprometido e um pouco mais sério. Espero ao final desse ciclo que a senhora possa ter boas lembranças de mim e que possa um dia ter orgulho de eu ter sido seu orientando. Muito obrigado por todo o conhecimento e cuidado que a senhora me deu durante todos esses anos, vou ser sempre seu orientando mais “chocho”!

AGRADECIMENTOS

A *Deus* e a *Nossa Senhora do Carmo* que em sua infinita bondade permitiram-me chegar até aqui.

Aos meus amados pais, *Cicero Galdino de Barros* e *Imelda Barnabé de Barros*, meus maiores incentivadores. Quero deixar registrado todo o esforço de vocês para que esse dia chegasse. Filhos de agricultores, vivendo em um sítio no alto sertão paraibano, encontraram diversas dificuldades para estudar como a resistência dos pais e a distância percorrida diariamente para encontrar uma escola. Construir a vida nunca foi fácil e as lutas diárias de vocês para nos manter sempre estarão comigo. Dói saber que muitas e muitas vezes precisei tirar do dinheiro e comida de casa para estudar, mas sempre ouvia uma voz carinhosa que dizia “Estamos bem meu filho! Estude.”. Por mais longa e difícil que tenha sido essa jornada sempre tive e sempre terei vocês comigo. MUITO OBRIGADO!

A minha irmã, *Soraia Ellen Galdino Barnabé*, que hoje é minha grande amiga e confidente. Tenho muito orgulho da mulher que você se tornou e principalmente de ter você como minha confidente. Confio plenamente no seu sucesso!

A minha amada avó *Teódula Barros de Sousa* que infelizmente não está mais fisicamente presente para ver este momento. Muitos dias difíceis passei longe de casa na esperança de dar orgulho a senhora e a nossa família, mas me acalentava a lembrança da senhora dizendo “Éverton é tão bom a gente poder dizer que tem um doutor na família.”. Me desculpe não ter conseguido realizar seu sonho antes da senhora partir. Sempre vou lembrar e amar a senhora!

Ao meu avô paterno, *Josafá Galdino de Sousa*, e aos meus avós maternos, *Luiz Galdino de Sousa* (em memória) e *Maria Barnabé de Sousa*, muito obrigado pelo carinho, amor e cuidado. Sempre foi reconfortante voltar para casa e ter vocês demonstrando todo cuidado e curiosidade com tudo que eu aprendia e fazia. Sou grato a Deus por ter vivido e aprendido com vocês.

A *Abraão Pedro da Silva Mélo* que admiro imensamente por suas aspirações e inteligência. Tenha certeza de que você faz e sempre fará parte da minha vida. Espero estar presente em todas as suas realizações, assim como você sempre se faz presente nas minhas com suas palavras de incentivo e confiança. Muito obrigado por você estar sempre ao meu lado!

A *toda minha família*. Todas as realizações e dificuldades enfrentadas ao longo dessa trajetória foram partilhadas e saber que posso contar com vocês me faz sentir mais seguro. Quero aqui deixar minha gratidão ao meu tio/padrinho *Francisco Galdino de Barros*, que assim

como minha avó dizia “um príncipe”, sempre esteve presente e disposto a ajudar. Aos meus tios (*Maria, Almair, Mércia, Jesualdo, Francisco, Orlando, José, Carlos, Ivanildo, Wellington e Wanessa*), primos (*Júnior, Matheus, Laryssa, Kauan, Juan, Kauê, Judivan Júnior, Vivian, Anny Teódula, Wesley, Marcondes, Wisnney, Mariana, Sabrina, Luiz, Milena, Ruan, Alex, Alícia, Wellington Júnior, César e Ana Livia*) e demais parentes sou grato a Deus por todos e sempre poderão contar comigo.

A minha querida amiga **Francinete Alvelino**, “Leleta”, que sempre esteve presente me ajudou de todas as formas possíveis. Sempre serei grato pelo seu bom coração!

Ao **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka** pelo seu exemplo de dedicação a pesquisa e ao diagnóstico oral. Professor Cassiano é difícil mensurar o quanto aprendi com o senhor ao longo desses anos, foram aulas, elaborações de trabalhos e principalmente a admiração pelo seu empenho para que o laboratório e os diagnósticos nunca parassem. Em muitas situações precisei da sua ajuda e o senhor se mostrou presente e disposto resolver, em especial quero destacar sua ajuda para a realização das análises da tese durante a pandemia, bem como sua incansável dedicação na emissão de laudos que muitas vezes eram urgências ou diagnósticos complexos. Agradeço por toda sua dedicação e espero levar comigo um pouco do senhor. MUITO OBRIGADO!

Aos **Prof. Dr. Pedro Paulo de Andrade Santos** e **Prof. Dr. Joabe dos Santos Pereira** pela disponibilidade e contribuições para melhoria do nosso trabalho. Em especial, agradeço ao **Prof. Dr. Pedro Paulo de Andrade Santos** por ser um exemplo desde a graduação, na qual tive o prazer de ser seu monitor e orientando de trabalho de conclusão de curso. Muito obrigado!

A todos os **professores do PPGO-UEPB**, grandes mestres na minha vida. As **Prof^ª. Dr^ª. Jozinete Vieira Pereira** e **Prof^ª. Dr^ª. Daliana Queiroga de Castro Gomes** que foram grandes exemplos no diagnóstico oral que levarei comigo ao longo da vida pela sua inteligência, respeito humanidade. As **Prof^ª. Dr^ª. Daniela Pita de Melo**, **Prof^ª. Dr^ª. Edja Maria Melo de Brito Costa**, **Prof^ª. Dr^ª. Ana Flávia Granville-Garcia**, **Prof^ª. Dr^ª. Rilva Suely de Castro Cardoso Lucas** e **Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Meira Bento** que ao longo desses anos não apenas ensinaram, mas tornaram meus dias mais felizes e me inspiraram. Ao **Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez** por toda sua educação e cavalheirismo, sempre compartilhando seu conhecimento da maneira mais simples para o aprendizado de todos a sua volta. Espero levá-los comigo ao longo da vida através da minha admiração e dos seus ensinamentos. Muito obrigado!

A minha dupla sertaneja **Luana Samara Balduino Sena** que depois de todos esses anos não poderia chamá-la de outra coisa que não irmã. Foram tantos desafios e sofrimentos juntos que não caberia aqui, mas foram tantos outros dias felizes e alegrias compartilhadas que

superaram todas as dificuldades. Lu não sei mais dizer quem era eu antes de ter você como amiga e inspiração. Eu vou estar sempre com você e me orgulho demais da mulher, doutora e mãe que você se tornou. Te adoro!!!

Aos meus melhores amigos, **José Klidenberg de Oliveira Júnior (Klin)** e **Luiz Eduardo Marinho Viera (Lula)**. **Klin** é difícil imaginar que consegui fazer mestrado e doutorado sem você perto, principalmente por sentir que faltava algo. Você sempre foi e sempre será minha inspiração de perseverança, humildade e alegria. Como é bom saber que posso contar com você para desabafar meus sofrimentos e dividir minhas alegrias. **Lula** você foi um carinho de Deus na minha vida quando veio fazer mestrado na UEPB, quantos não foram os dias que chorei e você dizia “Calma amigo, vai dar certo!”. Ao ver você realizar seus sonhos me sinto extremamente feliz, pois a sua alegria é minha também. Agradeço todos os dias a Deus por vocês na minha vida.

Aos meus grandes amigos de toda a vida, **Mariana Carvalho Xerez**, **Gabriella Alves de Assis Nóbrega**, **Marisley Layrtha Santos**, **Manoela Natacha Almeida Rodrigues**, **Vinícius Sampaio Alves de Figueiredo**, **Rodolfo de Abreu Carolino**, **Thays Martins de Moraes**, **Sérgia Landara Bezerra Soares**, **Roberta Cristina Medeiros Pimentel Gusmão**, **Maria Eugênia Aguiar**, **Rayssa Batista de Andrade** e **Narjara Maria Sampaio Pinheiro**. Peço desculpas pela ausência ao longo desses anos, pois assim como vocês sabem as obrigações e a rotina muitas vezes afastam. Não sei dizer quantas foram as vezes ao longo desses anos que queria ao menos poder rir ou falar com um de vocês. Saibam que mesmo falando pouco eu ainda continuo torcendo e rezando por todos vocês e que estejamos sempre juntos. Tenho muita saudade de conviver com todos!

Aos meus dois grandes presentes do doutorado, **Ingrid Morgana Fernandes Gonçalves** e **Emanuene Galdino Pires**, amigas queridas com quem dividi momentos felizes e difíceis. Morgana e Manu, eu sou extremamente grato por todas as vezes que estivemos juntos enfrentando as dificuldades do doutorado e fazendo desses momentos motivos para rir. O carisma e a dedicação de vocês sempre estarão marcados em mim. Por mais que a distância nos tenha separado, seja pelo anjinho Gabriel ou um parto de cuscuz com banana vocês, sempre terão um lugar no meu coração.

As minhas queridas amigas, **Ana Luzia Araújo Batista (Aninha)** e **Denize Núbia Souza (Nú)**. **Aninha**, você foi uma mãe para mim no laboratório durante todos esses anos, com toda sua luz e sabedoria sempre sabia reconfortar meu coração para não desistir, eu só tenho a lhe agradecer e pedir que continue sendo esse ser iluminado. **Nú**, me faltam palavras para descrever você e o que você representa na minha vida. Chorei muito escrevendo meus agradecimentos,

mas você não consegue me fazer chorar. Você sempre me fez rir e me deixou alegre. Obrigado por sempre ouvir minhas lamúrias e por tentar me ajudar fazendo *reiki*. Eu não teria conseguido terminar sem a ajuda de vocês, muito obrigado!

Aos meus amigos do doutorado *Ana Priscila, Andressa Cavalcanti, Erick Tássio, Ernani Canuto, Isabella Jardelino, José de Alencar, Julliana Cariry, Liege Helena, Luana Samara, Marina Tavares, Niebla Melo e Tomás Lúcio*. Agradeço a todos pelas tantas horas juntos e o apoio dado para que enfrentássemos todas as dificuldades. Foi maravilhoso ver o amadurecimento de todos e espero me tornar um pesquisador tão bom quanto vocês.

Aos amigos da pós-graduação *Pâmela Medeiros, Fabiana Medeiros, Robeci Macedo, Daniella Lucena, Walter Gleybson, Geisa, Betânea, Allany Andrade, Christany Ferreira, Wliana Pontes, Roanny Torres e Jéssica Gomes*. Vocês foram verdadeiras pérolas nessa caminhada que tornaram muito mais prazerosos todos os momentos em que estivemos juntos. Muito obrigado!

Aos *atuais e ex-funcionários do departamento de Odontologia e do Programa de pós-graduação da UEPB*, representados por *Ahyanna Thammyres, Adraine Pâmela, Dioliane, Dione e Joselma*. Vocês são a prova viva de pessoas que trabalham com amor, amor este que fica gravado no coração de quem tem oportunidade de conhecê-las. Foi uma benção ter pessoas tão solícitas durante essa caminhada!

Aos amigos que fiz em minha vivência em Campina Grande, aqui representados por *Daniel Gonçalves e Samir Rosa* que fizeram minha estadia aqui mais feliz e divertida. Muito obrigado!

Aos meus *alunos* que são minha motivação para continuar, aqui representados por meus amigos *Natália Vitória, Nathália Uchoa e Gabriel Toscano*. Vocês têm o dom de tornar meus dias mais felizes!

Aos meus *colegas de trabalho* que em meio a tantas dificuldades e turbulências sempre me incentivaram a continuar, em especial *Marny, Aline, Rosa, Matheus, Sara, Jalber Almeida e Hianne*. É reconfortante ter vocês por perto!

Ao *Prof. Dr. Ricardo Alves Mesquita* (PPGO-UFMG), por sua disponibilidade e imensas colaborações com a realização deste trabalho, muito obrigado!

Ao *Programa Nacional de Cooperação Acadêmica* (PROCAD/Casadinho) que permitiu o engrandecimento deste trabalho, através da vinculação a Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) pelo incentivo financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

*“Ensinar não é transferir conhecimento,
mas criar as possibilidades para a sua
própria produção ou a sua construção.”*

Prof. Dr. Paulo Reglus Neves Freire – Patrono da Educação Brasileira.

RESUMO

Introdução: O líquen plano oral (LPO) é uma desordem inflamatória crônica que acomete a mucosa oral e, por vezes, a pele, caracteriza-se por uma resposta imunologicamente mediada por linfócitos T aos queratinócitos do tecido epitelial, sendo sua etiologia incerta. Enquanto, as reações liquenoides orais (RLO) são lesões que apresentam características clínicas e histopatológicas que se assemelham ao LPO, sendo sua etiopatogenia ligada a utilização de medicamentos ou reações diversas de hipersensibilidade. **Objetivo:** Avaliar quantitativamente a imunoexpressão de CD4, CD8, galectinas-1, -3 e -7 em casos de LPO e RLO, associando-a com parâmetros clínicos (sexo, idade, etnia, localização anatômica das lesões e subtipo clínico) e morfológicos (tipo de epitélio, presença de corpos de Civatte, centros germinativos, espessura do epitélio e da banda linfocitária subepitelial). **Material e métodos:** Foram avaliados 33 casos de LPO, categorizados em 23 casos de LPO reticular e 10 casos LPO erosivo, além de 04 casos de RLO. Para avaliação dos parâmetros clínicos foram utilizadas as fichas dos Laboratórios de Histopatologia Oral da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A avaliação morfológica foi realizada sob microscopia de luz por dois examinadores previamente calibrados, através do programa ImageJ foi realizada uma análise quantitativa da espessura em micrômetros do epitélio e banda linfocitária subepitelial ao longo de 05 campos consecutivos foram feitas 03 mensurações por campo. Para análise imunoistoquímica, utilizou-se a média de positividade das células imunoinflamatórias para os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 e avaliação do índice de positividade para os anticorpos anti-galectina-1, -3 e -7. Para análise estatística, foram realizados os testes Exato de Fisher e Mann-Whitney ($p < 0,05$). **Resultados:** Morfologicamente, os casos de LPO se destacam epitélio hiperplásico (19/33; 57,6%) e presença de corpos de Civatte (24/33; 72,7%), enquanto os casos de RLO apresentam maior prevalência de centros germinativos (03/04; 75,0%) ($p = 0,002$). A espessura do tecido epitelial foi maior nos casos de LPO com mediana de 483,47 μm (384,81 – 699,83) ($p = 0,019$), embora não tenha ocorrido diferença estatisticamente significativa entre a espessura da banda linfocitária subepitelial ($p > 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre imunoexpressão de CD4+ e CD8+ nos casos de LPO e RLO ($p > 0,05$), embora o subtipo erosivo de LPO demonstrou maior imunoexpressão de CD4+ ($p = 0,055$). A galectina-1 apresentou maior imunoexpressão citoplasmática nos casos de RLO ($p = 0,011$). A imunoexpressão nuclear e citoplasmática de galectina-3 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os casos de LPO e RLO, bem como entre os subtipos clínicos reticular e erosivo de LPO ($p > 0,05$). Não houve imunoexpressão da galectina-7 nas

células imunes nos casos de LPO e RLO. Houve uma correlação positiva da imunexpressão de CD4 e CD8 nos casos de LPO ($r=0,441$; $p=0,010$) e LPO reticular ($r=0,520$; $p=0,006$), bem como correção de galectina-1 citoplasmática e nuclear para o LPO reticular ($r=0,619$; $p=0,003$) e erosivo ($r=0,623$; $p=0,043$), bem como correlação de galectina-3 citoplasmática e nuclear para o LPO erosivo ($r=0,839$; $p=0,003$). **Conclusão:** Uma menor espessura do tecido epitelial e a presença de centros germinativos são importantes para o diagnóstico diferencial da RLO. Um maior nível de CD4+ no LPO erosivo pode apontar um possível papel na diferenciação de subpopulações de linfócitos nesses casos. Os linfócitos T CD8+ exercem um papel direto na resposta imune do LPO e da RLO. As galectina-1 e -3 participam da modulação da resposta imune do LPO e da RLO, sugerindo uma possível participação da galectina-1 citoplasmática na via pró-apoptótica de linfócitos.

Palavras-chave: líquen plano oral; reação liquenoide oral; CD4; CD8; galectinas.

ABSTRACT

Introduction: Oral lichen planus (OLP) is a chronic inflammatory disorder that affects oral mucosa and sometimes skin, characterized by an immune response mediated by T lymphocytes to keratinocytes present in epithelial tissue, and its etiology is uncertain. Meanwhile, oral lichenoid reactions (OLR) are lesions that present clinical and histopathological characteristics that resemble OLP, and their etiopathogenesis is linked to use of drugs or hypersensitivity reactions. **Objective:** Quantitatively evaluate the immunoeexpression of CD4, CD8, galectins-1, -3 and -7 in cases of OLP and OLR, associating it with clinical parameters (sex, age, ethnicity, anatomical location of lesions and clinical subtype) and morphological (type of epithelium, presence of Civatte bodies, germinal centers, thickness of epithelium and subepithelial lymphocyte band). **Material and methods:** We evaluated 33 cases of OLP, categorized into 23 cases of reticular OLP and 10 cases of erosive OLP, in addition to 04 cases of OLR. To evaluate clinical parameters, records of the Oral Histopathology Laboratories of the Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) and Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) were used. Morphological evaluation was performed under light microscopy by two previously calibrated examiners, through the ImageJ program, a quantitative analysis of thickness in micrometers of the epithelium and subepithelial lymphocytic band was performed over 05 consecutive fields, 03 measurements were made per field. For immunohistochemical analysis, we used the mean positivity for anti-CD4 and anti-CD8 antibodies, and evaluation of the positivity index for anti-galectins-1, -3 and -7 antibodies in immunoinflammatory cells. For statistical analysis, Fisher's Exact and Mann-Whitney tests were performed ($p < 0.05$). **Results:** Morphologically, cases of OLP stand out for hyperplastic epithelium (19/33; 57.6%) and presence of Civatte bodies (24/33; 72.7%), while cases of OLR have a higher prevalence of germinal centers (03 /04; 75.0%) ($p = 0.002$). Thickness of epithelial tissue was greater in cases of OLP with a median of 483.47 μm (384.81 – 699.83) ($p = 0.019$), although there was no statistically significant difference between thickness of subepithelial lymphocyte band ($p > 0.05$). There was no statistically significant difference between CD4+ and CD8+ immunoeexpression in OLP and OLR cases ($p > 0.05$), although erosive subtype of OLP showed higher CD4+ immunoeexpression ($p = 0.055$). Galectin-1 showed higher cytoplasmic immunoeexpression in OLR cases ($p = 0.011$). Nuclear and cytoplasmic immunoeexpression of galectin-3 showed no statistically significant difference between OLP and OLR cases, as well as between the reticular and erosive clinical subtypes of OLP ($p > 0.05$). There was no immunoeexpression of galectin-7 in immune cells in cases of OLP and OLR. There was a

positive correlation of CD4 and CD8 immunoreexpression in cases of OLP ($r=0.441$; $p=0.010$) and reticular OLP ($r=0.520$; $p=0.006$), as well as correlation of cytoplasmic and nuclear galectin-1 for reticular OLP ($r=0.619$; $p=0.003$) and erosive ($r=0.623$; $p=0.043$), as well as correlation of cytoplasmic and nuclear galectin-3 for erosive LPO ($r=0.839$; $p=0.003$). **Conclusions:** A thinner epithelial tissue thickness and the presence of germinal centers are important for the diagnosis of OLR. A higher level of CD4+ in erosive LPO may point to a possible role in the differentiation of lymphocyte subpopulations in these cases. Galectin-1 and -3 participate in the modulation of the immune response of LPO and OLR, and the cytoplasmic immunoreexpression of galectin-1 is a possible mercury-mediated pro-apoptotic lymphocyte pathway. Galectin-7 does not play a direct mechanism in the immune response of LPO and OLR.

Keywords: Oral lichen planus; oral lichenoid reaction; CD4; CD8; galectin.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Quadro de variáveis dependentes do estudo.....	32
Quadro 2-	Quadro de variáveis independentes do estudo.....	33
Quadro 3-	Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de recuperação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Fotomicrografia demonstrando a mensurações por campo da espessura do epitélio e da banda linfocitária subepitelial em micrômetros (HE, 100X)..... 34
- Figura 2-** (A) Fotomicrografia de LPO evidenciando tecido epitelial hiperplásico com banda linfocitária subepitelial evidente (HE, 40x). (B) Imunoexpressão de galectina-1 em LPO, evidenciando imunomarcacão nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 40x). (C) Imunoexpressão de galectina-3 em LPO, evidenciando imunomarcacão nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 40x). (D) Imunoexpressão de galectina-7 em LPO, evidenciando imunomarcacão no tecido epitelial (ADVANCE, 40x). (E) Imunoexpressão de CD4 em LPO, evidenciando imunomarcacão nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 400x). (F) Imunoexpressão de CD8 em LPO, evidenciando imunomarcacão nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 400x). (G) Fotomicrografia de RLO evidenciando tecido epitelial atrófico e área semelhante a centro germinativo (HE, 40x). (H) Imunoexpressão de galectina-1 em RLO, evidenciando imunomarcacão nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 40x). (I) Imunoexpressão de galectina-3 em RLO, evidenciando imunomarcacão nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 40x). (J) Imunoexpressão de galectina-7 em RLO, evidenciando imunomarcacão no tecido epitelial (ADVANCE, 40x). (K) Imunoexpressão de CD4 em RLO, evidenciando imunomarcacão nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 400x). (L) Imunoexpressão de CD8 em RLO, evidenciando imunomarcacão nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 400x)..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos casos de LPO e RL de acordo com as características clínico-morfológicos.....	54
Tabela 2	Relação dos grupos de lesões com as características morfológicas.....	55
Tabela 3	Relação dos subtipos de LPO com as características morfológicas.....	55
Tabela 4	Comparação da imunoexpressões do CD4, CD8 e galectinas-1 e -3 em relação aos casos de LPO e RLO.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOMP	Referente ao inglês <i>American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology</i> , traduzido como Academia Americana de Patologia Buco-Maxilo-Facial
Akt	Referente ao inglês <i>protein kinase B</i> , traduzido como proteína quinase B
BSA	Referente ao inglês <i>Bovine Serum Albumin</i> , traduzido como albumina sérica bovina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
CCEL	Carcinoma de células escamosas de língua
CCEO	Carcinoma de células escamosas oral
CD	Referente ao inglês <i>Cluster of Differentiation</i> , traduzido como grupamento de diferenciação
CP	Cisto Periapical
CPR	Cisto Periapical Residual
DAB	3,3' diaminobenzidina tetrahydrocloroeto
DEO	Displasia epitelial oral
DRCs	Domínio de reconhecimento de carboidratos
ELISA	Referente ao inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> , traduzido como ensaio de imunoabsorção enzimática
FAPESQ-PB	Fundação de Apoio à Pesquisa da Paraíba
FOXP3	Referente ao inglês <i>Transcription Factor Forkhead Box P3</i> , traduzido como fator de transcrição Forkhead box P3
GP	Granuloma Periapical
p-IGF1R	Referente ao inglês <i>phosphorylated insulin-like growth factor 1 receptor</i> , traduzido como receptor de fator 1 de crescimento semelhante à insulina fosforilado
IL	Interleucina
IP	Índice de positividade
INF-γ	Referente ao inglês <i>Interferon-γ</i> , traduzido como interferon- γ
LP	Líquen Plano
LPO	Líquen Plano Oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Lesões liquenoides orais	20
1.1.1	<i>Liquen plano oral</i>	20
1.1.2	<i>Reações liquenoides orais</i>	22
1.2	Regulação da resposta imune no liquen plano oral e reação liquenoide oral	23
1.3	Galectinas	25
1.4	Galectinas em lesões autoimunes	28
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivos Específicos	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Considerações Éticas	31
3.2	Caracterização do Estudo	31
3.3	População e amostra	31
3.3.1	<i>Critérios de inclusão</i>	31
3.3.2	<i>Critérios de exclusão</i>	32
3.4	Variáveis do estudo	32
3.5	Estudo clínico-morfológico	33
3.6	Estudo imunoistoquímico	34
3.6.1	<i>Método imunoistoquímico</i>	34
3.6.2	<i>Análise Quantitativa</i>	36
3.7	Análise estatística	37
4	ARTIGO	39
4.1	Apresentação	39
4.2	Artigo a ser submetido	40
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE A - Ficha para coleta de dados referente à análise clínica dos casos de LPO e RLO.....	64
	APÊNDICE B – Ficha para coleta de dados referente à análise do número de células imunomarcadas pelos anticorpos CD4, CD8, galectinas-1, -3, e -7, em LPO e RLO.....	65
	ANEXO A – Parecer de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual da Paraíba.....	66
	ANEXO B – Normas da revista.....	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lesões liquenoides orais

As lesões liquenoides orais (LLO) compreendem um grupo de desordens mucocutâneas que apresentam similaridade de características clínicas e histopatológicas (CHENG *et al.*, 2016; MÜLLER *et al.*, 2017; CARROZZO *et al.*, 2019; LU e ZHOU, 2021). As LLO apresentam etiopatogenia incerta, sendo atribuídas alterações genéticas, hormonais, psicológicas, medicamentosas, bem como o contato com substâncias extrínsecas. A fisiopatologia das LLO é caracterizada por uma resposta de células T e B ativadas mediada por antígenos extrínsecos, autoantígenos ou uma super expressão de antígenos. Dentre as lesões liquenoides estão o líquen plano oral, líquen penfigoide, líquen esclerótico, reação liquenoide por contato, reação liquenoide induzida por drogas, lúpus eritematoso sistêmico e discoide, estomatite ulcerativa crônica, eritema multiforme, doença do enxerto vs. hospedeiro e pênfigo paraneoplásico (CHENG *et al.*, 2016; CARROZZO *et al.*, 2019; LU e ZHOU, 2021).

1.1.1 Líquen plano oral

O líquen plano (LP) é uma desordem mucocutânea de origem autoimune que pode acometer a pele, mucosas, unhas e folículos pilosos (GOROUHI, DAVARI e FAZEL, 2014; NOGUEIRA, CARNEIRO e RAMOS-E-SILVA, 2015; BAKHTIARI *et al.*, 2017; SOLIMANI *et al.*, 2021), com uma prevalência global estimada em 0,22% a 5% (GOROUHI, DAVARI e FAZEL, 2014; OLSON, ROGERS e BRUCE, 2016; SOLIMANI *et al.*, 2021). A descrição clínica inicial do LP foi atribuída a Ferdinand Ritter von Hebra, que em 1860 utilizou o termo “lichen ruber planus”. A definição clínica foi redefinida através do trabalho de Erasmus Wilson e Moritz Kaposi, sendo os primeiros a simplificar o nome para “líquen plano”. Wilson em 1866 relatou o primeiro caso de líquen plano oral (LPO) em uma mulher de 56 anos. Anos depois, Louis Wickham, em 1895, caracterizou as estriações brancas no LP cutâneo. É útil reconhecer que desde o momento da sua identificação inicial, o LPO foi discutido, estudado e diagnosticado por 40 anos como um distúrbio clínico sem qualquer caracterização histopatológica, uma vez que microscopicamente esta ainda não havia sido delineada até o trabalho de William Dubreuilh em 1906 (CHENG *et al.*, 2016; SOLIMANI *et al.*, 2021).

O LPO representa 0,4% a 5,81% de todas as lesões orais (SHET *et al.*, 2013; BAKHTIARI *et al.*, 2017; HALLIKERI *et al.*, 2018; KANSKY *et al.*, 2018; GONZÁLEZ-

MOLES *et al.*, 2021), com um risco de transformação maligna estimada entre 0,7-1,37% (AGHBARI *et al.*, 2017; GIULIANI *et al.*, 2019; TSUSHIMA *et al.*, 2021). Dentre os indivíduos mais acometidos pelo LPO estão mulheres acima da quinta década de vida, expostas à fatores de risco como tabaco e álcool, sendo a mucosa jugal a localização mais prevalente, embora qualquer outra localização na cavidade oral possa ser acometida (DI STASIO *et al.*, 2014; GOROUHI, DAVARI e FAZEL, 2014; NOGUEIRA, CARNEIRO e RAMOS-E-SILVA, 2015; GONZÁLEZ-MOLES *et al.*, 2021).

Seis tipos clínicos de LPO são relatados: reticular, erosivo, atrófico, papular, em placa e bolhoso (GOROUHI, DAVARI e FAZEL, 2014; CHENG *et al.*, 2016; BAKHTIARI *et al.*, 2017; CARROZZO *et al.*, 2019), sendo o subtipo reticular o mais prevalente (GOROUHI, DAVARI e FAZEL, 2014; GONZÁLEZ-MOLES *et al.*, 2021), apresentando como aspecto clínico característico um rendilhado entrelaçado de linhas ceratóticas conhecidas como “estrias de Wickham”, as quais se apresentam tipicamente simétricas e bilaterais (KALMAR, 2007; USATINE *et al.*, 2011; SOLIMANI *et al.*, 2021). Embora menos comum que o tipo reticular, a forma erosiva está associada a sintomatologia dolorosa, sendo de maneira geral lesões difusas, avermelhadas, ulceradas e apresentando estrias ceratóticas circundando-as. Essas estrias irradiam perifericamente e são usualmente evidentes nas margens das zonas atróficas da lesão (ALRASHDAN, CIRILLO e MCCULLOUGH, 2016; GONZÁLEZ-MOLES *et al.*, 2021).

A primeira classificação adotada pela OMS para o LPO ocorreu em 1978, utilizando como critérios diagnósticos aspectos clínicos e histopatológicos. Como critérios clínicos destacou-se a presença de múltiplas lesões, com distribuição simétrica, bem como a apresentação clínica dos subtipos reticular, papular, erosivo e bolhoso. Histopatologicamente caracterizou-se o revestimento epitelial (orto ou paraceratina), as cristas epiteliais em dentes de serra, corpos de Civatte, material eosinofílico na membrana basal, uma zona de infiltração, semelhante à banda, confinada à lâmina própria superficial, constituída principalmente por linfócitos, por fim, degeneração por liquefação na camada basal (KRAMER *et al.*, 1978).

Os critérios de diagnósticos do LPO foram revistos pela OMS em 2003, sendo destacados nos aspectos clínicos que as lesões erosivas, atróficas, bolhosas e de placa só seriam aceitas como um subtipo na presença de lesões reticulares em outras partes da mucosa bucal. Histopatologicamente os critérios diagnósticos restringiam-se apenas a presença de uma zona de infiltração, semelhante à banda, confinada à lâmina própria superficial, constituída principalmente por linfócitos, e a degeneração por liquefação na camada basal (VAN DER MEIJ e VAN DER WAAL, 2003).

Mais recentemente a American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology (AAOMP) propôs critérios clínicos e histopatológicos para o diagnóstico do LPO. Dentre os critérios clínicos a distribuição multifocal e simétrica das lesões, lesões brancas ou vermelhas apresentando os padrões reticular/papular, atrófico ou eritematoso, erosivo ou ulcerativo, em placa e bolhoso, além de as lesões não serem restritas a localizações de quem usa tabaco sem fumaça, ou serem exclusivamente adjacentes e em contato com restaurações dentárias, o início da lesão não se correlaciona com o início de um medicamento ou ao uso de produtos contendo canela. Histopatologicamente utilizou-se como critérios a presença de um infiltrado predominantemente linfocitário, semelhante a uma banda ou irregular, na lâmina própria confinada à interface epitélio/lâmina própria, degeneração liquefativa das células da camada basal, exocitose linfocítica, ausência de displasia epitelial, bem como de alteração verrucosa na arquitetura epitelial (CHENG *et al.*, 2016).

Outro ponto de discussão na literatura refere-se a etiopatogenia do LPO, diversos fatores já foram estudados como os intrínsecos aos indivíduos como alterações genéticas (GHAPANCHI *et al.*, 2019), expressão de proteínas pelas células epiteliais (ROOPASHREE *et al.*, 2010; OLSON, ROGERS e BRUCE, 2016), deficiência de vitaminas (Chen *et al.*, 2015), doenças crônicas (MANKAPURE *et al.*, 2016; VARGHESE *et al.*, 2016), bem como fatores psicológicos como estresse e sono (KAWADA, 2015; CERQUEIRA *et al.*, 2018), fatores extrínsecos como o uso de drogas (RIMKEVIČIUS *et al.*, 2017), agentes infecciosos (NOGUEIRA, CARNEIRO e RAMOS-E-SILVA, 2015; ALAIZARI *et al.*, 2016) e hábitos nocivos (MANKAPURE *et al.*, 2016; RIMKEVIČIUS *et al.*, 2017; GONZÁLEZ-MOLES *et al.*, 2021), embora sua etiopatogenia ainda seja incerta.

1.1.2 Reações liquenoides orais

As reações liquenoides orais (RLO) são lesões que se desenvolvem a partir de reações de hipersensibilidade ou utilização de medicamentos, assemelhando-se clinicamente ao LPO. As RLO são por vezes lesões uni ou bilaterais, acometendo mais comumente em indivíduos adultos. O amálgama dentário, o mentol e o eugenol são alguns dos materiais que estão associado ao desenvolvimento de RLO por hipersensibilidade. Na cavidade oral as principais localizações afetadas são a língua e a mucosa jugal. A associação ao período de exposição e a remoção do fator causal com remissão da lesão são os principais aspectos para o diagnóstico das RLO. Histopatologicamente as RLO também se assemelham ao LPO, embora com algumas diferenças como maior número de ceratinócitos apoptóticos (corpos de Civatte) que o LPO, um

infiltrado inflamatório difuso com presença de plasmócitos e eosinófilos, infiltrado inflamatório estende-se mais profundamente na lâmina própria, presença de infiltrado inflamatório perivascular e para os casos de RLO por hipersensibilidade a presença de folículos linfoides (CHENG *et al.*, 2016; CARROZZO *et al.*, 2019; LU e ZHOU, 2021).

1.2 Regulação da resposta imune no líquen plano oral e reação liquenoide oral

O LPO é uma doença autoimune relativamente comum, embora sua patogênese não seja totalmente conhecida acredita-se que o sistema imune desempenha um importante papel na sua regulação (FIRTH *et al.*, 2015; YANG, WANG e ZHOU, 2022). A expressão de antígenos pelos ceratinócitos da camada basal promove uma resposta citotóxica autoimune mediada por linfócitos T CD8+, promovendo a liberação de quimiocinas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ (INF- γ) responsáveis pela degradação dos ceratinócitos (ROOPASHREE *et al.*, 2010; FIRTH *et al.*, 2015; ENOMOTO *et al.*, 2017; KARA, 2018; YANG, WANG e ZHOU, 2022). Outro importante fator de regulação deste processo são os linfócitos T CD4+ que expressam o fator de transcrição Forkhead box P3 (FoxP3+) atuando como fator anti-inflamatório, bem como dos linfócitos Th17 que são promotores da inflamação através da expressão de interleucina-17 (IL-17) (FIRTH *et al.*, 2015; ENOMOTO *et al.*, 2017; YANG, WANG e ZHOU, 2022). Diante deste contexto, diversos estudos são realizados com intuito de avaliar essa resposta citotóxica mediada pelos linfócitos T CD8+ e T CD4+ no LPO.

Enomoto *et al.* (2017) investigaram a imunoexpressão de linfócitos T CD8+ e T CD4+, intra e subepiteliais, em 123 casos de LPO, divididos em grupos com e sem recidiva. Como resultados, observaram associação significativa para os casos de remissão com alta imunoexpressão intraepitelial de linfócitos T CD8+ e T CD4+, sugerindo, assim, uma resposta imune citotóxica no LPO. Como conclusão, acrescentam que os linfócitos T CD8+ intraepiteliais podem ser utilizados como biomarcadores marcadores preditivos para casos de remissão de LPO, estando, assim, associados a melhores prognósticos da lesão.

Em um estudo semelhante, Flores-Hidalgo *et al.* (2019) avaliaram a imunoexpressão e distribuição de linfócitos T CD8+ e T CD4+ infiltrantes intraepiteliais em 05 casos de displasia epitelial oral (DEO) moderada a severa, 05 casos de LPO e 05 casos de mucosa oral. E como resultados não observaram diferenças na quantidade e proporção de linfócitos T CD8+/T CD4+ nos três grupos analisados, no entanto, a presença de linfócitos T CD8+ infiltrantes intraepiteliais foi maior no LPO, sugerindo, assim que a distribuição da imunoexpressão de linfócitos T CD8+ intraepiteliais pode auxiliar a diferenciar o LPO das DEOs.

De Camargo *et al.* (2019) avaliaram a imunexpressão de linfócitos T CD8+ e linfócitos FOXP3+ em 11 casos de LPO associados a hepatite C, comparando-a em 19 casos de LPO idiopáticos e verificaram que não houve diferenças estatisticamente significante na imunexpressão de linfócitos T CD8+ e linfócitos FOXP3+ nos grupos avaliados, embora para o subtipo erosivo/atrófico dos casos de LPO associados a hepatite C observou-se diferença significativa quanto a imunexpressão de linfócitos T CD8+ por mm² e na proporção de linfócitos T CD8+/FOXP3+ por mm². Sugere-se assim que os casos erosivos de LPO associados a hepatite C apresentam maior proporção de T CD8+ e menor FOXP3+ devido a inflamação crônica mediada pelo vírus da hepatite C.

Yang, Wang e Zhou (2022) avaliaram através da citometria de fluxo do sangue periférico a frequência de linfócitos T CD4+ e T CD8+ de 20 pacientes com LPO em quadros graves. A avaliação demonstrou uma maior frequência de linfócitos T CD4+ comparado aos de linfócitos T CD8+, sendo sugerido deste modo que redução de linfócitos T CD8+ esteja relacionado a gravidade da doença.

Outro ponto que também é bastante investigado é a participação das citocinas na regulação da resposta imune do LPO. Firth *et al.* (2015) avaliaram a imunexpressão dos linfócitos FoxP3+ e da IL-17 em 17 casos de LPO e em 12 casos correspondentes a processos inflamatórios orais não específicos, e identificaram menor imunexpressão da IL-17 nos casos de LPO (1,05 células/mm²) comparado ao grupo controle (3,30 células/mm²), e maior imunexpressão do FoxP3+ nos casos de LPO (79,3 células/mm²) comparado ao grupo controle (20,6 células/mm²). Através da técnica da imunofluorescência observaram que as células IL-17+ correspondiam aos mastócitos. Baseado nisso, os resultados demonstram que essa desregulação na resposta imune local do LPO é importante na patogênese do LPO, e que o papel dos mastócitos deve ser melhor elucidado.

Kara (2018) avaliou os níveis séricos de TNF- α em indivíduos saudáveis e indivíduos com LP, e observou valores mais elevados de TNF- α nos casos de LP (64,03 pg/ml) em comparação aos indivíduos saudáveis (35,32 pg/ml). Os pacientes que não apresentavam lesões orais tinham maior média de TNF- α (68,25 pg/ml) quando comparados aos que apresentavam lesões orais (52,29 pg/ml). Esses resultados sugerem, portanto, que o TNF- α desempenha importante papel na patogênese do LP.

Mozaffari *et al.* (2018), através de uma revisão sistemática e meta-análise, avaliaram os níveis sérico e salivar de interleucina-8 (IL-8) em pacientes com LPO em comparação a pacientes saudáveis e observaram diferença significativa dos níveis sérico (média= 8,38 pg/ml)

e salivar (média= 766,32 pg/ml) de IL-8 nos pacientes com LPO quando comparados ao grupo controle, sugerindo, então, que a mensuração salivar da IL-8 pode ser um fator de mensuração melhor que os níveis séricos para o diagnóstico e avaliação do tratamento do LPO.

Mozaffari *et al.* (2019), através de outra revisão sistemática e meta-análise, analisaram os níveis sérico e salivar de interferon- γ (INF- γ) em pacientes com LPO em comparação a pacientes saudáveis, e identificaram que não houve diferença estatística entre os níveis sérico e salivar do INF- γ nos casos de LPO e pacientes saudáveis, bem como não se observou diferença estatística quanto aos subtipos reticular e erosivo. Deste modo, os autores sugerem que o INF- γ não exibe papel importante para a patogênese do LPO.

Ma, Tan e Zhou (2019) avaliaram a participação do p-IGF1R e TRB3 na patogênese da resposta imune do LPO em comparação a indivíduos saudáveis, através de análise imunistoquímica e cultivo celular, e identificaram que a expressão de p-IGF1R e TRB3 foi significativamente aumentada nos casos de LPO. As células T tratadas com rapamicina exibiram uma taxa de apoptose aumentada e promoveram a proliferação de ceratinócitos no sistema de co-cultura. Observou-se também, uma expressão anormal de IFN- γ e IL-4 no sobrenadante da célula T isolada e no sistema de co-cultura em resposta aos moduladores farmacológicos da via IGF1-PI3K/MTOR. Os autores sugerem que a sinalização aberrante do IGF1-PI3K/AKT/MTOR pode participar do mecanismo imunorregulatório do LPO, via regulação do crosstalk (diafonia) entre células T e ceratinócitos, bem como redes desequilibradas de citocinas.

1.3 Galectinas

As galectinas constituem uma família de lectinas animais, que exibe uma sequência permanente de domínio de reconhecimento de carboidratos (DRCs) constituída por aproximadamente 130 aminoácidos, com afinidade por β -galactosídeos. Em mamíferos, essa família de lectinas é constituída por 15 tipos de galectinas, classificadas em três subgrupos, de acordo com a organização dos DRCs: As galectinas prototípicas, que possuem um único DRC (galectinas -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15), as galectinas tipo tandem repetido que contém 2 DRCs homólogos em uma única cadeia polipeptídica (galectinas -4, -6, -8, -9 e -12). E a galectina-3 ou do tipo quimera que possui uma região N terminal não-lectina conectada a 1 DRC (SONG *et al.*, 2014; COUSIN e CLONINGER, 2016; KAUR *et al.*, 2016; THIEMANN e BAUM, 2016; BRINCHMANN, PATEL e IVERSEN, 2018). As galectinas são multifuncionais atuando em processos como a homeostasia celular durante os processos

inflamatórios inato e adaptativo, regulando processos como a sobrevivência das células, sinalização, quimiotaxia, secreção de citocina, crescimento celular, mediando a interação célula-célula, célula-matriz (SONG *et al.*, 2014; COUSIN e CLONINGER, 2016; KAUR *et al.*, 2016; THIEMANN e BAUM, 2016; BRITO *et al.*, 2018).

Dentre as galectinas mais estudadas destacam-se as galectinas-1, -3 e -7. A galectina-1 é uma proteína homodimérica não covalente de 14kDa, com sítio ligante à galactosina que preferencialmente reconhece carboidratos de superfície celular. A galectina-3, um produto gênico quimérico de 31kDa, é uma lectina intracelular e extracelular, que interage com glicoproteínas da matriz extracelular, sendo seu papel bastante discutido dependendo da sua localização celular. Na resposta imune, a galectina-3 quando localizada na membrana celular apresenta um papel pró-apoptótico, visto que sua localização citoplasmática e nuclear está associada a um papel anti-apoptótico. A galectina-7 é uma lectina animal, de 15 kDa, com afinidade por β -galactosídeos que é expressa predominantemente no tecido epitelial estratificado, embora também possa ser expressa por células imunes estando associado a um papel pró-apoptótico levando a morte das células T (FARHADI e HUDALLA, 2016; THIEMANN e BAUM, 2016; BRINCHMANN, PATEL e IVERSEN, 2018; BRINCHMANN, PATEL e IVERSEN, 2018; BRITO *et al.*, 2018).

A participação das galectinas tem sido bastante investigada em neoplasias malignas como câncer de mama (TOPCU *et al.*, 2018), bexiga (ZEINALI *et al.*, 2015), tireoide (ARCOLIA *et al.*, 2017), bem como cabeça e pescoço (Alves *et al.*, 2011; VALACH *et al.*, 2012; MESQUITA *et al.*, 2016). Alves *et al.* (2011) avaliaram a imunoeexpressão das galectinas-1, -3, -4 e -7 em casos de carcinoma de células escamosas de língua (CCEL) afim de entender se estas proteínas atuavam na regulação do comportamento biológico das lesões. Os resultados demonstraram que a imunoeexpressão das galectinas-1 e -3 apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a metástase, as galectinas-3 e -7 em relação a grau histológico de malignidade e apenas a galectina-1 em relação ao estadiamento clínico dos tumores, sugere-se então que as galectinas-1, -3 e -7 participam do processo da carcinogênese e podem ser utilizados como possíveis marcadores do comportamento biológico do CCEL. Levando em consideração a idade dos pacientes, Mesquita *et al.* (2016) avaliaram a imunoeexpressão das galectinas-3 e -7 em casos de carcinoma de células escamosas oral (CCEO) em indivíduos jovens (≤ 45 anos de idade) e verificaram que apenas a galectina-7 exibiu associação estatisticamente significativa com o grau histológico de malignidade dos tumores, sugerindo deste modo que a galectina-7 pode ser um marcador de comportamento biológico e progressão tumoral para o CCEO em pacientes jovens.

Além das neoplasias malignas, a imunoe expressão das galectinas-1, -3 e -7 foram investigadas em desordens potencialmente malignas orais como displasias epiteliais (DE VASCONCELOS CARVALHO *et al.*, 2013), leucoplasias (MUNIZ *et al.*, 2015), queilite actínica (LOPES *et al.*, 2016) e LPO (MUNIZ *et al.*, 2015). De Vasconcelos Carvalho *et al.* (2013) avaliaram a imunoe expressão das galectinas-1, -3 e -7 em 50 casos de displasia epitelial oral (DEO), classificados em baixo (21 casos) e alto (29 casos) risco de transformação maligna, em comparação a mucosa oral normal (5 casos). Observou-se que as galectinas-1, -3 e -7 apresentaram uma imunoe expressão nuclear e citoplasmática em todos os casos de baixo e alto risco. As galectinas-1 e -3 exibiram imunoe expressão nos terços médio e inferior das DEO, enquanto a galectina-7 foi encontrada predominantemente nos terços médio e superior das DEO, sugerindo assim essas galectinas participam da progressão das DEO.

De maneira semelhante, Lopes *et al.* (2016) avaliaram a imunoe expressão epitelial das galectinas-1, -3, -7 e -9 em 65 casos de queilite actínica, categorizados como baixo risco (40 casos) e alto risco (25 casos) de transformação maligna. Observou-se imunopositividade para as quatro galectinas estudadas na maioria dos casos, onde a galectina-3 citoplasmática exibiu maior imunoe expressão significativa nos casos de risco e a galectina-9 nuclear e citoplasmática exibiu maior imunoe expressão significativa nos casos de baixo risco, assim sugere-se que as galectinas estão envolvidas na patogênese e progressão morfológica da queilite actínica, em especial as galectinas-3 e -9.

O papel imunomodulatório das galectinas também tem sido investigado em lesões periapicais de origem odontogênica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; BRITO *et al.*, 2018). De Oliveira *et al.* (2014) avaliaram a imunoe expressão dos receptores Toll-like-2 e -4 (TLR-2 e -4) e das galectinas-3 e -9 em cistos periapicais (CP), granulomas periapicais (GP) e um grupo controle de polpa dentária livre de inflamação, e observaram maior imunoe expressão das galectinas-3 e -9 e TLR-2 nos GP e CP comparado ao grupo controle, maior imunoe expressão das galectinas-3 e -9 nos GP que nos CP, e maior imunoe expressão de TLR- 2 e 4 nos casos de GP com trato sinusal do que nos casos sem trato sinusal. Sugerindo, desta forma, que a imunoe expressão das galectinas-3 e -9, bem como dos TLR-2 e -4 nos GP e CP está associada à inflamação periapical reativa sendo importante moduladores nas lesões inflamatórias periapicais.

Brito *et al.* (2018) também avaliaram a imunoe expressão das galectinas-1, -3 e -7 nas células imunes e epiteliais de lesões periapicais (GP, CP e cisto periapical residual - CPR). Observou-se diferença significativa entre a imunoe expressão citoplasmática/membranar das galectinas-1 e -7 nos casos de GP quando comparado aos casos de CP e CPR, o mesmo foi

constatado para imunexpressão nuclear da galectinas-1. A imunomarcagem da galectina-1 e -7 foi maior nos casos de infiltrados inflamatórios intensos (grau III). Além disso, observou-se uma correlação positiva entre a imunexpressão nuclear e citoplasmática/membranar da galectina-1 no tecido conjuntivo destas lesões. Com base no exposto, sugere-se que as galectinas-1 e -7 participam na patogênese das lesões periapicais.

1.4 Galectinas em lesões autoimunes

No que diz respeito a avaliação da resposta imune das galectinas no LPO, os estudos ainda são bastante escassos (MUNIZ *et al.*, 2017; GALPACHI *et al.*, 2019). Muniz *et al.* (2017) avaliaram a imunexpressão destas proteínas entre casos de carcinoma de células escamosas orais (CCEO), desordens potencialmente malignas (leucoplasias e LPO), fragmentos de mucosa oral normal e observaram que houve significativa imunexpressão apenas da galectina-9 nos casos de CCEO, comparado aos demais casos da amostra. Também se observou diferença estatisticamente significativa para a imunexpressão da metaloproteinase da matriz-3 nos casos de LPO quando comparados às leucoplasias. Sugeriu-se que a galectina-9 pode ser um marcador para diferenciar o CCEO das demais lesões orais, bem como esta lectina animal pode atuar na modulação negativa de células Th1 e indução de células Treg que por sua vez ativam a via do TGF- β .

Corrêa *et al.* (2022) avaliaram a imunexpressão de galectinas-1 e -3 na resposta imune em 10 casos de psoríase e 09 casos de dermatite atópica, bem como a aplicação de possíveis terapias anti-inflamatórias voltadas para estas lectinas. Observou-se imunopositividade de galectinas-1 e -3 no infiltrado inflamatório dos casos de psoríase e dermatite atópica, bem como uma localização citoplasmática e nuclear. Os autores destacam que as galectinas-1 e -3 desempenhem papéis antagônicos, sendo a galectina-1 associada a um papel anti-inflamatório e a galectina-3 pró-inflamatório. Deste modo, sugere-se que as galectinas-1 e -3 podem ser utilizadas possíveis vias terapêuticas anti-inflamatórias para a psoríase e dermatite atópica.

Galpachi *et al.* (2019) avaliaram, por meio da técnica de ELISA (ensaio de imun absorção enzimática), os níveis séricos da galectina-3 entre indivíduos saudáveis e indivíduos com LPO reticular e erosivo, observando diferença estatisticamente significativa entre os níveis de galectina-3 nos indivíduos com LPO ($3,1 \pm 1,1$ ng/ml) em comparação os indivíduos saudáveis ($1,1 \pm 0,4$ ng/ml), e também com diferença significativa em relação ao subtipo reticular ($1,9 \pm 1,4$ ng/ml) e erosivo ($3,9 \pm 2,1$ ng/ml). Os autores sugerem que a mensuração dos níveis séricos de galectina-3 pode ser utilizada como um importante fator no

diagnóstico de LPO, além de que, a galectina-3 pode estar envolvida na diferenciação dos subtipos erosivo e reticular do LPO.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar quantitativamente a imunexpressão de CD4, CD8, galectinas-1, -3 e -7 em casos de LPO e RLO, associando-a com parâmetros clínicos, histológicos e histomorfométricos.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os aspectos clínicos (sexo, idade, etnia, localização anatômica das lesões e subtipo clínico) dos casos de LPO e RLO;
- Avaliar os aspectos histopatológicos dos casos de LPO e RLO de forma qualitativa (tipo de epitélio, presença de corpos de Civatte e centros germinativos) e quantitativa (histomorfometria da espessura do epitélio e da banda linfocitária subepitelial);
- Avaliar a imunexpressão do CD4, CD8, galectinas-1, -3 e -7 nas células imunoinflamatórias subepitelial nos casos de LPO e RLO;
- Associar a imunexpressão do CD4, CD8, galectinas-1, -3 e -7 com parâmetros clínicos, histológicos e histomorfométricos nos casos de LPO e RLO;
- Correlacionar a imunexpressão do CD4, CD8, galectinas-1, -3 e -7 nos casos de LPO e RLO.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

O presente projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), obedecendo aos critérios da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, e aprovado segundo o parecer 3.369.038 (Anexo A).

3.2 Caracterização do Estudo

O estudo consistiu em uma pesquisa transversal, observacional, com o intuito de avaliar a imunexpressão das proteínas CD4, CD8, galectinas-1, -3 e -7 em casos de LPO e RLO associando-a parâmetros clínicos, histológicos e histomorfométricos.

3.3 População e amostra

A população do presente estudo foi constituída por casos de LPO e RLO, diagnosticados e arquivados nos Laboratórios de Histopatologia Oral da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) entre os anos de 2011 a 2019.

A amostra, selecionada por conveniência e do tipo não probabilística, foi constituída por 33 casos de LPO e 04 casos de RLO.

3.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostra, casos de LPO e RLO com material suficiente para análises morfológica e imunoistoquímica. Os casos selecionados preencheram os critérios histopatológicos estabelecidos pela *American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology - AAOMP* (CHENG *et al.*, 2016) para o diagnóstico de LPO.

- Critérios histopatológicos: (1) infiltrado linfocitário predominantemente em banda ou irregular, na lâmina própria confinada à interface epitélio-lâmina própria; (2) degeneração liquefativa (hidrópica) das células basais; (3) exocitose linfocítica; (4) ausência de displasia epitelial; (5) ausência de alteração arquitetural epitelial verrucosa (CHENG *et al.*, 2016).

3.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos da amostra, casos de LPO e RLO que não apresentem material suficiente para avaliação morfológica e imunoistoquímicas ou que não preencheram os critérios estabelecidos pela AAOMP (CHENG *et al.*, 2016).

3.4 Variáveis do estudo

Quadro 1- Variáveis dependentes do estudo

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIZAÇÃO	TIPO
Imunoexpressão de CD4	Média por campo	Imunoexpressão membranar das células no infiltrado inflamatório subepitelial	Quantitativa discreta
Imunoexpressão de CD8	Média por campo	Imunoexpressão membranar das células no infiltrado inflamatório subepitelial	Quantitativa discreta
Imunoexpressão da galectina-1	Percentual das células positivas	Citoplasmática/ Membranar/Nuclear em células inflamatórias Subepitelial	Quantitativa discreta
Imunoexpressão da galectina-3	Percentual das células positivas	Citoplasmática/ Membranar/Nuclear em células inflamatórias Subepitelial	Quantitativa discreta
Imunoexpressão da galectina-7	Percentual das células positivas	Citoplasmática/ Membranar/Nuclear em células inflamatórias Subepitelial	Quantitativa discreta

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021

Quadro 2 - Variáveis independentes do estudo

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIZAÇÃO	TIPO
Sexo	Conjunto de características físicas que definem machos e fêmeas	Homem Mulher	Qualitativa nominal
Idade	Idade dos pacientes	Anos	Quantitativa discreta
Etnia	Cor da pele	Branco Não Branco	Qualitativa nominal
Localização anatômica das lesões	Localizações das lesões intraorais	Mucosa jugal Língua Outras	Qualitativa nominal
Subtipo clínico de LPO	Classificação dos padrões clínicos	LPO Reticular LPO Erosivo	Qualitativa nominal
Corpos de civatte	Queratinócitos degenerados na camada basal do epitélio	Presente/Ausente	Qualitativa nominal
Centros germinativos	Centro de diferenciação de linfócitos	Presente/Ausente	Qualitativa nominal
Espessura do epitélio	Espessura do epitélio da porção inferior da camada basal à porção superior da camada córnea	Em micrômetros	Quantitativa discreta
Espessura da banda linfocitária subepitelial	Espessura da banda linfocitária subepitelial das células inflamatórias mais próximas ao epitélio até as células mais profundas	Em micrômetros	Quantitativa discreta

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021

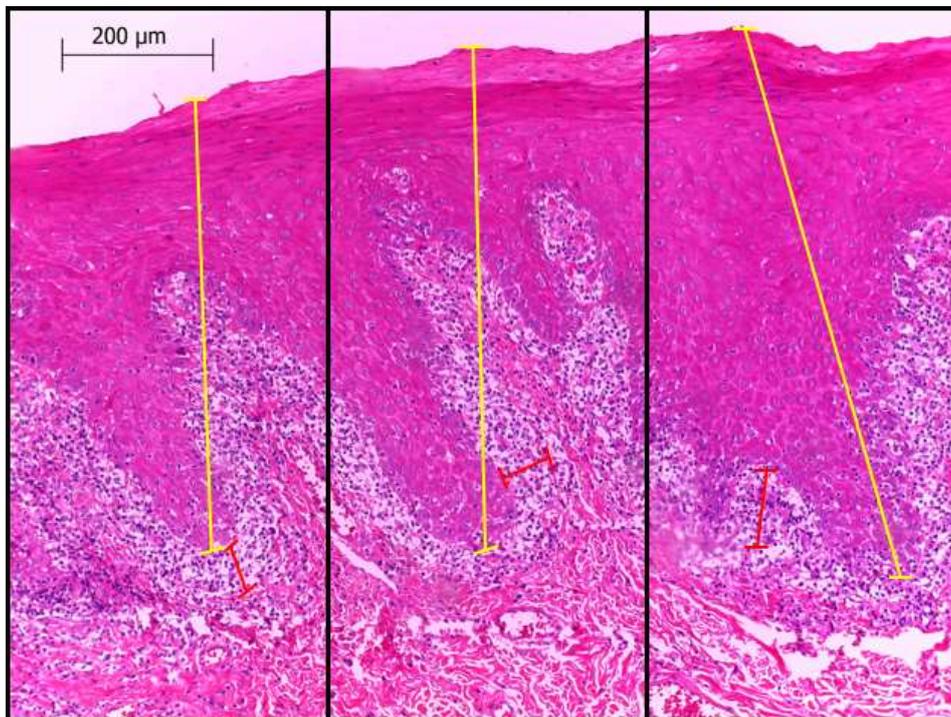
3.5 Estudo clínico-morfológico

Informações a respeito do sexo, idade, etnia, localização anatômica das lesões e subtipo clínico foram coletadas nas fichas clínicas dos pacientes nos Laboratórios de Histopatologia Oral da Universidade Estadual da Paraíba/Campina Grande – PB e da Universidade Federal de Minas Gerais/ Belo Horizonte – MG. Todos os dados clínicos foram anotados em ficha clínica previamente elaborada para esta pesquisa. (APÊNDICE A).

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 5µm de espessura, os quais, por sua vez, foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), dois examinadores previamente treinados realizaram a análise dos parâmetros histopatológicos: presença de corpos de Civatte e centros germinativos, espessura do epitélio e da banda linfocitária subepitelial. Os parâmetros

morfológicos foram avaliados seguindo a categorização do quadro 2, adaptados da metodologia proposta por BASCONES-ILUNDAIN *et al.* (2007) (APÊNDICE B). Os dados morfológicos foram anotados em ficha previamente elaborada pelos pesquisadores. Por meio do programa *ImageJ* foi realizada uma análise quantitativa da espessura, em micrômetros, do epitélio e banda linfocitária subepitelial, adaptado da metodologia de Pereira *et al.* (2012), por meio de 05 campos consecutivos, foram feitas 03 mensurações por campo da espessura do tecido epitelial e banda linfocitária subepitelial na região central e extremidades do campo. Deste modo, obtendo-se uma média destes parâmetros por caso (FIGURA 1).

Figura 1- Fotomicrografia demonstrando as mensurações por campo da espessura do epitélio e da banda linfocitária subepitelial em micrômetros (HE, 100X).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021

3.6 Estudo imunoistoquímico

3.6.1 Método imunoistoquímico

Cortes teciduais com 3 μ m de espessura foram obtidos, a partir do material biológico emblocado em parafina, e estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, os cortes histológicos foram submetidos ao método da imunoperoxidase pela

técnica baseada em polímeros de dextrano (*Immunohistoprobe PlusTM*, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA), utilizando os anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-Galectina-1, anti-Galectina-3 e anti-Galectina-7 (QUADRO 4). O controle negativo consistiu na substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão. O controle positivo consistiu em caso de mucosa oral normal, para anti-Galectina-1, anti-Galectina-3 e anti-Galectina-7 e Hiperplasia Linfoide, para anti-CD4 e anti-CD8. A técnica utilizada seguiu o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB, conforme descrito a seguir:

- ⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (15 minutos cada);
- ⇒ Reidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
 - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- ⇒ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos)
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Recuperação antigênica (QUADRO 6);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpos primários, em solução diluente (*EnVision Flex antibody diluent*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), a 4°C em câmara úmida;
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário (*Ampliflier*, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);

- ⇒ Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*HRP conjugate*, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+ substrate system*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Harris, à temperatura ambiente (1,5 minutos);
- ⇒ Desidratação em álcool absoluto:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ⇒ Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- ⇒ Montagem em polímero de acrilatos (*Entellan® new*, Merck KGaA, Darmstadt, DE).

Quadro 3 - Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários a serem utilizados no estudo.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
Anti-CD4	368	Novocastra	1:200	Citrato, pH = 6,0, <i>steamer</i> , 60 min	Overnight
Anti-CD8	4B11	Novocastra	1:600	Citrato, pH = 6,0, <i>steamer</i> , 60 min	Overnight
Anti-galectina-1	E-2	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX	1:3000	Citrato, pH = 6,0, <i>steamer</i> , 60 min	Overnight
Anti-galectina-3	H-160	Santa Cruz Biotechnology	1:1500	Citrato, pH = 6,0, <i>steamer</i> , 60 min	Overnight
Anti-galectina-7	H-8	Santa Cruz Biotechnology	1:4000	Sem recuperação	Overnight

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021

3.6.2 Análise Quantitativa

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, cada espécime foi analisado à microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb

GmbH, Wetzlar, DE), por dois examinadores previamente treinados. Todos os dados da análise imunoistoquímica foram anotados em ficha previamente elaborada pelo pesquisador.

Para a análise imunoistoquímica, todas as lâminas foram avaliadas sob microscopia óptica de luz (Leica DM 500; *Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany*), e 05 áreas de maior imunopositividade ao longo do tecido foram fotomicrografadas (ICC 50HD; *Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany*) com ampliação de x400, as imagens foram transferidas para o programa ImageJ® (*Imaging Processing and Analysis in Java, National Institute Health, Bethesda, Maryland, USA*). Os linfócitos que apresentavam coloração acastanhada na membrana foram considerados positivos para anti-CD4 e anti-CD8, sendo realizada a média de células positivas nos 05 campos de maior imunopositividade sendo este método de análise adaptado de Zhou *et al.* (2016). As células inflamatórias com núcleo e/ou citoplasmas acastanhados foram consideradas positivas para anti-galectina-1, anti-galectina-3 e anti-galectina-7, sendo calculado o índice de positividade (IP) (total de células inflamatórias imunopositivas dividido por 1000 e multiplicado por 100) em cada um dos casos, sendo adaptado da metodologia de Brito *et al.* (2018):

$$IP = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células positivas}}{1000 \text{ células}} \times 100$$

3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram digitados em planilha eletrônica Excel (Microsoft Office 2013®) e, posteriormente, exportados para o programa SPSS 20.0 (IBM SPSS Statistics). Os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão ou mediana, conforme distribuição não normal, respectivamente, verificado pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Os testes Qui-quadrado e exato de Fisher foram utilizados para averiguar prováveis associações entre os parâmetros clínicos (sexo, idade, etnia, localização anatômica das lesões e subtipo clínico) e morfológicos (tipo de epitélio, presença de corpos de Civatte, centros germinativos, espessura do epitélio e da banda linfocitária subepitelial);

A análise das porcentagens de células imunopositivas para CD4, CD8, Galectina-1, Galectina-3 e Galectina-7 foi realizada através do teste de Kolmogorov-Smirnov, revelando assim ausência de distribuição normal. Portanto, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para comparar as porcentagens medianas de células imunopositivas para CD4, CD8, Galectina-1 e -3, de acordo com os casos de LPO e RLO. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para analisar as correlações entre as imunoexpressões de CD4, CD8, galectina-1,

galectina-3 e galectina-7 com os casos de LPO e RLO. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$) para todos os testes.

4 ARTIGO

4.1 Apresentação

A presente pesquisa foi desenvolvida após apresentação e aprovação em qualificação no Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Como resultado da mesma o artigo intitulado “*Imunoexpressão de CD4⁺, CD8⁺, galectina-1, -3 e -7 na modulação imune do líquen plano oral*”, será apresentado como fruto desta tese.

Após as devidas considerações da banca da defesa desta tese, o artigo será colocado nas normas e enviado para a tradução do inglês e posteriormente submetido ao periódico *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirurgia Bucal* (ISSN: 1698-4447, Fator de Impacto: 2.047, Qualis para Odontologia: A2), cujas normas para submissão de trabalhos encontram-se no anexo B.

4.2 Artigo a ser submetido

Imunoexpressão de CD4+, CD8+, galectinas-1, -3 e -7 na modulação imune do líquen plano oral

Immunoexpression of CD4+, CD8+, galectins-1, -3 and -7 in the immune modulation of oral lichen planus

Keywords: Oral lichen planus, Galectins, CD4-Positive T-Lymphocytes, CD8-Positive T-Lymphocytes

Luan Éverton Galdino Barnabé¹, Ricardo Alves de Mesquita², Manuel Antônio Gordón-Núñez¹, Cassiano Francisco Weege Nonaka¹, Pollianna Muniz Alves¹

¹ Department of Dentistry, School of Dentistry, State University of Paraíba, Campina Grande, Paraíba, PB, Brazil.

² Department of Oral Medicine (Oral Pathology), School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Author's correspondence:

Pollianna Muniz Alves

Department of Dentistry

Rua das Baraúnas, 351, Bairro Universitário, Campina Grande, Paraíba, Brazil.

CEP: 58429-500 Phone/Fax: +55 83 3315-33327

e-mail: pmunizalves@gmail.com

ABSTRACT

Objetivos: Esta pesquisa avaliou a imunoexpressão do CD4+, CD8+ e galectinas-1, -3 e -7 em Líquen Plano Oral (LPO), comparando-a com casos de Reação Liquenoide Oral (RLO).

Materiais e Métodos: Avaliaram-se 33 casos de LPO, categorizados em reticular (23 casos) e erosivo (10 casos), e 04 casos de RLO. Considerou-se parâmetros clínicos (sexo, idade, etnia, localização anatômica e tipo clínico) e morfológicos (tipo de epitélio, corpos de Civatte, centros germinativos, espessura de epitélio e de banda linfocitária subepitelial). Na imunoistoquímica realizou-se a média de positividade para os anticorpos anti-CD4+ e anti-CD8+, e avaliação do índice de positividade para os anticorpos anti-galectina-1, -3 e -7, nas células imunoinflamatórias. Utilizou-se os testes Exato de Fisher e Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Resultados: Os casos de LPO apresentaram menos centros germinativos ($p = 0,002$) e maior espessura epitelial ($p = 0,019$) que os casos de RLO. Houve maior imunoexpressão do CD4 em LPO erosivo ($p = 0,055$) e galectina-1 citoplasmática nos casos de RLO ($p = 0,011$). Galectinas-3 e -7 não mostraram diferenças significativas entre as lesões ($p > 0,05$).

Conclusão: Uma menor espessura do tecido epitelial e a presença de centros germinativos são importantes para o diagnóstico diferencial da RLO. Um maior nível de CD4+ no LPO erosivo pode apontar um possível papel na diferenciação de subpopulações de linfócitos nesses casos. Os linfócitos T CD8+ exercem um papel direto na resposta imune do LPO e da RLO. As galectina-1 e -3 participam da modulação da resposta imune do LPO e da RLO, sugerindo uma possível participação da galectina-1 citoplasmática na via pró-apoptótica de linfócitos. Sugere-se também que a galectina-7 não desempenha um mecanismo direto na resposta imune do LPO e da RLO.

Introdução

O líquen plano oral (LPO) é uma desordem inflamatória crônica que acomete a mucosa oral e, por vezes, a pele, e caracteriza-se por uma resposta imunologicamente mediada por linfócitos T aos queratinócitos presentes no tecido epitelial (DI STASIO et al., 2014; GOROUHI, DAVARI e FAZEL, 2014; NOGUEIRA, CARNEIRO e RAMOS-E-SILVA, 2015; CHENG et al., 2016; BAKHTIARI et al., 2017; CARROZZO et al., 2019) com uma prevalência estimada em 0,4% a 5,81% (SHET et al., 2013; BAKHTIARI et al., 2017; HALLIKERI et al., 2018; KANSKY et al., 2018) e etiologia incerta, estando associado a drogas, infecções e estresse (ROBLEDO-SIERRA E VAN DER WAAL, 2018; GHAPANCHI et al., 2019). Enquanto as reações liquenoides orais (RLO) são lesões que apresentam características clínicas e histopatológicas que se assemelham ao LPO, sendo sua etiopatogenia ligada a utilização de medicamentos ou reações de hipersensibilidade por contato, sendo a remissão da lesão associada a remoção do fator causal (CHENG et al., 2016; CARROZZO et al., 2019).

Algum dos fatores etiológicos do LPO pode ser responsável pela ativação de uma resposta citotóxica autoimune mediada por linfócitos T CD8⁺, levando a liberação de quimiocinas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) responsável pela degradação dos ceratinócitos (ROOPASHREE et al., 2010; ENOMOTO et al., 2017; KARA, 2018). O mecanismo de regulação das células imunes do LPO depende de diversas proteínas e quimiocinas e, dentro deste contexto, pode se citar as galectinas que são proteínas multifuncionais pertencentes a uma família de lectinas animais, e cujos papéis ainda tem sido pouco investigados no LPO (MUNIZ et al., 2015; GHAPANCHI et al., 2019).

A galectina-1 desempenha um papel anti-inflamatório causando a apoptose de linfócitos T ativados, e essa função também é observada para a galectina-3 quando localizada na membrana celular, visto que sua localização citoplasmática e nuclear está associada a um papel anti-apoptótico. A galectina-7 caracteristicamente expressa pelo tecido epitelial da pele e mucosa também desempenha um papel pró-apoptótico levando a morte das células T (BRINCHMANN, PATEL e IVERSEN, 2018). Estudos prévios avaliaram a imunoexpressão das galectinas em distúrbios potencialmente malignos orais como displasias epiteliais (DE VASCONCELOS CARVALHO et al., 2013), leucoplasias (MUNIZ et al., 2015), queilites actínicas (LOPES et al., 2016), bem como no LPO (MUNIZ et al., 2015; GHAPANCHI et al., 2019).

Diante do exposto, o objetivo do estudo será demonstrar a imunexpressão de CD4⁺, CD8⁺, galectinas-1, -3 e -7 na modulação da resposta imune de LPO e RLO.

Materiais e Métodos

Por meio de uma amostra de conveniência, foram selecionados 33 casos de LPO e 4 casos de RLO, diagnosticados no período entre 2011 e 2019, dos laboratórios de Histopatologia Oral da Universidade Estadual da Paraíba, Campina grande – Paraíba, e Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais. A amostra de LPO foi dividida em dois grupos: 23 casos de LPO do subtipo reticular e 10 casos do subtipo erosivo, dos quais foram avaliados parâmetros clínicos, morfológico e imunoistoquímicos. Foram excluídos da pesquisa os casos cujos blocos parafinados não apresentaram material suficiente para análise. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual da Paraíba (Nº do protocolo 14786919.2.0000.5187).

A análise clínica foi realizada por meio dos dados presentes nas fichas clínicas (sexo, idade, etnia dos pacientes, localização anatômica e subtipo clínico das lesões). No estudo morfológico, os blocos parafinados foram submetidos a cortes histológicos de 5-µm de espessura e levados à coloração de rotina com hematoxilina-eosina. A análise morfológica dos tecidos se deu por meio de uma análise do tipo de epitélio (atrófico/hiperplásico), presença de corpos de Civatte e centros germinativos. Por meio do programa *ImageJ* foi realizada uma análise quantitativa da espessura em micrômetros do epitélio e banda linfocitária subepitelial, adaptado da metodologia de Pereira et al. (2012), por meio de 05 campos consecutivos, foram feitas 03 mensurações por campo da espessura do tecido epitelial e banda linfocitária subepitelial na região central e extremidades do campo. Deste modo, obtendo-se uma média destes parâmetros por caso.

Para o estudo imunoistoquímica, os blocos parafinados foram submetidos a cortes histológicos de 3-µm espessura e em seguida estendidos em lâminas de vidro silanizadas. Em seguida, os cortes teciduais foram desparafinizados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica. Posteriormente, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3%, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual, e incubados com os anticorpos primários monoclonais anti-CD4 (Clone 368; Novocastra; Diluição 1:200; *Overnight*), anti-CD8 (Clone 4B11; Novocastra; Diluição 1:600; *Overnight*), anti-Galectina-1 (Clone E-2; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX; Diluição 1:3000; *Overnight*), anti-Galectina-3 (Clone H-160; Santa Cruz Biotechnology; Diluição 1:1500; *Overnight*) e anti-Galectina-7 (Clone H-8; Santa Cruz

Biotechnology; Diluição 1:4000; *Overnight*), os cortes teciduais foram lavados com tampão TRIS-HCl e tratados com complexo baseado em polímeros (Immunohistoprobe Plus™, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA). A atividade da peroxidase foi visualizada por meio da imersão dos cortes em diaminobenzidina (Liquid DAB+ substrate system, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), resultando em um produto de reação de coloração acastanhada. Finalmente, os cortes teciduais foram contracorados com hematoxilina de Harris, desidratados e montados com lamínula. O controle positivo para os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 foi realizado com cortes de hiperplasia linfoide e para os anticorpos anti-Galectina-1, anti-Galectina-3 e anti-Galectina-7 cortes de hiperplasia fibrosa inflamatória oral. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo descrito anteriormente.

Para a análise imunoistoquímica, todas as lâminas foram avaliadas sob microscopia óptica de luz (Leica DM 500; *Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany*), e 05 áreas de maior imunopositividade ao longo do tecido foram fotomicrografadas (ICC 50HD; *Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany*) com ampliação de x400, as imagens foram transferidas para o programa ImageJ® (*Imaging Processing and Analysis in Java, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA*). Os linfócitos que apresentavam coloração acastanhada na membrana foram considerados positivos para anti-CD4 e anti-CD8, sendo realizada a média de células positivas nos 05 campos de maior imunopositividade sendo este método de análise adaptado de Zhou *et al.* (2016). As células inflamatórias com núcleo e/ou citoplasmas acastanhados foram consideradas positivas para anti-Galectina-1, anti-Galectina-3 e anti-Galectina-7, sendo calculado o índice de positividade (IP) (total de células inflamatórias imunopositivas dividido por 1000 e multiplicado por 100) em cada um dos casos, sendo adaptado da metodologia de Brito *et al.* (2018).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, utilizando o programa SPSS (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Foi utilizada a estatística descritiva para caracterização da amostra. O teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher foram utilizados para determinar possíveis associações entre parâmetros clínico-morfológicos e as lesões de LPO e RLO. A análise das porcentagens de células imunopositivas para CD4, CD8, Galectina-1, Galectina-3 e Galectina-7 foi realizada através do teste de Kolmogorov-Smirnov, revelando assim ausência de distribuição normal. Portanto, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para comparar as porcentagens medianas de células imunopositivas para CD4, CD8, Galectina-1 e -3, de acordo com os casos de LPO e RLO. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para analisar as correlações entre as imunorexpressões de CD4, CD8, Galectina-1

e Galectina-3 com os casos de LPO e RLO. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$) para todos os testes.

Resultados

Análise clinicomorfológica

O sexo feminino foi o mais acometido dentre os casos de LPO (75,8%; 25/33) e RLO (100,0%; 04/04), bem como nos subtipos clínicos de LPO, reticular (73,9%; 17/23) e erosivo (80,0%; 8/10). A média da idade para os casos de LPO foi de $52,2 \pm 14,9$ anos e de $47,5 \pm 13,7$ anos para os casos de RLO, sendo os indivíduos não-brancos os mais acometidos para os casos de LPO (63,6%; 21/33) e RLO (75,0%; 03/04). A mucosa jugal representa a localização anatômica mais prevalente para os casos de LPO (54,5%; 18/33) e RLO (50,0%; 02/04) (TABELA 1). Os casos de RLO estavam associados a restaurações de amálgama dentário, após a realização da biópsia e substituição da restauração por resina composta houve remissão das lesões.

Morfologicamente, os casos de LPO se destacam pelo epitélio hiperplásico (57,6%; 19/33) e presença de corpos de Civatte (72,7%; 24/33), enquanto os casos de RLO apresentaram maior prevalência dos centros germinativos (75,0%; 03/04) ($p = 0,002$). Observou-se diferença significativa da espessura do tecido epitelial, sendo maior nos casos de LPO com mediana de 483,47 μm (384,81–699,83) ($p = 0,019$). Não houve diferença significativa da espessura da banda linfocitária subepitelial entre os casos de LPO - 391,90 μm (296,01 – 507,74) e RLO - 393,92 μm (187,51 -500,39) ($p > 0,05$) (TABELA 2).

Análise imunoistoquímica

Foi observado, tantos nos casos de LPO e RLO, imunomarcagem citoplasmática do CD4 e CD8 nos linfócitos sub-epiteliais, e as galectinas 1 e -3 exibiram imunomarcagem nuclear e citoplasmática. A galectina-7 não demonstrou imunomarcagem nas células inflamatórias dos casos de LPO e RLO.

Não se observou diferença significativa da imunoexpressão de CD4 entre os casos de LPO (50,80; 22,20-91,80) e RLO (93,30; 32,60-99,25) ($p > 0,05$). O subtipo erosivo de LPO demonstrou maior imunoexpressão (75,3; 35,30 - 125,85), comparado ao subtipo reticular (30,0; 14,20-80,60), embora sem diferença significativa ($p = 0,055$). Em relação a imunoexpressão do CD8, não se evidenciou diferença significativa entre o LPO (79,80; 44,70 – 123,80) e RLO (54,40 (37,45 – 115,60) ($p = 0,525$), e entre os subtipos clínicos reticular (80,0;

52,80-123,0) e erosivo (52,10; 32,50 -127,05) ($p=0,273$) (TABELA 3). Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre a imunoposição de CD4, CD8, galectinas-1 e 3 com a espessura do tecido epitelial, hiperplásico e atrófico.

Todos os casos de LPO e RLO demonstraram imunopositividade nas células imunomodulatórias para as galectinas-1 e -3. A galectina-1 apresentou maior imunoposição citoplasmática nos casos de RLO ($p= 0,011$). A imunoposição nuclear e citoplasmática de galectina-1 nos subtipos clínicos reticular e erosivo de LPO não demonstraram diferença significativa ($p>0,05$). A imunoposição nuclear e citoplasmática de galectina-3 não apresentou diferença significativa entre os casos de LPO e RLO, bem como entre os subtipos clínicos reticular e erosivo de LPO ($p> 0,05$) (TABELA 4).

Correlações de Spearman apresentaram uma correlação significativa entre a imunoposição de CD4+ e CD8+ ($r=0,396$; $p=0,010$), galectina-1 citoplasmática e nuclear ($r=0,589$; $p<0,001$) e galectina-1 citoplasmática e galectina-3 citoplasmática ($r=0,419$; $p=0,005$) nos casos de LPO. Não houve correlação significativa ($p>0,05$) para os casos de RLO. O subtipo reticular do LPO apresentou correlação significativa entre CD4+ e CD8+ ($r=0,520$; $p=0,006$), galectina-1 citoplasmática e nuclear ($r=0,619$; $p=0,003$), galectina-1 citoplasmática e galectina-3 citoplasmática ($r=0,536$; $p=0,011$), galectina-1 citoplasmática e galectina-3 nuclear ($r=0,486$; $p=0,017$) e galectina-3 citoplasmática e nuclear ($r=0,746$; $p<0,001$). O subtipo erosivo do LPO apresentou correlação significativa entre galectina-1 citoplasmática e nuclear ($r=0,626$; $p=0,043$) e galectina-3 citoplasmática e nuclear ($r=0,839$; $p=0,038$).

Discussão

O LPO e o RLO são processos que exibem características clínicas muitas vezes semelhantes, no entanto, apresentam etiopatogênias distintas (CHENG et al., 2016; CARROZZO et al., 2019). A resposta imunoinflamatória, na maioria dos casos, apresenta-se de forma mais intensa no LPO, conforme Mravak-Stipetic et al. (2014). No entanto, nossos resultados mostraram que o CD4, CD8 e as galectinas-1 e -3 participam na modulação imune do LPO e RLO, sem diferença significativa entre ambos.

Os casos de LPO apresentaram maior espessura do tecido epitelial em comparação aos casos de RLO, assim como foi observado por Mravak-Stipetic et al. (2014). Khoo, Primasari e Saub (2001) destacaram através de uma análise histomorfométrica, um maior volume nuclear e citoplasmático nas células do LPO em comparação com o RLO, sugerindo assim esta técnica

de avaliação como um possível método de diferenciação das lesões. Em contrapartida, Juneja et al. (2006) demonstraram que o tecido epitelial dos casos de LPO são menos espessos que os casos de RLO, isso pode ser explicado pelo método empregado para mensuração da espessura do epitélio. Para uma mensuração mais próxima da realidade, nós realizamos três mensurações por campo ao longo de cinco campos consecutivos, o que nos permitiu uma dimensão mais próxima da espessura total do epitélio dos casos de LPO e RLO. Em relação aos subtipos clínicos, os casos de LPO reticular apresentaram maior espessura epitelial que o subtipo erosivo, assim como observado por Pereira et al. (2012) e Brant, Vasconcelos e Rodrigues (2008), o que pode ser justificado por uma maior atividade pró-apoptótica nos casos de LPO erosivo (BRANT, VASCONCELOS e RODRIGUES, 2008).

Diversos agentes irritantes intraorais, assim como a canela e o amalgama dentário, podem favorecer o desenvolvimento das RLO por contato (MCPARLAND e WARNAKULASURIYA, 2012; CHENG et al., 2016; CARROZZO et al., 2019). A hipersensibilidade associada as restaurações de amálgama dentário podem levar anos para ocorrer, através de um desgaste da restauração ocorre a liberação de sais de mercúrio e partículas metálicas que penetram no tecido epitelial e prendem-se aos queratinócitos levando a uma resposta das células de defesa contra os queratinócitos. Inicialmente as células apresentadoras de antígenos mediam a proliferação de linfócitos T CD4⁺ responsáveis por recrutar os linfócitos TCD8⁺ que agem através dos reconhecimentos do sistema de histocompatibilidade humana (MHC) (MCPARLAND e WARNAKULASURIYA, 2012). Em nosso estudo, a presença de áreas semelhantes a centros germinativos foi mais característica para os casos de RLO e isso pode ser justificável pelo mecanismo de desenvolvimento dela estar associado a hipersensibilidade aos sais de mercúrio presentes nas restaurações de amalgama levando a uma maior proliferação de células imunes, bem como uma maior imunexpressão de CD4⁺ para estes casos. Larsson e Warfvinge (1998) também destacam a ocorrência de centros germinativos em RLO por hipersensibilidade ao amalgama dentário.

Nós observamos uma maior imunexpressão de CD4⁺ nos casos do subtipo erosivo do LPO, esse fato pode estar relacionado ao perfil de diferenciação dos linfócitos T CD4⁺, assim como observado por Piccinni et al. (2014) ao destacar uma maior imunexpressão de linfócitos Th0 nos casos de LPO erosivo quando comparados a mucosa oral e ao subtipo reticular, associando assim o papel do linfócito Th0 na etiopatogênese do LPO erosivo. Os linfócitos auxiliares, T CD4⁺ (Th0), podem sofrer diferenciação em subtipos Th1, Th2, Th9, Th17, Treg e Tfh mediante exposição as citocinas presentes no meio, deste modo cada grupo desempenha um papel distinto conforma a liberação de citocinas próprias (WANG et al., 2016).

Mecanismos imunomodulatórios com a via PD-1/PDL-1 (COSTA et al, 2020; YANG, WANG e ZHOU, 2021), bem como as galectinas (MUNIZ et al., 2015; GHAPANCHI et al., 2019) tem sido estudada como possíveis reguladoras da resposta imune do LPO. Em especial, as galectinas podem desempenhar diversas funções na regulação da resposta imune inata e adaptativa como sinalização, diferenciação, migração, secreção de citocinas, além de mecanismos pró e anti-apoptóticos (THIEMANN e BAUM, 2016; BRINCHMANN et al., 2018; CORRÊA et al., 2022).

A galectina-1 é uma lectina prototípica que apresenta um único domínio de reconhecimento de carboidratos e é expressa por células adiposas, células estromais, células endoteliais, linfonodos e células placentárias, além de linfócitos mediando um mecanismo pró-apoptótico. Esse papel pró-apoptótico da galectina-1 em linfócitos faz com que ela atue como um mecanismo anti-inflamatório, inibindo respostas alérgicas (BRINCHMANN et al., 2018; CORRÊA et al., 2022). Nosso trabalho mostrou uma maior imunexpressão citoplasmática da galectina-1 nos casos de RLO, assim como observado por Sturm et al. (2004) que apontam a galectina-1 como um mecanismo pró-apoptótico mediando a ativação das caspases-8 e -9, bem como por Shenker et al. (2002) que apontaram o mercúrio como um mecanismo pró-apoptótico de linfócitos através de mudanças na expressão de genes apoptóticos. Yakushina et al. (2014) demonstraram o papel pró-apoptótico da galectina-1 em linfócitos TCD4+ através da via de ativação da proteína Bad. Deste modo, sugere-se que o mercúrio pode ter um papel na ativação da galectina-1 em linfócitos nos casos de RLO levando essas células a um mecanismo pró-apoptótico.

A galectina-3 é a única galectina do tipo químera e desempenha um papel antagônico a galectina-1 em linfócitos agindo como um mecanismo pró-inflamatório. Quando no citoplasma, a galectina-3 desempenha um papel anti-apoptótico através da interação com a proteína Bcl-2 (BRINCHMANN et al., 2018; CORRÊA et al., 2022). Em nosso estudo observamos uma maior imunexpressão de galectina-3 citoplasmática nos casos de RLO o que pode indicar um mecanismo antiapoptótico para as células imunes mediado pela proteína Bcl-2, levando a uma possível alteração na deleção de clones de linfócitos auto-reativos e consequente aumento da imunexpressão de CD4 (ARREAZA, RIVERA e CORRENTI, 2014; PÉREZ-SAYÁNS et al., 2021). Nós também observamos que os casos de LPO erosivo apresentaram maior imunexpressão citoplasmática de galectina-3 quando comparados ao subtipo reticular, assim como observado por Ghapanchi et al. (2018) que destacaram uma maior concentração sérica de galectina-3 nos casos de LPO erosivo, deste modo destaca-se que a galectina-3 pode desempenhar um papel anti-apoptótico de linfócitos TCD4 e um aumento da auto-reatividade

destas células no LPO erosivo. Em somatório, Corrêa et al. (2022) considera as galectinas-1 e -3 como possíveis vias terapêuticas anti-inflamatórias para o tratamento de psoríase e dermatite atópica.

A galectina-7 não foi imunoexpressa pelas células imunes dos casos de LPO e RLO indicando que esta galectina não desempenha um papel imunomodulatório nesses casos. Brito et al. (2018) ao avaliar a imunoexpressão das galectinas-1, -3 e -7 em lesões periapicais destaca um possível papel pró-apoptótico da galectina-7 em células inflamatórias nestas lesões. A possível ausência da sua imunoexpressão nos casos de LPO e RLO pode estar relacionada a etiopatologia distinta das lesões.

Em nosso estudo, observamos uma correlação positiva entre a imunoexpressão de CD4 e CD8 nos casos de LPO e seu subtipo reticular, sugerindo deste modo um papel imunomodulatório dos linfócitos T CD4 na diferenciação e linfócitos T CD8. Também houve uma correlação positiva entre a imunoexpressão nuclear e citoplasmática de galectina-1, bem como entre a imunoexpressão citoplasmática galectina-1 e galectina-3, citoplasmática e nuclear, nos casos de LPO e no subtipo reticular. O subtipo erosivo do LPO apresentou correlação positiva entre a imunoexpressão nuclear e citoplasmática de galectinas-1 e -3. Deste modo, sugere-se que as galectinas-1 e -3 podem sofrer translocação do citoplasma para o núcleo das células imunes desempenhando, no núcleo, um papel na realização de *splicing* pré-mRNA que regulam genes de processos de diferenciação, proliferação, transporte intracelular, metabolismo celular e apoptose (FRITSCH et al., 2016; BHAT et al., 2016), e no citoplasma, agindo de maneira antagônica, a galectina-1 desempenha um papel pró-apoptótico e a galectina-3 anti-apoptótica (YAKUSHINA et al., 2014; BRINCHMANN et al., 2018; CORRÊA et al., 2022).

Em conclusão, destacamos que aspectos morfológicos, como a menor espessura do tecido epitelial e a presença de centros germinativos, são importantes para o diagnóstico da RLO e diferenciação do LPO. Um maior nível de CD4⁺ esteve associado aos casos de LPO erosivo, apontado um possível papel na diferenciação de subpopulações de linfócitos nesses casos. Os linfócitos T CD8⁺ exercem um papel direto na resposta imune do LPO e da RLO. As galectina-1 e -3 participam da modulação da resposta imune do LPO e da RLO, sendo a imunoexpressão citoplasmática da galectina-1 uma possível via pró-apoptótica de linfócitos. A galectina-7 não desempenha um mecanismo direto na resposta imune do LPO e da RLO.

Conflito de Interesse

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse para realização do presente estudo.

Referências

Di Stasio D, Guida A, Salerno C, Contaldo M, Esposito V, Laino L, Serpico R, Lucchese A. Oral lichen planus: a narrative review. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2014 Jun 1;6(2):370-6. doi: 10.2741/E712. PMID: 24896212.

Gorouhi F, Davari P, Fazel N. Cutaneous and mucosal lichen planus: a comprehensive review of clinical subtypes, risk factors, diagnosis, and prognosis. *Scientific World Journal*. 2014 Jan 30;2014:742826. doi: 10.1155/2014/742826. PMID: 24672362; PMCID: PMC3929580.

Nogueira PA, Carneiro S, Ramos-e-Silva M. Oral lichen planus: an update on its pathogenesis. *Int J Dermatol*. 2015 Sep;54(9):1005-10. doi: 10.1111/ijd.12918. Epub 2015 Jul 3. PMID: 26147778.

Cheng YS, Gould A, Kurago Z, Fantasia J, Muller S. Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016 Sep;122(3):332-54. doi: 10.1016/j.oooo.2016.05.004. Epub 2016 Jul 9. PMID: 27401683.

Bakhtiari S, Taheri JB, Toossi P, Azimi S, Kawosi Nezhad S. Prevalence of oral lichen planus in Iranian children and adolescents: a 12-year retrospective study. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2017 Dec;18(6):419-422. doi: 10.1007/s40368-017-0315-7. Epub 2017 Nov 14. PMID: 29139037.

Carrozzo M, Porter S, Mercadante V, Fedele S. Oral lichen planus: A disease or a spectrum of tissue reactions? Types, causes, diagnostic algorithms, prognosis, management strategies. *Periodontol 2000*. 2019 Jun;80(1):105-125. doi: 10.1111/prd.12260. PMID: 31090143.

Shet R, Shetty SR, M K, Kumar MN, Yadav RD, S S. A study to evaluate the frequency and association of various mucosal conditions among geriatric patients. *J Contemp Dent Pract*. 2013 Sep 1;14(5):904-10. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1424. PMID: 24685796.

Hallikeri K, Naikmasur V, Guttal K, Shodan M, Chennappa NK. Prevalence of oral mucosal lesions among smokeless tobacco usage: A cross-sectional study. *Indian J Cancer*. 2018 Oct-Dec;55(4):404-409. doi: 10.4103/ijc.IJC_178_18. PMID: 30829279.

Kansky AA, Didanovic V, Dovsak T, Brzak BL, Pelivan I, Terlevic D. Epidemiology of oral mucosal lesions in Slovenia. *Radiol Oncol*. 2018 Sep 11;52(3):263-266. doi: 10.2478/raon-2018-0031. PMID: 30210036; PMCID: PMC6137360.

Robledo-Sierra J, van der Waal I. How general dentists could manage a patient with oral lichen planus. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018 Mar 1;23(2):e198-e202. doi: 10.4317/medoral.22368. PMID: 29476684; PMCID: PMC5911349.

Ghapanchi J, Andisheh-Tadbir A, Torkaman P, Malekzadeh M, Mardani M. Evaluation of the serum levels of galectin-3 in patients with oral lichen planus disease. *Oral Dis*. 2019 Mar;25(2):466-470. doi: 10.1111/odi.13012. Epub 2019 Jan 6. PMID: 30521137.

Roopashree MR, Gondhalekar RV, Shashikanth MC, George J, Thippeswamy SH, Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus--a review. *J Oral Pathol Med*. 2010 Nov;39(10):729-34. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00946.x. Epub 2010 Oct 4. PMID: 20923445.

Enomoto A, Sato E, Yasuda T, Isomura T, Nagao T, Chikazu D. Intraepithelial CD8+ lymphocytes as a predictive diagnostic biomarker for the remission of oral lichen planus. *Hum Pathol*. 2018 Apr;74:43-53. doi: 10.1016/j.humpath.2017.12.008. Epub 2017 Dec 28. PMID: 29288692.

Kara YA. The Measurement of Serum Tumor Necrosis Factor-alpha Levels in Patients with Lichen Planus. *Indian J Dermatol*. 2018 Jul-Aug;63(4):297-300. doi: 10.4103/ijd.IJD_474_17. Retraction in: *Indian J Dermatol*. 2019 May-Jun;64(3):165. PMID: 30078872; PMCID: PMC6052759.

Brinchmann MF, Patel DM, Iversen MH. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2018 May 21;2018:9186940. doi: 10.1155/2018/9186940. PMID: 29950926; PMCID: PMC5987346.

de Vasconcelos Carvalho M, Pereira Jdos S, Alves PM, Silveira EJ, de Souza LB, Queiroz LM. Alterations in the immunoeexpression of galectins-1, -3 and -7 between different grades of oral epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med*. 2013 Feb;42(2):174-9. doi: 10.1111/j.1600-0714.2012.01199.x. Epub 2012 Jul 28. PMID: 22845866.

Muniz JM, Bibiano Borges CR, Beghini M, de Araújo MS, Miranda Alves P, de Lima LM, Pereira SA, Nogueira RD, Napimoga MH, Rodrigues V Jr, Rodrigues DB. Galectin-9 as an important marker in the differential diagnosis between oral squamous cell carcinoma, oral leukoplakia and oral lichen planus. *Immunobiology*. 2015 Aug;220(8):1006-11. doi: 10.1016/j.imbio.2015.04.004. Epub 2015 Apr 27. PMID: 25956455.

Lopes ML, Nonaka CF, Queiroz LM, de Souza LB, Miguel MC, da Silveira ÉJ. Pattern of galectins expression in actinic cheilitis with different risks of malignant transformation. *J Oral Pathol Med*. 2016 Sep;45(8):621-6. doi: 10.1111/jop.12410. Epub 2015 Dec 29. PMID: 26711374.

Pereira JS, Monteiro BV, Nonaka CF, Silveira ÉJ, Miguel MC. FoxP3(+) T regulatory cells in oral lichen planus and its correlation with the distinct clinical appearance of the lesions. *Int J Exp Pathol*. 2012 Aug;93(4):287-94. doi: 10.1111/j.1365-2613.2012.00827.x. PMID: 22804765; PMCID: PMC3444985.

Zhou L, Cao T, Wang Y, Yao H, Du G, Chen G, Niu X, Tang G. Frequently Increased but Functionally Impaired CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Oral Lichen Planus. *Inflammation*. 2016 Jun;39(3):1205-15. doi: 10.1007/s10753-016-0356-9. PMID: 27106476.

Brito LNS, de Lemos Almeida MMR, de Souza LB, Alves PM, Nonaka CFW, Godoy GP. Immunohistochemical Analysis of Galectins-1, -3, and -7 in Periapical Granulomas, Radicular

Cysts, and Residual Radicular Cysts. *J Endod.* 2018 May;44(5):728-733. doi: 10.1016/j.joen.2018.01.008. Epub 2018 Mar 3. PMID: 29510866.

Mravak-Stipetić M, Lončar-Brzak B, Bakale-Hodak I, Sabol I, Seiwerth S, Majstorović M, Grece M. Clinicopathologic correlation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a preliminary study. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:746874. doi: 10.1155/2014/746874. Epub 2014 Oct 29. PMID: 25531004; PMCID: PMC4229965.

Khoo SP, Primasari A, Saub R. Nuclear and cellular volumetric alterations in oral lichen planus and lichenoid lesions: a histomorphometric study. *J Oral Sci.* 2001 Sep;43(3):151-7. doi: 10.2334/josnusd.43.151. PMID: 11732734.

Juneja M, Mahajan S, Rao NN, George T, Boaz K. Histochemical analysis of pathological alterations in oral lichen planus and oral lichenoid lesions. *J Oral Sci.* 2006 Dec;48(4):185-93. doi: 10.2334/josnusd.48.185. PMID: 17220615.

Brant JM, Vasconcelos AC, Rodrigues LV. Role of apoptosis in erosive and reticular oral lichen planus exhibiting variable epithelial thickness. *Braz Dent J.* 2008;19(3):179-85. doi: 10.1590/s0103-64402008000300001. PMID: 18949287.

McParland H, Warnakulasuriya S. Oral lichenoid contact lesions to mercury and dental amalgam--a review. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:589569. doi: 10.1155/2012/589569. Epub 2012 Jul 24. PMID: 22888200; PMCID: PMC3409574.

Larsson A, Warfvinge G. Immunohistochemistry of 'tertiary lymphoid follicles' in oral amalgam-associated lichenoid lesions. *Oral Dis.* 1998 Sep;4(3):187-93. doi: 10.1111/j.1601-0825.1998.tb00277.x. PMID: 9972169.

Piccinni MP, Lombardelli L, Logiodice F, Tesi D, Kullolli O, Biagiotti R, Giudizi M, Romagnani S, Maggi E, Ficarra G. Potential pathogenetic role of Th17, Th0, and Th2 cells in erosive and reticular oral lichen planus. *Oral Dis.* 2014 Mar;20(2):212-8. doi: 10.1111/odi.12094. Epub 2013 Apr 5. PMID: 23556506.

Wang H, Zhang D, Han Q, Zhao X, Zeng X, Xu Y, Sun Z, Chen Q. Role of distinct CD4(+) T helper subset in pathogenesis of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2016 Jul;45(6):385-93. doi: 10.1111/jop.12405. Epub 2015 Dec 23. PMID: 26693958.

Costa NL, Gonçalves JAM, de Lima SLG, de Arruda JAA, Miranda ACC, Mesquita RA, da Silveira ÉJD, Batista AC. Evaluation of PD-L1, PD-L2, PD-1 and cytotoxic immune response in oral lichen planus. *Oral Dis.* 2020 Apr 7. doi: 10.1111/odi.13344. Epub ahead of print. PMID: 32259363.

Yang JY, Wang F, Zhou G. Characterization and function of circulating mucosal-associated invariant T cells and $\gamma\delta$ T cells in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2022 Jan;51(1):74-85. doi: 10.1111/jop.13250. Epub 2021 Oct 27. PMID: 34637577.

Thiemann S, Baum LG. Galectins and Immune Responses-Just How Do They Do Those Things They Do? *Annu Rev Immunol.* 2016 May 20;34:243-64. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055402. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26907217.

Brinchmann MF, Patel DM, Iversen MH. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2018 May 21;2018:9186940. doi: 10.1155/2018/9186940. PMID: 29950926; PMCID: PMC5987346.

Corrêa MP, Correia-Silva RD, Sasso GRS, D'Ávila SCGP, Greco KV, Oliani SM, Gil CD. Expression Pattern and Immunoregulatory Roles of Galectin-1 and Galectin-3 in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Inflammation.* 2022 Jun;45(3):1133-1145. doi: 10.1007/s10753-021-01608-7. Epub 2022 Jan 15. PMID: 35031944.

Sturm A, Lensch M, André S, Kaltner H, Wiedenmann B, Rosewicz S, Dignass AU, Gabius HJ. Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation. *J Immunol.* 2004 Sep 15;173(6):3825-37. doi: 10.4049/jimmunol.173.6.3825. PMID: 15356130.

Shenker BJ, Pankoski L, Zekavat A, Shapiro IM. Mercury-induced apoptosis in human lymphocytes: caspase activation is linked to redox status. *Antioxid Redox Signal.* 2002 Jun;4(3):379-89. doi: 10.1089/15230860260196182. PMID: 12215206.

Yakushina VD, Vasil'eva OA, Novitskii VV, Andreeva NV, Starikova EG, Tashireva LA, Prokhorenko TS, Zima AP, Ryazantseva NV. Effect of galectin-1 on apoptosis of CD4(+) lymphocytes differentiated in vitro towards regulatory T cells. *Bull Exp Biol Med.* 2014 Mar;156(5):669-72. doi: 10.1007/s10517-014-2422-3. Epub 2014 Mar 25. PMID: 24770755.

Arreaza AJ, Rivera H, Correnti M. Expression of COX-2 and bcl-2 in oral lichen planus lesions and lichenoid reactions. *Ecancermedicalscience.* 2014 Mar 20;8:411. doi: 10.3332/ecancer.2014.411. PMID: 24834112; PMCID: PMC3971871.

Pérez-Sayáns M, Lorenzo-Pouso AI, Chamorro-Petronacci CM, Suárez-Peñaranda JM, Padín-Iruegas E, González-Moles MA, Marichalar-Mendía X, García-García A, Blanco-Carrión A. Immunoexpression of Apoptosis and Cell-cycle Arrest Markers in Oral Lichen Planus. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2021 May-Jun 01;29(5):374-381. doi: 10.1097/PAI.0000000000000876. PMID: 33044228.

Fritsch K, Mernberger M, Nist A, Stiewe T, Brehm A, Jacob R. Galectin-3 interacts with components of the nuclear ribonucleoprotein complex. *BMC Cancer.* 2016 Jul 19;16:502. doi: 10.1186/s12885-016-2546-0. PMID: 27435226; PMCID: PMC4952364.

Bhat R, Belardi B, Mori H, Kuo P, Tam A, Hines WC, Le QT, Bertozzi CR, Bissell MJ. Nuclear repartitioning of galectin-1 by an extracellular glycan switch regulates mammary morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Aug 16;113(33):E4820-7. doi: 10.1073/pnas.1609135113. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27496330; PMCID: PMC4995945.

Tabela 1 - Distribuição dos casos de LPO e RL de acordo com as características clínico-morfológicas.

Parâmetros Clinicopatológicos	Grupos	
	LPO n (%)	RLO n (%)
Sexo		
Masculino	8 (24,2)	---
Feminino	25 (75,8)	4 (100)
Idade (média e desvio padrão)	52,2±14,9 (14-83)	47,5±13,7 (34-63)
Raça		
Branca	12 (36,4)	1 (25)
Não-branca	21 (63,6)	3 (75)
Localização das lesões		
Mucosa jugal	18 (54,5)	2 (50)
Língua	8 (24,2)	1 (25)
Mucosa jugal+Língua	4 (12,1)	1 (25)
Outras	3 (9,1)	---
Tipo clínico		
Reticular	23 (69,7)	N/A
Erosivo	10 (30,3)	N/A
Tipo de epitélio		
Atrófico	14 (42,4)	2 (50)
Hiperplásico	19 (57,6)	2 (50)
Corpos de Civatte		
Presente	24 (72,7)	2 (50)
Ausente	9 (27,3)	2 (50)
Centros germinativos		
Presente	1 (3)	3 (75)
Ausente	32 (97)	1 (25)

Legenda: NA – Não se aplica.

Tabela 2. Relação dos grupos de lesões com as características morfológicas.

	Tipo clínico		p
	LPO (n=33)	RLO (n=4)	
Centros germinativos			
Presente	1 (3%)	3 (75%)	0,002 *
Ausente	32 (97%)	1 (25%)	
Classificação do epitélio			
Atrófico	14 (42,4)	2 (50)	1,000
Hiperplásico	19 (57,6)	2 (50)	
Espessura epitelial (Mediana)	483,47 (384,81 – 699,83)	276,29 (229,50 – 356,91)	0,019 **
Espessura da banda linfocitária (Mediana)	391,90 (296,01 – 507,74)	393,92 (187,51 - 500,39)	0,732 **

* Fisher's exact test

** Mann-Whitney test

Tabela 3. Relação dos subtipos de LPO com as características morfológicas.

	LPO		p
	Reticular (n=23)	Erosivo (n=10)	
Classificação do epitélio			
Atrófico	9 (39,1%)	5 (50%)	0,561*
Hiperplásico	14 (60,9%)	5 (50%)	
Espessura epitelial (Mediana)	563,23 (426,62 – 685,97)	439,61 (374,26 – 713,70)	0,609**
Espessura da banda linfocitária (Mediana)	411,30 (281,09 – 496,18)	337,95 (310,94 - 562,65)	0,832**

*1 Fisher's exact test

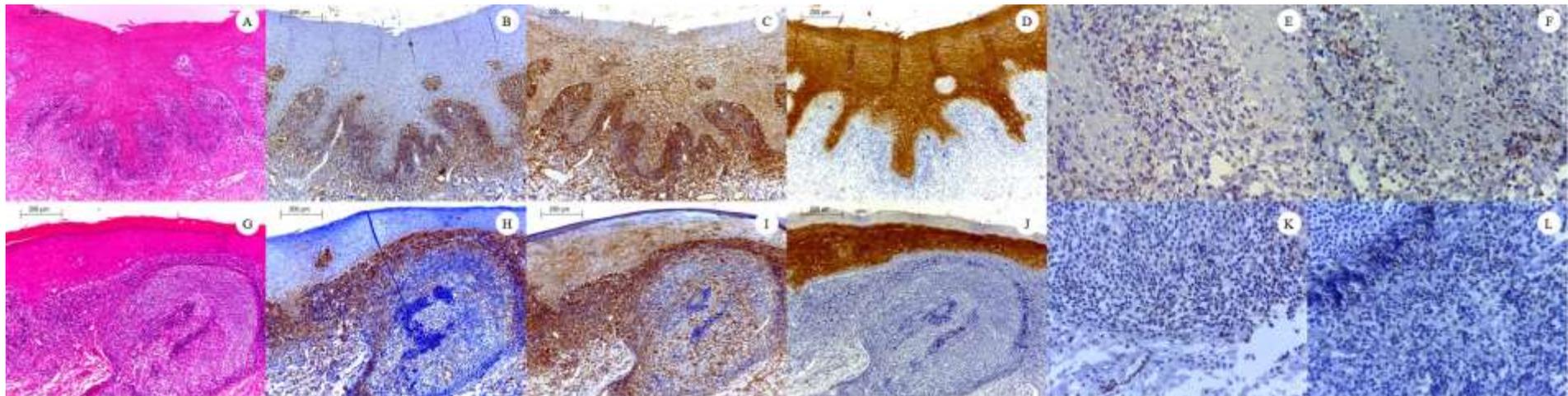
**2 Mann-Whitney test

Tabela 4. Comparação da imunoexpressões do CD4, CD8 e galectinas-1 e -3 em relação aos casos de LPO e RLO.

Variáveis	CD4		CD8		Gal-1 nuclear		Gal-1 citoplasma		Gal-3 nuclear		Gal-3 citoplasma	
		p		p		p		p		p		p
LPO	50,80	0,478	79,80	0,525	7,10	0,106	49,50	0,011	17,20	0,557	65,60	0,142
	(22,20-91,80)		(44,70 - 123,80)		(4,00 - 11,85)		(24,70 - 63,55)		(5,45-23,30)		(58,0 - 81,95)	
RLO	93,30		54,40		15,10		84,10		17,50		81,40	
	(32,60-99,25)		(37,45 - 115,60)		(7,87 - 20,60)		(58,95 - 86,82)		(15,25 - 26,20)		(68,27 - 89,35)	
LPO	30,0	0,055	80,0	0,273	7,10	0,389	48,40	0,240	11,90	0,100	61,80	0,108
Reticular	(14,20-80,60)		(52,80-123,0)		(2,70-11,50)		(21,50-58,30)		(5,2-19,5)		(57,90-74,70)	
LPO	75,30		52,10		7,65		62,90		22,0		83,25	
Erosivo	(35,30 - 125,85)		(32,50 -127,05)		(5,42-23,0)		(29,07-68,85)		(14,80 -30,42)		(51,87-87,92)	

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021

Fig 2. (A) Fotomicrografia de LPO evidenciando tecido epitelial hiperplásico com banda linfocitária subepitelial evidente (HE, 40x). (B) Imunoexpressão de galectina-1 em LPO, evidenciando imunomarcção nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 40x). (C) Imunoexpressão de galectina-3 em LPO, evidenciando imunomarcção nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 40x). (D) Imunoexpressão de galectina-7 em LPO, evidenciando imunomarcção no tecido epitelial (ADVANCE, 40x). (E) Imunoexpressão de CD4 em LPO, evidenciando imunomarcção nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 400x). (F) Imunoexpressão de CD8 em LPO, evidenciando imunomarcção nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 400x). (G) Fotomicrografia de RLO evidenciando tecido epitelial atrófico e área semelhante a centro germinativo (HE, 40x). (H) Imunoexpressão de galectina-1 em RLO, evidenciando imunomarcção nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 40x). (I) Imunoexpressão de galectina-3 em RLO, evidenciando imunomarcção nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 40x). (J) Imunoexpressão de galectina-7 em RLO, evidenciando imunomarcção no tecido epitelial (ADVANCE, 40x). (K) Imunoexpressão de CD4 em RLO, evidenciando imunomarcção nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 400x). (L) Imunoexpressão de CD8 em RLO, evidenciando imunomarcção nas células imunes da banda linfocitária subepitelial (ADVANCE, 400x).



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Em conclusão, destacamos que aspectos morfológicos, como a menor espessura do tecido epitelial e a presença de centros germinativos, são importantes para o diagnóstico da RLO e diferenciação do LPO.
- Um maior nível de CD4⁺ esteve associado aos casos de LPO erosivo, apontado um possível papel na diferenciação de subpopulações de linfócitos nesses casos. Os linfócitos T CD8⁺ exercem um papel direto na resposta imune do LPO e da RLO.
- As galectina-1 e -3 participam da modulação da resposta imune do LPO e da RLO, sendo a imunexpressão citoplasmática da galectina-1 uma possível via pró-apoptótica de linfócitos mediada pelo mercúrio.
- A galectina-7 não desempenha um mecanismo direto na resposta imune do LPO e da RLO.

REFERÊNCIAS

- AGHBARI, S.M.H., *et al.* Malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A meta-analysis of 20095 patient data. **Oral Oncology**, v. 68, p.: 92-102, 2017.
- ALAIZARI, N.A., *et al.* Hepatitis C virus infections in oral lichen planus: a systematic review and meta-analysis. **Australian Dental Journal**, v. 61, n. 3, p.:282-7, 2016.
- ALRASHDAN, M.S.; CIRILLO, N.; MCCULLOUGH, M. Oral lichen planus: a literature review and update. **Archives of Dermatological Research**, v. 308, n. 8, p.:539-51, 2016.
- ALVES, P.M., *et al.* Significance of galectins-1, -3, -4 and -7 in the progression of squamous cell carcinoma of the tongue. **Pathology, Research and Practice**, v. 207, n. 4, p.:236-40, 2011.
- ARCOLIA, V., *et al.* Galectin-1 is a diagnostic marker involved in thyroid cancer progression. **International Journal of Oncology**, v. 51, n. 3, p.:760-770, 2017.
- BAKHTIARI, S., *et al.* Prevalence of oral lichen planus in Iranian children and adolescents: a 12-year retrospective study. **European Archives of Paediatric Dentistry**, v. 18, n. 6, p.:419-22, 2017.
- BASCONES-ILUNDAIN, C.; GONZALEZ-MOLES, M.A.; ESPARZA, G.; GIL-MONTOYA, J.A.; BASCONES-MARTINEZ, A. Significance of liquefaction degeneration in oral lichen planus: a study of its relationship with apoptosis and cell cycle arrest markers. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 32, n. 5, p.:556-63, 2007.
- BRINCHMANN, M.F.; PATEL, D.M.; IVERSEN, M.H. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p.:1-11, 2018.
- BRITO, L.N.S., *et al.* Immunohistochemical Analysis of Galectins-1, -3, and -7 in Periapical Granulomas, Radicular Cysts, and Residual Radicular Cysts. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 5, p.:728-33, 2018.
- CERQUEIRA, J.D.M., *et al.* Psychological disorders and oral lichen planus: A systematic review. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 9, n. 4, p.:e12363, 2018.
- CHEN, H.M., *et al.* Significant association of deficiencies of hemoglobin, iron, folic acid, and vitamin B12 and high homocysteine level with oral lichen planus. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 114, n. 2, p.:124-9, 2015.
- CHENG, Y.S., *et al.* Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 122, n. 3, p.:332-54, 2016.
- CORRÊA, M.P., *et al.* Expression Pattern and Immunoregulatory Roles of Galectin-1 and Galectin-3 in Atopic Dermatitis and Psoriasis. **Inflammation**, v. 45, n. 3, p.:1133-1145, 2022.

COUSIN, J.M.; CLONINGER, M.J. The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p.: E1566, 2016.

DE CAMARGO, A.R., *et al.* Subset of CD8+ and FOXP3 + T cells in lichen planus associated with chronic hepatitis C infection. **Oral Diseases**, v. 00, p.:1-7, 2019.

DE OLIVEIRA, R.D.E.C., *et al.* Higher expression of galectin-3 and galectin-9 in periapical granulomas than in radicular cysts and an increased toll-like receptor-2 and toll-like receptor-4 expression are associated with reactivation of periapical inflammation. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 2, p.:199-203, 2014.

DE VASCONCELOS CARVALHO, M., *et al.* Alterations in the immunoexpression of galectins-1, -3 and -7 between different grades of oral epithelial dysplasia. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 42, n. 2, p.:174-9, 2013.

DI STASIO, D., *et al.* Psychiatric disorders in oral lichen planus: a preliminary case control study. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 32, n. 2 Suppl. 1, p.:97-100, 2018.

ENOMOTO, A., *et al.* Intraepithelial CD8+ lymphocytes as a predictive diagnostic biomarker for the remission of oral lichen planus. **Human Pathology**, v. 74, p.:43-53, 2018.

FARHADI, S.A.; HUDALLA, G.A. Engineering galectin-glycan interactions for immunotherapy and immunomodulation. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 10, p.:1074-83, 2016.

FIRTH, F.A., *et al.* Regulation of immune cells in oral lichen planus. **Archives of Dermatological Research**, v. 307, n. 4, p.:333-9, 2015.

FLORES-HIDALGO, A.; MURRAH, V.; FEDORIW, Y.; PADILLA, R.J. Relationship of infiltrating intraepithelial T lymphocytes in the diagnosis of oral lichen planus versus oral epithelial dysplasia: a pilot study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, 2019.

GHAPANCHI, J., *et al.* Evaluation of the serum levels of galectin-3 in patients with oral lichen planus disease. **Oral Diseases**, v. 25, n. 2, p.:466-70, 2019.

GHAPANCHI, J., *et al.* Observational Molecular Case-Control Study of Genetic Polymorphisms 1 in Programmed Cell Death Protein-1 in Patients with Oral Lichen Planus. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 2, p.:421-24, 2019.

GIULIANI, M., *et al.* Rate of malignant transformation of oral lichen planus: A systematic review. **Oral Diseases**, v. 25, n. 3, p.:693-709, 2019.

GOROUHI, F.; DAVARI, P.; FAZEL, N. Cutaneous and mucosal lichen planus: a comprehensive review of clinical subtypes, risk factors, diagnosis, and prognosis. **Scientific World Journal**, v. 2014, p.:1-22, 2014.

GONZÁLEZ-MOLES, M.Á., *et al.* Worldwide prevalence of oral lichen planus: A systematic review and meta-analysis. **Oral Diseases**, v. 27, n. 4, p.:813-828, 2021.

HALLIKERI, K., *et al.* Prevalence of oral mucosal lesions among smokeless tobacco usage: A cross-sectional study. **Indian Journal of Cancer**, v. 55, n. 4, p.:404-9, 2018.

KANSKY, A.A., *et al.* Epidemiology of oral mucosal lesions in Slovenia. **Radiology and Oncology**, v. 52, n. 3, p.:263-66, 2018.

KARA, Y.A. The Measurement of Serum Tumor Necrosis Factor-alpha Levels in Patients with Lichen Planus. **Indian Journal of Dermatology**, v. 63, n. 4, p.:297-300, 2018.

KAUR, M.; KAUR, T.; KAMBOJ, S.S.; SINGH, J. Roles of Galectin-7 in Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 2, p.:455-61, 2016.

KAWADA, T. Sleep, mental status, and biological markers in saliva in patients with oral lichen planus. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 45, n. 6, p.:467, 2016.

KRAMER, I.R.; LUCAS, R.B.; PINDBORG, J.J.; SOBIN, L.H. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 46, n. 4, p.:518-39, 1978.

KRUTCHKOFF, D.J.; CUTLER, L.; LASKOWSKI, S. Oral lichen planus: the evidence regarding potential malignant transformation. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 7, n. 1, p.:1-7, 1978.

LOPES, M.L., *et al.* Pattern of galectins expression in actinic cheilitis with different risks of malignant transformation. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 45, n. 8, p.:621-6, 2016.

LU, R.; ZHOU, G. Oral lichenoid lesions: Is it a single disease or a group of diseases? **Oral Oncology**, v. 117, n.:105188, 2021.

MA, R.J.; TAN, Y.Q.; ZHOU, G. Aberrant IGF1-PI3K/AKT/MTOR signaling pathway regulates the local immunity of oral lichen planus. **Immunobiology**, 2019.

MANKAPURE, P.K., *et al.* Clinical profile of 108 cases of oral lichen planus. **Journal of Oral Science**, v. 58, n. 1, p.:43-7, 2016.

MESQUITA, J.A., *et al.* Association of immunoexpression of the galectins-3 and -7 with histopathological and clinical parameters in oral squamous cell carcinoma in young patients. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 273, n. 1, p.:237-43, 2016.

MOZAFFARI, H.R., *et al.* Evaluation of serum and salivary interferon- γ levels in patients with oral lichen planus: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 127, n. 3, p.:210-217, 2019.

MOZAFFARI, H.R., et al. A systematic review and meta-analysis study of salivary and serum interleukin-8 levels in oral lichen planus. **Postepy Dermatologii / Alergologii**, v. 35, n. 6, p.:599-604, 2018.

MUNIZ, J.M., et al. Galectin-9 as an important marker in the differential diagnosis between oral squamous cell carcinoma, oral leukoplakia and oral lichen planus. **Immunobiology**, v. 220, n. 8, p.:1006-11, 2015.

NOGUEIRA, P.A.; CARNEIRO, S.; RAMOS-E-SILVA, M. Oral lichen planus: an update on its pathogenesis. **International Journal of Dermatology**, v. 54, n. 9, p.:1005-10, 2015.

OLSON, M.A.; ROGERS, R.S. 3rd.; BRUCE, A.J. Oral lichen planus. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 4, p.:495-504, 2016.

RIMKEVIČIUS, A., et al. Oral lichen planus: a 4-year clinical follow-up study. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 47, n. 2, p.:514-22, 2017.

ROOPASHREE, M.R., et al. Pathogenesis of oral lichen planus--a review. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 10, p.:729-34, 2010.

SHET, R., et al. A study to evaluate the frequency and association of various mucosal conditions among geriatric patients. **Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 14, n. 5, p.:904-10, 2013.

SOLIMANI, F. et al. Lichen planus - a clinical guide. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 19, n. 6, p.:864-882, 2021.

SONG, L., et al. Galectin-3 in cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 431, p.:185-91, 2014.

TOPCU, T.O., et al. The clinical importance of serum galectin-3 levels in breast cancer patients with and without metastasis. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 14, n. supplement, p.:S583-S586, 2018.

THIEMANN, S.; BAUM, L.G. Galectins and Immune Responses-Just How Do They Do Those Things They Do? **Annual Review of Immunology**, v. 34, p.:243-64, 2016.

TSUSHIMA, F. et al. Malignant transformation of oral lichen planus: a retrospective study of 565 Japanese patients. **BMC Oral Health**, v. 21, n. 1, p.:298, 2021.

VALACH, J., et al. Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 11, p.:2499-508, 2012.

VAN DER MEIJ, E.H.; VAN DER WAAL, I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 32, n. 9, p.:507-12, 2003.

VARGHESE, S.S., et al. Epidemiology of Oral Lichen Planus in a Cohort of South Indian Population: A Retrospective Study. **Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n. 1, p.:55-9, 2016.

XIE, R.D., *et al.* Galectin-1 inhibits oral intestinal allergy syndrome. **Oncotarget**, v. 8, n. 8, p.:13214-22, 2017.

YANG, J.Y.; WANG, F.; ZHOU, G. Characterization and function of circulating mucosal-associated invariant T cells and $\gamma\delta$ T cells in oral lichen planus. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 51, n.1, p.:74-85, 2022.

ZEINALI, M.; ADELINIK, A.; PAPIAN, S.; KHORRAMDELAZAD, H.; ABEDINZADEH, M. Role of galectin-3 in the pathogenesis of bladder transitional cell carcinoma. **Human Immunology**, v. 76, n. 10, p.:770-4, 2015.

ANEXO A – Parecer de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual da Paraíba.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO CD4, CD8, GALECTINAS-1, -3 E -7 NO LÍQUEN PLANO ORAL E REAÇÃO LIQUENOIDE ORAL

Pesquisador: POLLIANNA MUNIZ ALVES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 14786919.2.0000.5187

Instituição Proponente: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.369.038

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo laboratorial, usando dentes lâminas codificadas (sigilo de identificação dos pacientes) de um laboratório de patologia. O projeto é relevante e apresenta boa justificativa.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar quantitativamente a imunexpressão do CD4, CD8, galectinas-1, -3 e -7 em uma série de casos de LPO e RLO, associando-os com parâmetros clínicos e morfológicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa poderá apresentar riscos mínimos por se tratar de estudos laboratoriais. O estudo utilizará lâminas codificadas que garantem a confidencialidade dos pacientes. O pesquisador se compromete de utilizar os dados para fins de acadêmicos. Os benefícios, superam os riscos ao paciente, uma vez que o projeto visa contribuir para o conhecimento da etiologia do líquen plano que ainda não está clara na literatura. Esta é uma patologia que pode representar até 81% das lesões orais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta do projeto é relevante. O líquen plano tem natureza autoimune e o projeto tenciona investigar a resposta autoimune mediada por células T que causa alterações celulares e arquiteturais ao tecido epitelial. O mecanismo de regulação desta resposta autoimune não está bem estabelecido, deste modo a investigação de proteínas que regulem este processo é importante como forma de compreensão da fisiopatologia do líquen plano oral.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta todos os termos de apresentação obrigatória.

Recomendações:

O projeto apresenta uma metodologia bem estruturada, condizendo com a proposta do estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta pendências relacionadas aos termos de apresentação obrigatórios, desta feita, somos favoráveis à sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1351613.pdf	30/05/2019 19:21:25		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Concordancia.pdf	30/05/2019 19:19:12	Luan Éverton Galdino Barnabé	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	30/05/2019 19:12:58	Luan Éverton Galdino Barnabé	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoArquivo.pdf	30/05/2019 18:53:52	Luan Éverton Galdino Barnabé	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Pesquisador.pdf	30/05/2019 18:51:43	Luan Éverton Galdino Barnabé	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa.pdf	30/05/2019 18:46:55	Luan Éverton Galdino Barnabé	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	InstitucionalLab.pdf	30/05/2019 18:46:16	Luan Éverton Galdino Barnabé	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	InstitucionalOdonto.pdf	30/05/2019 18:45:58	Luan Éverton Galdino Barnabé	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	30/05/2019 18:40:41	Luan Éverton Galdino Barnabé	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINA GRANDE, 04 de Junho de 2019

Assinado por:
Dóris Nóbrega de Andrade Laurentino
(Coordenador(a))

ANEXO B – Normas da revista.

Author Guidelines

JOURNAL SECTIONS

1. Oral Cancer and Potentially malignant disorder
2. Oral Medicine and Pathology

Clinicopathological as well as medical or surgical management aspects of diseases affecting oral mucosa, salivary glands, maxillary bones, as well as orofacial neurological disorders, and systemic conditions with an impact on the oral cavity.

3. Medically compromised patients in Dentistry

Articles discussing medical problems in Odontology will also be included, with a special focus on the clinico-odontological management of medically compromised patients, and considerations regarding high-risk or disabled patients.

4. Oral Surgery

Surgical management aspects of diseases affecting oral mucosa, salivary glands, maxillary bones, teeth, implants, oral surgical procedures. Surgical management of diseases affecting head and neck areas. ts.

5. Implantology

6. Periodontology

Medicina Oral Patología Oral y Cirugia Bucal no longer ADMITS:

1. CASE REPORTS.
2. ARTICLES focus on Prosthesis, Community and Preventive Dentistry, Clinical and Experimental Dentistry, Restorative Dentistry, Odontopediatrics, Orthodontics, TMJD Temporomandibular bone disorders and Endodontics, Cleft lip and Palate & Craniofacial Malformations.

In the above cases, we recommend to submit the paper to:

Journal of Clinical and Experimental Dentistry (ISSN 1989-5488) Indexed in SCOPUS and accepted in PubMed Central® (PMC) since 2012 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/> This is an Open Access (free access on-line) <http://www.medicinaoral.com/odo/indice.htm>

ARTICLE SUBMISSION

Articles may only be submitted through our web site and in ENGLISH. Log on our web site and we will send you an USER NAME and PASSWORD to submit the article.

<http://www.medoral.es>

For submitting NEW OR MODIFIED MANUSCRIPTS the description of the process is:

1. Log in to <http://www.medoral.es>
2. Click on "Submit a manuscript" for submitting a NEW articles. Click on "Submissions needing revision" for submitting a MODIFIED article.
3. Delete ALL previously uploaded documents, including all the figures in the case of submitting a MODIFIED article.
4. Upload a word document entitled: "Letter to the Editor".

If this is a modification of a previously submitted article, this letter should include the answers to ALL the reviewer's comments.

5. Include a separate word document entitled: "Manuscript". The manuscript must include the following items:

- Title of the article
- Authors (First and last name)
- Contact address for the corresponding author
- Running title
- Key words
- Abstract
- Text of the article
- References
- Insert ALL TABLES in the main manuscript. Each table in one page
- Figure legends

Please note that tables must have portrait orientation; we do not accept tables with landscape orientation.

DO NOT INCLUDE THE FIGURES IN THE MAIN MANUSCRIPT

If you are resubmitting a modified document in response to the reviewers' comments, all changes MUST be highlighted in RED

6. Upload figures, one at a time. Do not include figures in the manuscript document. Figures must be at least 900 X 600 pixels in size and in JPEG (.jpg) format; file size must be

less than 5 MB. Please transform your figures to JPEG format without compression in RGB format, not CMYK. All figures that do not correspond to these requirements will be rejected.

All accepted articles of this ONLINE VERSION will be published in ENGLISH and included in the SCIENCE CITATION INDEX EXPANDED (since 2008), JOURNAL CITATION REPORTS (since 2008), INDEX MEDICUS, MEDLINE, PUBMED, SCOPUS, EMCARE, EMBASE, INDICE MEDICO ESPAÑOL.

Articles will normally be included in one of the different journal sections. Authors should indicate the section in which they wish their article to be included, although the Editor may change this upon advice from reviewers. Articles received will always undergo revision by a committee of experts (peer review process). Only original articles will be accepted, authors being responsible for the meeting of this regulation. Authors are also RESPONSIBLE for all opinions, results and conclusions contained in articles, which will not necessarily be shared by the journal's Editor and reviewers. All accepted articles become the property of Medicina Oral S.L., and their date of reception and acceptance will be reflected; thus, their subsequent publication in other media is not allowed without written permission by the Editor. Authors will transfer IN WRITING the copyright of their contributions to Medicina Oral S.L.

TYPES OF ARTICLES

1. Research articles: Analytical investigations such as cross-sectional surveys, case-control studies, cohort studies and controlled clinical trials will be recommended for publication. For clinical trials, authors must specify legal permissions obtained. Articles should not exceed 12 pages (including references) in DIN A-4 format, 30 lines per page. Not more than four figures and four tables should be included; up to 30 references.
2. Review articles: Articles of special interest and those entailing an update on any of the topics identified as subjects for this journal will be accepted. They should not exceed 14 pages (references included) in DIN A-4 format, with 30 lines per page. We recommend systematic reviews and meta-analysis. They should contain a maximum of four figures and four tables per article; up to 40 references.

ARTICLE STRUCTURE

Articles should include the following:

1. First page: This should include the title of the article, as well as a running title, the authors' full name and academic post, and an address for correspondence, including telephone and fax numbers, and e-mail address.
2. Following pages: These in turn will include the following headings, according to the type of contribution (research articles, review articles):

Research articles

— Abstract, containing 150-300 words ALWAYS structured as: Background, Material and Methods, Results, Conclusions.- Key words.- Introduction.- Material and Methods: specifying statistical procedures used.- Results.- Discussion.- References

Review articles

— Abstract: containing 150-300 words ALWAYS structured as: Background, Material and Methods, Results, Conclusions.- Key words. -Introduction. - Material and methods: specifying how the search was made (date base selected, search strategy, screening and selection of the papers and statistical analysis).
- Results and Discussion. - References.

REFERENCES

1. We do NOT accept book references.
2. We only admit references of articles INDEXED in PubMed-Medline.
3. The references should be numbered consecutively in order of appearance, being quoted in parentheses in the text. Unpublished observations and personal communications should not be included as references. The Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals format is required throughout.

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Example: Authors numbering six or less should all be quoted; when more authors are present, first six names will be quoted, followed by et al.

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2002;347:284-7.

Ethical requirements regarding human and animal experimentation

Ethical consideration regarding human and animal experimentation

Authorship and contributorship Privacy and confidentiality

Protection of human subjects and animals in research

Medical Ethics Manual Ethics in Research

Conflict of interest requirements

A conflict of interest exists if authors or their institutions have financial or personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their actions. Financial relationships are easily identifiable, but conflicts can also occur because of personal relationships, academic competition, or intellectual passion.

AT THE END OF THE MANUSCRIPT all submissions to Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal must include:

1. Conflict of interest

Disclosure of all relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest.

- At the end of the text, under a subheading “Conflicts of interest”, all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of financial conflicts include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patents or patent applications, and travel grants, all within 3 years of beginning the work submitted. If there are no conflicts of interest, authors should state that.

- All authors are required to provide a signed statement of their conflicts of interest as part of the author statement form.

2. Ethics. Under a subheading of Ethics: The ethics committee approval with the reference number.

3. Source of Funding. Under a subheading of Source of Funding. In case of non funding disclose it.

4. Authors' contributions. Under a subheading of Authors' contributions.

Indexed in:

Free full-text at PMC (US National Library of Medicine, National Institute of Health, NIH/NLM, USA) since 1012 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1898/>