

FÁBIO RODRIGUES GONÇALVES DE CARVALHO

**MANIFESTAÇÕES ORAIS DO LÚPUS ERITEMATOSO:
AVALIAÇÃO CLÍNICA, HISTOPATOLÓGICA E PERFIL
IMUNO-HISTOQUÍMICO DOS COMPONENTES
EPITELIAL, MEMBRANA BASAL E RESPOSTA
INFLAMATÓRIA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Dermatologia

Orientadora: Profa Dra Sílvia Vanessa Lourenço

**São Paulo
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Fábio Rodrigues Gonçalves de

Manifestações orais do lupus eritematoso : avaliação clínica, histopatológica e perfil imuno-histoquímico dos componentes epitelial, membrana basal e resposta inflamatória / Fábio Rodrigues Gonçalves de Carvalho. -- São Paulo, 2008.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Dermatologia.

Área de concentração: Dermatologia.

Orientadora: Sílvia Vanessa Lourenço.

Descritores: 1.Lupus eritematoso sistêmico 2.Lupus eritematoso cutâneo
3.Manifestações bucais 4.Imunoistoquímica 5.Membrana basal

USP/FM/SBD-031/08

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Aparecida Constantino Vilela, responsável pelo Ambulatório de Colagenoses da Divisão de Dermatologia do HCFMUSP, pela oportunidade de freqüentar o ambulatório, pela calma, dedicação e explicações, além de estar sempre disposta a solucionar dúvidas e contribuir com o trabalho.

À Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto, coordenadora da pós-graduação do Departamento de Dermatologia do HC-FMUSP, pela confiança, incentivo e por estar sempre presente e solícita na solução de dúvidas e quaisquer problemas na Pós-Graduação.

Ao Prof. Dr. Marcello Menta Simonsen Nico, responsável pelo Ambulatório de Estomatologia da Divisão de Dermatologia do HC-FMUSP, pela oportunidade de freqüentar o ambulatório, pelas críticas, sugestões, correções e aprendizado proporcionado neste período.

À Dra. Elisa Marques, minha colega de mestrado e de ambulatório, pela ajuda nos exames dos pacientes, na busca por prontuários, pelas sugestões e pela amizade.

À Sabrina Hitomi Uyekita e ao Ricardo Hsieh, grandes amigos, colegas de faculdade, de iniciação científica e de mestrado. Obrigado pela amizade, apoio, ajuda e incentivo ao longo destes anos.

À Dirce Mary Lima, pela amizade, apoio nas horas dos experimentos que não deram certo, dicas e ensinar como trabalhar corretamente no laboratório.

Aos colegas do Instituto de Medicina Tropical (IMT), pela cooperação e pelo ótimo ambiente que desfrutei ao longo destes anos.

Aos funcionários da Divisão de Dermatologia do HC-FMUSP por toda a ajuda e contribuição neste trabalho.

Aos meus amigos, pelo apoio, torcida e amizade de sempre.

Aos meus pais pelo apoio incondicional, educação, amizade, compreensão, ajuda nos momentos mais complicados e confiança nas minhas decisões.

À minha orientadora Profa. Dra. Sílvia Vanessa Lourenço, por incentivar o meu progresso acadêmico e confiar no meu potencial; pela paciência, ajuda e dedicação durante todo este projeto. Agradeço a confiança e apoio nos bons momentos e também nas horas não tão boas, e por estar sempre presente durante todas as etapas, desde a iniciação científica até a pós-graduação, como orientadora dedicada e como amiga.

SUMÁRIO

Sumário

Lista de abreviaturas e símbolos	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Summary	
1. Introdução	1
2. Objetivos	4
3. Revisão de Literatura	6
3.1 Conceito	7
3.2 Etiopatogenia	8
3.3 Epidemiologia	11
3.4 Manifestações Gerais	12
3.4.1 Manifestações clínicas	12
3.4.2 Manifestações musculoesqueléticas	14
3.4.3 Manifestações renais	14
3.4.4 Manifestações no sistema nervoso	15
3.4.5 Manifestações cardiovasculares	16
3.4.6 Manifestações hematológicas	17
3.4.7 Manifestações cutâneas	17
3.4.8 Manifestações da mucosa oral	20
3.4.9 Diagnóstico diferencial das lesões orais do LE	22
3.5 Histopatologia das lesões orais do LE	23
3.6 Imunofluorescência das lesões orais do LE	24
3.7 Imuno-histoquímica das lesões orais do LE	25
3.7.1 Maturação, proliferação epitelial e apoptose	25
3.7.2 Resposta Inflamatória	26
4. Métodos	27
4.1 Análise da casuística	28
4.2 Aprovação do comitê de ética	28
4.3 Classificação das lesões orais	29
4.4 Análise dos aspectos histopatológicos	29
4.5 Análise imuno-histoquímica	30
5. Resultados	33
6. Discussão	60
7. Conclusões	68
8. Anexos	71
9. Referências	80

LISTAS

Lista de abreviaturas

CK	citoqueratina
CSA	Catalysed Signal Amplification
ECG	eletrocardiograma
et al.	e outros
EUA	Estados Unidos da América
F	sexo feminino
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	hematoxilina eosina
IFD	imunofluorescência direta
IL	interleucina
LE	lúpus eritematoso
LEC	lúpus eritematoso cutâneo
LES	lúpus eritematoso sistêmico
M	sexo masculino
MB	membrana basal
MW	micro-ondas
PAS	ácido periódico de Schiff
SNC	sistema nervoso central
TNF	fator de necrose tumoral
UVA	ultravioleta A

UVB ultravioleta B

Lista de símbolos

μm micrômetros

$^{\circ}\text{C}$ graus Celsius

Lista de Tabelas

Tabela 1: Anticorpos e detalhes sobre o protocolo utilizado 32

Anexos:

Tabela 2: Imuno-fluorescência Direta 73

Tabela 3: Casos clínicos de Lúpus Eritematoso 76

Lista de Figuras

Figura 1- Aspectos clínicos das lesões lúpicas labiais	38
Figura 2- Aspectos clínicos das lesões lúpicas orais	40
Figura 3- Aspectos clínicos das lesões lúpicas orais	42
Figura 4- Aspectos clínicos das lesões lúpicas orais	44
Figura 5- Aspectos histopatológicos das lesões lúpicas orais	46
Figura 6- Aspectos imuno-histoquímicos de marcadores do revestimento epitelial em lesões lúpicas orais	49
Figura 7- Resposta inflamatória das lesões lúpicas da cavidade oral	52
Figura 8- Marcadores da proliferação e apoptose em lesões lúpicas da mucosa oral	55
Figura 9- Imuno-expressão das proteínas da matriz extracelular em lesões lúpicas da mucosa oral	58

RESUMO

Introdução: lúpus eritematoso é uma doença crônica auto-imune que afeta o tecido conjuntivo e múltiplos órgãos. Manifestações orais são pouco freqüentes, caracterizadas por lesões de aspectos variados. Diagnósticos diferenciais incluem líquen plano, leucoplasia, eritema polimorfo e pêfigo vulgar. Métodos: O objetivo deste trabalho foi estudar as lesões orais de 46 doentes com LE do ambulatório de Colagenoses e de Estomatologia do HC-FMUSP, enfocando os aspectos clínicos, histológicos, a proliferação e maturação epitelial (expressão de citoqueratinas, p-53 e ki-67), as proteínas da membrana basal (colágeno IV, fibronectina e laminina) e a constituição do infiltrado inflamatório (anticorpos CD3, CD4, CD8, CD 20, CD 68 e CD1A). Resultados: Quarenta e seis doentes (34 mulheres e 12 homens) apresentaram lesões orais, todos com alterações histológicas de mucosite de interface, infiltrado inflamatório superficial e profundo e depósitos subepiteliais PAS positivos. Positividade para IgM ao longo da membrana basal do epitélio foi observada pelo exame de IFD na maioria dos doentes. A avaliação das citoqueratinas mostrou um epitélio hiperproliferativo com expressão de CK 5/6 e CK 14 em todas as camadas, além da marcação do p-53 e ki-67 na camada basal. Os linfócitos T subtipo CD4 predominaram no infiltrado inflamatório, sendo mais rara a presença de linfócitos B e macrófagos. Células de Langerhans foram ausentes. Colágeno IV mostrou intensa expressão na membrana basal, a expressão da fibronectina foi mais difusa na lâmina própria e não se observou a presença de laminina. Conclusão: as lesões orais do LE predominam no sexo feminino e exibem aspectos clínicos variados. A mucosa jugal e lábios foram mais afetados. O

aspecto histológico foi o de mucosite de interface associada a infiltrado inflamatório superficial e profundo com predomínio de linfócitos T CD4+, As citoqueratinas mostraram alteração no padrão de distribuição, caracterizando um epitélio hiperproliferativo. Na matriz extracelular predominou o colágeno IV na membrana basal.

SUMMARY

ORAL MANIFESTATIONS OF LUPUS ERITHEMATOSUS: CLINICAL AND HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PROFILE OF EPITHELIAL COMPONENT, BASEMENT MEMBRANE AND INFLAMMATORY INFILTRATE

Background: Lupus erythematosus (LE) is a multifactorial autoimmune disease of unknown cause. It may affect the oral mucosa in either its acute, subacute and chronic forms, with varied prevalence. Reports evaluate that mucosal involvement ranges from 9-45% in patients with systemic disease and from 3-20% in patients with chronic cutaneous involvement. Methods: Forty-six patients with confirmed diagnosis of LE, presenting oral lesions were included in the study. Oral mucosal lesions were analyzed clinically and their histopathological features were investigated. Additionally, using immunohistochemistry, the status of epithelial maturation proliferation and apoptosis of the biopsied lesions was assessed through the expression of cytokeratins, ki-67 and Fas. The inflammatory infiltrate constitution was also assessed using immunohistochemistry against the following clusters of differentiation: CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 and CD1A. Finally, the components of extracellular matrix were analyzed through the expression of collagen, laminin and fibronectina. Results: From 46 (15,45%) patients with specific LE oral lesions 34 were females (25) with cutaneous LE and 9 with systemic LE) and 12 were males (11 with cutaneous LE and 1 with systemic LE) out of 298 patients examined with lupus erythematosus. Clinical aspects of lesions varied, and lips

and buccal mucosa were the most affected sites. Histologically, lesions revealed lichenoid mucositis with perivascular infiltrate and thickening of basement membrane. Cytokeratins profile showed hyperproliferative epithelium, with expression of CK5/6 and CK14 on all epithelial layers, CK16 on all suprabasal layers. CK10 was verified on the prickle cell layer only. Ki-67 and p53 were sparsely positive and Fas was present both in the basal layer of the epithelium and in the inflammatory infiltrate. Inflammatory infiltrate was predominantly composed by T lymphocytes of the CD4 subtype, with a minor prevalence of B-lymphocytes, isolated macrophages and rare Langerhans cells. Matrix proteins collagen IV and laminin were present mainly in the basement membranes of the epithelium and blood vessels, whilst fibronectina was not detected. Conclusions: Oral lesions of lupus erythematosus show a variety of clinical aspects and histologically consist of a lichenoid mucositis with deep inflammatory infiltrate. Patterns of cytokeratins expression are of a hyperproliferative epithelium and the inflammatory infiltrate is composed predominantly of T-lymphocytes positive lymphocytes. This panel must analyzed in relation to the inflammatory cytokines for a better understanding of the mechanisms of the disease.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução:

O termo “Lúpus”, do latim “lobo”, tem sido empregado desde o século XVI para descrever lesão destrutiva, ulcerada e eritematosa da pele da face como se fossem mordidas de um lobo (lúpus), e ao longo da história, diversos autores vêm estudando tais lesões na tentativa de melhor caracterizar o lúpus como entidade patológica (Antonovych¹).

Em 1852, CASENAVE contribuiu significativamente nesse sentido, em sua publicação “Lupus erythemateux”, descrevendo a relação das lesões com a foto-sensibilidade, alterações articulares e maior incidência no sexo feminino. HEBRA e KAPOSI (1845 e 1875) descreveram as formas discóide e disseminada da doença, enfatizadas por OSLER, entre 1895 e 1904, que associava os sintomas a possíveis alterações vasculares (não comprovadas em sua época). Entretanto, o maior avanço na compreensão da doença foi a caracterização de células “LE” (lúpus eritematoso) na medula óssea por HARGRAVE, em 1948, desencadeando outros estudos que culminaram com a descoberta de anticorpos anti-nucleares envolvidos na patogênese do lúpus, em 1957, por HASERICK (Antonovych¹).

Em 1958, FRIOU descreveu um método para detecção destes fatores séricos, que foram então identificados como anticorpos anti-nucleares (caracterização dos anticorpos anti-DNA). A detecção dos anticorpos anti-fosfolipídicos *in vitro* aconteceu em 1952 (Moreira e Gama²).

Lúpus Eritematoso (LE) é uma doença multi-sistêmica auto-imune que pode envolver tanto o tegumento (pele e mucosas) quanto órgãos como rins, músculos, coração, entre outros (Louis e Fernandes³; Plemons et al⁴). A presença de lesões orais é relativamente freqüente, e as avaliações clínica e histopatológica dessas lesões são de grande importância para o diagnóstico precoce do lúpus, uma vez que podem ser a primeira manifestação na história natural da doença. As lesões orais do LE são semelhantes clinicamente a outras entidades, e o diagnóstico diferencial é firmado pela histopatologia convencional com hematoxilina e eosina e coloração pelo PAS (ácido periódico de Schiff), além do estudo por imunofluorescência direta que permite a identificação da deposição de imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) e complemento na zona da membrana basal (Sampaio e Rivitti⁵).

Nosso trabalho visa estudar as manifestações orais do lúpus eritematoso nas suas diversas formas, analisando seus aspectos clínicos e histopatológicos. Ainda, análise imuno-histoquímica do “status” proliferativo e da maturação epitelial, bem como os componentes do infiltrado inflamatório será abordada no trabalho.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos:

Pretendemos, no presente estudo, analisar as manifestações clínicas e os aspectos histopatológicos das lesões lúpicas orais abordando os seguintes itens:

1. Análise da casuística clínica das manifestações orais do lúpus eritematoso dos doentes dos ambulatórios de Colagenoses e de Estomatologia da Divisão de Dermatologia do HCFMUSP.
2. Descrição das características clínicas das lesões orais do LE encontradas na amostra.
3. Análise dos aspectos histopatológicos das lesões orais do lúpus eritematoso.
4. Análise qualitativa por meio da técnica de imuno-histoquímica dos seguintes fatores:
 - 4.1 Maturação e proliferação epitelial;
 - 4.2 Proteínas da membrana basal;
 - 4.3 Componentes do infiltrado inflamatório

3. REVISÃO DE LITERATURA

3. Revisão de Literatura:

3.1 Conceito:

Lúpus eritematoso (LE) é uma doença auto-imune que acomete principalmente mulheres adultas. Suas apresentações clínicas são variadas, compreendendo desde doença cutânea, com manifestações sistêmicas leves e transitórias, a doença multi-sistêmica, com lesões cutâneas em cerca de 80 a 90% dos casos. Seu diagnóstico e subclassificação são baseados na correlação entre as manifestações clínicas e as alterações sorológicas (Antonovych¹; Carrel et al.⁶; Crowson e Magro⁷; Hershfus⁸; Hughes et al.⁹; Moreira e Gama²; Orteu et al.¹⁰; Rhodus e Johnson¹¹).

LE é uma doença heterogênea que inclui um largo espectro de formas clínicas, nas quais o envolvimento da pele e mucosas pode ou não estar associado ao envolvimento sistêmico (Sontheimer e Provost¹²).

Caracteriza-se pela produção primária de auto-anticorpos que afetam a pele, os sistemas nervoso central, cárdio-vascular, muscular e esquelético, as membranas serosas, pulmões, rins e células sanguíneas (Cooper et al.¹³; de Rossi e Glick¹⁴).

3.2 Etiopatogenia:

O LE é considerado doença auto-imune, mediada por complexos imunes patogênicos, com produção de auto-anticorpos que reagem com uma variedade de componentes celulares e extra-celulares, incluindo DNA e outros ácidos nucléicos, nucleoproteínas, componentes citoplasmáticos, antígenos de superfície e componentes da matriz extracelular (Antonovych¹). Essas imunoglobulinas participam da formação de depósitos imunes, que desencadeiam resposta inflamatória culminando com morte celular, destruição tecidual ou falência do órgão afetado (de Rossi e Glick¹⁴).

A etiopatogenia do LE é desconhecida, mas acredita-se que decorra de acúmulo de alterações associadas, entre as quais variações hormonais, ainda não comprovadas, mas que talvez expliquem a maior incidência no sexo feminino. Especula-se também a possível relação com fatores genéticos, principalmente quando há a coincidência de casos familiares (associação de doenças congênitas de alguns fatores do complemento, maior incidência de auto-anticorpos, especialmente o fator anti-núcleo (FAN) em familiares sadios); antígenos de histocompatibilidade, como o HLA-B8, HLA-Dr2 e DQ3; infecções virais, ambientais, radiação ultravioleta A (UVA), stress, drogas, traumas físicos (Duarte¹⁵; Rhodus e Johnson¹¹; Tan¹⁶).

Radiação ultravioleta pode precipitar o início da doença ou causar exacerbação do LE em 60% dos doentes, atuando nos mecanismos de exposição de auto-antígenos, onde pode desencadear a formação de auto-

anticorpos em pacientes predispostos. Foto-testes com UVA e UVB mostram o desenvolvimento das lesões de pele em doentes com LE. O mecanismo de ativação da radiação ultravioleta no LE é desconhecido, embora se saiba que pode haver indução de células supressoras ou alterações no ritmo da apoptose dos queratinócitos (Moreira e Gama²; Hanh¹⁷).

Orteu et al.¹⁰, em 2001, realizaram uma excelente revisão sobre a influência da radiação ultravioleta na etiopatogenia do LE, mostrando que essa está envolvida tanto na fase inicial e do desencadeamento, como na perpetuação das lesões de pele. Esses autores resumem que a apoptose pode ser importante mecanismo na etiopatogenia do LE, levando à apresentação de auto-antígenos na epiderme. A radiação UV é importante indutora da apoptose, provavelmente decorrente do dano da radiação UVA nos queratinócitos, os quais sofrem falhas no reparo do DNA, proporcionando um aumento da proteína p-53, alterando o mecanismo reparador da mitose, perpetuando o erro e culminando na apoptose destas células. Além da morte celular e geração de neo-antígenos, a radiação UV induz e modula a liberação de mediadores da inflamação, por meio do aumento da permeabilidade da membrana celular para as células apresentadoras de antígenos circulantes. Estes são processados pelos macrófagos, induzindo produção de IL-1, TNF α e IL-10, e aumenta a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, facilitando a migração de leucócitos, estimulando a produção de linfócitos B, iniciando assim a formação de auto-anticorpos. O TNF α , em especial, além de induzir

apoptose de queratinócitos, também promove a maturação de células dendríticas e sua migração para linfonodos regionais, e a conseqüente quimiotaxia de células T e sua migração para a pele, além de ser responsável por estados febris não-específicos. Uma vez formados os complexos antígeno-anticorpo, estes se tornam circulantes e/ou depositam-se nos diferentes tecidos, causando conseqüentes lesões do LE (Duarte¹⁵; Hanh¹⁷; Synkowski et al.¹⁸; Kuhn et al.¹⁹; Orteu et al.¹⁰).

Para os auto-anticorpos formados estabelecerem uma condição patológica, é necessária uma interação de ações endógenas e exógenas, a qual pode resultar ou não na quebra da tolerância imunológica; quando este caráter patológico é estabelecido, há produção de células de memória T e B. A disfunção estabelecida depende do tipo do complexo antígeno-anticorpo formado, resultando em auto-anticorpos diferentes, como por exemplo, os seguintes anticorpos: anti Ds-DNA (grande probabilidade de acometimento renal), anti-Ro-ssA (LE neonatal e fotossensibilidade), anti-Sm (marcador específico de LES), anti-MA (grande probabilidade de lesão neurológica), anti-JO-1 (doença sistêmica muscular-dermatomiosite) e anti-ss-DNA (grande probabilidade do LE tornar-se sistêmico). Há ainda fatores que começam a ganhar importância nos dias de hoje como alimentos transgênicos (pelo suposto estímulo à reação auto-imune), substâncias como resinas e óleos pesados, implantes cutâneos dérmicos e subcutâneos, os quais podem ser capazes de estimular a produção de auto-anticorpos (Duarte¹⁵).

3.3 Epidemiologia:

O LES é mais freqüente em mulheres do que em homens (8:1). Todas as raças são afetadas. A faixa etária predominante é entre 20 a 40 anos, mas casos em crianças são descritos (Sontheimer²⁰).

A prevalência de LES nos EUA é de 14,6 a 50,8 doentes para cada 100.000 habitantes. Estudos clínicos demonstram que 90% dos doentes com LE são mulheres. Entre 15 a 64 anos, as mulheres são de 6 a 10 vezes mais acometidas que os homens, e acima dos 65 anos, elas são acometidas 4 vezes mais que os homens. Mulheres negras na faixa etária compreendida entre 15 a 64 anos são 4 vezes mais acometidas que as mulheres brancas (Hochberg²¹).

Em 1985, o “National Arthritis Data Workgroup”, analisou 131.000 doentes com LES, sendo que 7.000 doentes eram homens brancos, 7.000 doentes homens negros, 43.000 doentes mulheres brancas e 74.000 doentes mulheres negras (Hochberg²¹).

A incidência do LES é sete vezes maior quando comparada ao LEC. Embora o LEC possa ocorrer na infância, a manifestação ocorre entre 20 a 40 anos de idade. Mulheres e homens são acometidos (3:1). Todas as raças são afetadas pelo LEC, mas maior prevalência na raça negra (Sontheimer²⁰).

Em estudo brasileiro de 2003, Freitas e Proença²² avaliaram aspectos epidemiológicos do LE cutâneo crônico, relatando o predomínio da doença no sexo feminino sobre o masculino (3,4:1). Estes autores ainda identificaram lesões em mucosa ou epitélio de transição em 27,2% dos casos.

3.4 Manifestações Gerais:

3.4.1 Manifestações clínicas:

Os sintomas como mal-estar, fadiga, febre e perda de peso são comuns no LE, como sinais prodrômicos ou na fase ativa da doença, e são as queixas mais comuns relatadas pelos doentes. Esses podem ser os primeiros sintomas dos doentes com lúpus. Embora a doença seja geralmente insidiosa, doentes podem apresentar a experiência cumulativa da combinação dos sintomas na dependência dos sistemas acometidos (Hershfus⁸; Rhodus e Johnson¹¹).

A manifestação inicial varia, mas geralmente as primeiras alterações ocorrem nas articulações e na pele. O curso e o prognóstico são variáveis e caracterizados por períodos de quiescência e exacerbação da doença que pode envolver órgãos ou tecidos em várias combinações (Louis e Fernandes³).

Para classificação do LES a Academia Americana de Reumatologia, em 1982, adotou uma lista de onze critérios diagnósticos, confirmando-se a hipótese de LES se quatro deles forem positivos. Os critérios revisados em 1997 compreendem: eritema malar, lesão cutânea crônica (discóide), fotossensibilidade, úlceras orais ou nasofaríngeas, artrite não erosiva (acometendo duas ou mais articulações), pleurite (dor, atrito, derrame) ou pericardite (dor, atrito, derrame, alterações de eletrocardiograma), acometimento renal, convulsão ou psicose, alterações hematológicas,

alterações imunológicas e presença de anticorpos antinucleares (Kalunian²³; Louis e Fernandes³; Moreira e Gama²; Oliveira²⁴).

Critérios Diagnósticos do Lúpus Eritematoso Sistêmico:

- 1- *Eritema malar*
- 2- *Lesão discóide*
- 3- *Fotossensibilidade*
- 4- *Úlceras orais*
- 5- *Artrite*
- 6- *Serosite* (Pleurite, pericardite).
- 7- *Doença renal* (proteinúria superior a 0,5g/dia ou 3+, cilindrúria).
- 8- *Distúrbios neurológicos* (convulsões ou psicose).
- 9- *Distúrbios hematológicos* (anemia hemolítica, e/ou leucopenia inferior a 4.000/mm³ em duas ocasiões, e/ou linfopenia inferior a 1.500/mm³ em duas ou mais ocasiões, e/ou trombocitopenia inferior a 100.000/mm³).
- 10- *Alterações imunológicas* (células LE positivas, e/ou anticorpo anti-DNA nativo, e/ou anticorpo para o antígeno Sm, e/ou reação sorológica falso-positiva para lues e confirmada pelos testes de imobilização do *Treponema pallidum*).
- 11- *Anticorpos antinucleares*.

(Kalunian²³; Louis e Fernandes³; Moreira e Gama²; Oliveira²⁴).

3.4.2 Manifestações musculoesqueléticas:

As dores musculares e articulares são uma das primeiras manifestações do LE. A artrite, usualmente é simétrica e acomete as articulações interfalangianas proximais, joelhos, punhos, e articulações metacarpofalangeais (Biesecker et al.²⁵; Hershfus⁸; Kalunian²³; Moreira e Gama²; Oliveira²⁴; Sontheimer²⁰).

Dor articular moderada a intensa ocorre em 50% dos doentes. Dor, rigidez e inflamação articular apresentam padrão recorrente, e o início da manifestação pode ser insidioso ou agudo (Kalunian²³; Moreira e Gama²; Oliveira²⁴; Sontheimer²⁰).

Envolvimento da articulação têmporo-mandibular é documentada em 60% dos casos de doentes com LE (Esdaile et al.²⁶), e alterações radiológicas ocorrem em 30% dos casos (Schjødt²⁷ em 1984), podendo ser observados achatamento e erosão dos côndilos (Hughes et al.⁹).

3.4.3 Manifestações renais:

Cerca de 50% dos doentes com LES apresentam doença renal. Embora a grande maioria dos doentes seja assintomática, hipertensão e alterações

laboratoriais podem ser detectadas. Deposição de imunoglobulinas e complemento, e a inflamação do parênquima renal resultam em insuficiência renal, e vários níveis de nefrite, representando complicação mais séria da doença (Hooker²⁸; Hughes et al.⁹; Rhodus e Johnson¹¹; Sontheimer²⁰).

Os critérios diagnósticos do LES consideram evidências de lesão renal a proteinúria superior a 0,5g/ 24 horas e a presença de cilindros celulares. São também sinais comuns de envolvimento renal a presença de hematúria (mais de 5 hemácias por campo), aumento da creatinina sérica e hipertensão arterial (Kalunian²³; Oliveira²⁴; Sontheimer²⁰).

3.4.4 Manifestações no sistema nervoso:

O envolvimento do sistema nervoso central ocorre em 24 a 51% dos casos e pode tanto ser a primeira manifestação do LES quanto surgir durante a evolução da doença, o que é mais freqüente, determinando maior morbidade. Existe um amplo espectro de manifestações neurológicas e/ou psiquiátricas, sendo mais freqüente a diminuição da capacidade cognitiva, de memória, delírios, afasia, hemiparesia, cefaléia e mudanças sutis de comportamento. O espectro varia desde neuropatias periféricas a convulsões focais ou generalizadas, acidente vascular cerebral, coréia, mielite transversa, alucinações, delírio e coma (Sontheimer²⁰; Wallace e Metzger²⁹).

A etiopatogenia dessas lesões é multifatorial, sendo agravada pela presença de septicemia, distúrbios hidroeletrólíticos, uremia, hipertensão arterial e uso de corticosteróides. O diagnóstico do envolvimento neuropsiquiátrico no LES é clínico, a presença de anticorpos anti-P é muito sugestiva de comprometimento neuro-psíquico (Kiss e Shoenfeld³⁰), e as provas da atividade da doença nem sempre ajudam na determinação da associação da manifestação com o LES. A ressonância magnética evidenciando vasculite é método de imagem auxiliar no diagnóstico do comprometimento do SNC (Wallace e Metzger²⁹).

3.4.5 Manifestações cardiovasculares:

Mais de 53% dos doentes com LE apresentam três vezes mais chance de desenvolver alterações cardíacas, que podem incluir pericardite, endocardite, miocardite e aneurisma da aorta (Hughes et al.⁹). Endocardites Libman-Sacks são relatadas em mais de 50% dos doentes com LE. Injúrias microscópicas do endotélio podem não causar turbulência audível, mas podem servir como depósito para o acúmulo de microorganismos durante surtos de bacteremia. Entretanto, controvérsias existem quando o assunto é a realização de profilaxia antibiótica nestes doentes. A profilaxia antibiótica deve ser considerada, especialmente se os doentes apresentarem contagem baixa dos leucócitos e

estiverem sob terapia imunossupressora (Louis e Fernandes³; Quismorio Jr³¹; Sontheimer²⁰).

3.4.6 Manifestações hematológicas:

Os achados hematológicos e sorológicos em doentes com LE ativo são: anemia, leucopenia, linfocitopenia, trombocitopenia, aumento da taxa de hemossedimentação, hipergamaglobulinemia, diminuição dos níveis séricos do complemento, e vários anticorpos contra componentes do núcleo e do citoplasma. Outros achados são reações sorológicas falso-positivas para sífilis e fator reumatóide (Schjødt²⁷ em 1984; Sontheimer²⁰).

Problemas com hemostasia em doentes com LE podem resultar da presença de fatores anticoagulantes (Schwartz e Esseltine³²).

3.4.7 Manifestações cutâneas:

Segundo o tipo de comprometimento cutâneo, as lesões dermatológicas do LE são classificadas em aguda, subaguda e crônica.

As lesões agudas subdividem-se em eritemato-edematosas e bolhosas. As lesões agudas eritemato-edematosas distribuem-se pela face (erupção em vespertilio ou “asa de borboleta”) e tronco, podendo ser disseminadas (Connolly³³; Crowson e Magro⁷; Wallace³⁴). Caracterizam-se histopatologicamente por uma dermatite de interface leve, com discreta

degeneração hidrópica da camada basal (MB) e mucina na derme, além de membrana basal espessa (evidenciada pela técnica histoquímica do PAS). A imunofluorescência direta (IFD) mostra deposição de imunoglobulina e complemento na zona da membrana basal (Crowson e Magro⁷; Wallace³⁴).

O LE bolhoso é forma aguda caracterizada pela presença de lesões bolhosas e urticadas de diversos tamanhos disseminadas pelo tegumento, pele e mucosas. Na histopatologia observa-se dermatite de interface com clivagem dermo-epidérmica e presença de microabscessos de neutrófilos nas papilas dérmicas, e a IFD mostra deposição de imunoglobulina e complemento na zona da membrana basal.

Doentes com LE agudo cursam com a forma sistêmica do lúpus eritematoso, com seus comemorativos clínicos e laboratoriais. As lesões do LE agudo se resolvem sem deixar seqüelas (Connolly³³).

O lúpus cutâneo subagudo é mais freqüente em indivíduos da raça branca (85%), com média de idade de 43 anos. Aproximadamente metade dos doentes com lúpus cutâneo subagudo apresentam 4 ou mais critérios da ARA para a classificação do LES. Nos doentes acometidos pelo lúpus cutâneo subagudo, as lesões da pele se resolvem sem cicatriz, apenas apresentando despigmentação residual (Callen³⁵).

As lesões cutâneas subagudas do LE são classificadas em psoriasiformes e anulares policíclicas acompanhadas de fotossensibilidade e se localizam nos braços, antebraço e mãos, regiões posterior e anterior do tórax, e menos freqüentemente na face e fronte. As lesões psoriasiformes apresentam-se como

placas eritemato-escamosas bem delimitadas e com escamas aderentes. As lesões anulares policíclicas são placas eritemato-edematosas indolores e confluentes, semelhantes às do eritema polimorfo. Lesões hipocrômicas vitiligóides podem ocorrer. Na histopatologia observa-se dermatite de interface com presença de degeneração hidrópica da camada basal e apoptose, infiltrado linfo-plasmocitário e espessamento leve da membrana basal ao PAS. Anticorpos anti-Ro são encontrados em 50 a 60% dos doentes com LE subagudo. Manifestações sistêmicas podem ser observadas em aproximadamente 50% dos casos, com menor índice de comprometimento clínico e sinais laboratoriais (Chlebus et al.³⁶; Tomeszewski³⁷; Wallace³⁴).

As lesões crônicas do LE compreendem as formas discóide, profunda, túmida e perniose lúpica. A lesão crônica de LE mais comum é a lesão discóide. Esta se caracteriza por pápulas eritemato-infiltradas e escamosas que se expandem e confluem formando lesões eritemato-escamosas atróficas, com escamas aderentes, espículas córneas foliculares, superfície apergaminhada atrófica e discrômica com telangectasia. Lesões intensamente queratósicas são denominadas lúpus verrucoso. As lesões discóides localizam-se predominantemente na face, pavilhões auriculares e couro cabeludo, onde provocam alopecia cicatricial. O LEC pode ser localizado e disseminado (Childers³⁸; Sontheimer e Provost¹²; Tomeszewski³⁷).

A alopecia cicatricial é uma manifestação comum, que evolui com cicatrizes, determinando um caráter irreversível para a alopecia (Oliveira²⁴;

Sontheimer²⁰; Wallace³⁴). Nas outras formas cutâneas do lúpus ocorre alopecia difusa não cicatricial que regride com o controle da doença.

O lúpus túmido é um subtipo raro do LE cutâneo crônico, tendo sido descrito inicialmente por Gougerot & Bournier em 1930. Clinicamente apresenta eritema, lesões urticariformes ou placas lisas, eritemato-violáceas, brilhantes, localizadas na cabeça e no pescoço, muitas vezes com descamação fina discreta. As lesões podem apresentar prurido; ao regredirem não deixam cicatrizes e, quando recorrem, o fazem nos locais originalmente afetados. No lúpus profundo (paniculite lúpica) são acometidos face, pescoço, ombros e braços; eventualmente quadris e regiões glúteas. Clinicamente notam-se nódulos eritematosos subcutâneos, duros, bem definidos. A pele suprajacente pode apresentar lesões típicas de LED ou mesmo ulcerações (Duarte¹⁵; Sampaio e Rivitti⁵).

Manifestações tegumentares podem ainda acometer mucosas, incluindo a mucosa oral.

3.4.8 Manifestações da mucosa oral:

A prevalência das manifestações orais no LE é incerta, e de acordo com alguns autores, estas manifestações podem variar entre 9 e 45% em doentes com LES, sendo mais freqüentes nos momentos de exacerbação da doença e

de 3 a 20% em doentes com LEC (Wallace³⁴; Burge³⁹; Jonhson et al.⁴⁰; Schiødt²⁷ em 1984).

As lesões orais podem iniciar como petéquias no LES, evoluindo para lesões ulceradas, recobertas por pseudomembrana, apresentando halo eritematoso ao redor, com ou sem sintomatologia dolorosa (Jungell et al.⁴¹; Wallace³⁴).

Outras lesões orais do LES apresentam-se como ulcerações, enantema, placas esbranquiçadas e lesões purpúricas. A diversidade clínica das lesões orais permite diagnóstico diferencial clínico com lesões orais do líquen plano, lesões traumáticas, leucoplasia e candidose, e há necessidade de estudo histológico e micológico. O acometimento da semimucosa labial constitui a queilite lúpica que deve ser diferenciada da queilite actínica (Hughes et al.⁹).

Em 1978, Urman et al.⁴², estudam 47 doentes com lesões orais do LES, sendo que 26% deles apresentam lesões orais localizadas no palato duro (82%), mucosa jugal e gengiva, sempre na fase ativa da doença, e em 1984, Jonhson et al.⁴⁰ relatam que 45% dos doentes com LES apresentam lesões em mucosa oral e labial.

Em torno de 25% dos casos de LEC apresentam lesões orais, as quais usualmente coexistem ou podem preceder ocasionalmente as manifestações cutâneas. A mucosa jugal, palato e o vermelhão do lábio são as áreas mais envolvidas. Os lábios, particularmente os inferiores são freqüentemente afetados, e podem estar acometidos por fissuras, sangramento e edema. Lesões em forma de placas ou botões, hiperqueratósicas, em mucosa jugal são

as mais encontradas no LEC (Edwards e Gayford⁴³; Hershfus⁸; Hughes⁹; Jungell⁴¹; Rhodus e Johnson¹¹; Schiødt²⁷ em 1984; Wallace³⁴).

As lesões crônicas do LE podem ser susceptíveis a infecção secundária, por *Candida albicans*; podendo também, em raras circunstâncias, evoluírem com o desenvolvimento de carcinomas sobre as lesões crônicas e cicatriciais (Shklar e Mccarthy⁴⁴).

3.4.9 Diagnóstico diferencial das lesões orais do LE:

Devido à diversidade clínica das lesões orais do LE dificuldades para se firmar um diagnóstico preciso são comuns. Em particular, lesões orais do LE podem ser de difícil distinção clínica com líquen plano, lesões traumáticas, leucoplasia, eritema polimorfo e pênfigo vulgar (Hershfus⁸; Hughes et al.⁹; Plotnick e Burnham⁴⁵; Schiødt²⁷ em 1984; Urman et al.⁴², 1978).

As lesões por LE podem ainda assemelhar-se a lesões promovidas pela infecção por *Candida sp*, e às vezes candidose está associada, sendo considerada infecção secundária (Jensen et al.⁴⁶, 1999; Orteu et al.¹⁰).

3.5 Histopatologia das lesões orais do LE:

A maioria dos autores que estudam as lesões orais do LE relatam que ao exame histopatológico (HE) estas mostram como principais características a hiperqueratose, hiperplasia epitelial alternada com áreas de atrofia e degeneração vacuolar da camada basal. Em alguns casos, área de ulceração recoberta por exsudato fibrinoso se faz presente. Em região subepitelial, há infiltrado linfocítico que pode ser focal, intersticial ou perivascular. Na profundidade, infiltrado inflamatório mononuclear é detectado em região perivascular. A coloração pelo PAS (ácido periódico de Schiff), mostra espessamento da membrana basal o que completa o quadro da doença (Hershfus⁸; Jungell et al.⁴¹, 1984; Orteu et al.¹⁰; Schiødt²⁷ em 1984).

Nas lesões bolhosas o aspecto histopatológico das lesões orais do LE mostra vesículas subepiteliais com separação da junção lâmina própria e epitélio. Leucócitos polimorfonucleares predominam no conjuntivo e na zona da membrana basal. Nos casos em que há a presença de microabscessos, a histologia é similar à dermatite hepertiforme (Jorizzo et al.⁴⁷; Plemons et al.⁴⁸, 1999; Orteu et al.¹⁰).

3.6 Imunofluorescência das lesões orais do LE:

Burnham et al.⁴⁹, em 1963, utilizam imunofluorescência direta para demonstrar complexo antígeno-anticorpos (IgG e algumas vezes IgM, IgA e complemento) presente na junção dermo-epidérmica de lesões de pele. Em 1969, Burnham e Fine⁵⁰, determinam o termo teste de banda lúpica. Esse teste refere-se à detecção da deposição de IgG, IgM, IgA e componentes do complemento ao longo da junção dermo-epidérmica na pele lesada e não lesada no LE. A deposição exibe padrões granulares, lineares, homogêneos e fibrilares em biópsias de LE submetidos ao teste de imunofluorescência direta (Al-Suwaid et al.⁵¹; Burnham et al.⁴⁹; Burnham e Fine⁵⁰; Crowson e Magro⁷; Sugai et al.⁵²).

O teste de banda lúpica é positivo em 100% das lesões orais do LES, em 71% na mucosa não lesada, em 73% nos casos de lesão discóide, e somente 4% nas lesões de líquen plano e 3% das leucoplasias (Jungell et al.⁴¹; Schiødt et al.⁵³, em 1981).

A Imunofluorescência direta é de grande valia no diagnóstico diferencial de lesões orais, mostrando bandas homogêneas ou granulares de IgM, IgG, IgA, C3 e fibrinogênio na zona da membrana basal das áreas com e sem lesão (Orteu et al.¹⁰).

3.7 Imuno-histoquímica das lesões orais do LE:

Diversos autores, com o intuito de compreender aspectos específicos do LE na pele e na mucosa oral, estudaram por meio da imuno-histoquímica, as alterações observadas morfológicamente no epitélio e no tecido conjuntivo da lâmina própria, bem como do infiltrado inflamatório (de Jong et al.⁵⁴; Tebbe et al.⁵⁵).

3.7.1 Maturação, proliferação epitelial e apoptose:

A maturação dos queratinócitos da pele ocorre de forma ordenada, migrando da camada basal para as camadas mais externas do epitélio, durante esta migração ocorrem mudanças na síntese de citoqueratinas (Fuchs e Green⁵⁶; Quinlan et al.⁵⁷). Doenças inflamatórias e proliferativas da pele podem provocar mudanças nos perfis de expressão das citoqueratinas; no caso de manifestações cutâneas do LE, foram relacionadas alterações do perfil destes filamentos com possíveis influências da resposta inflamatória e destruição da camada basal (de Berker et al.⁵⁸; Ichikawa et al.⁵⁹).

Além das alterações da maturação epitelial, é comum em lesões cutâneas do LE a presença de hiperqueratose e atrofia, reflexo dos processos normais de proliferação e diferenciação epitelial (de Jong et al.⁵⁴). Essas alterações são avaliadas por meio da expressão de diversas proteínas

relacionadas ao ciclo celular, como por exemplo o ki-67 – (proteína expressa durante as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular) (Yu e Filipe⁶⁰).

Além dos aspectos da maturação epitelial, o LE tem relação íntima com mecanismos de apoptose. Dentre estes mecanismos, a via do Fas, uma glicoproteína transmembrânica, pertence à família do TNF, expressada por grande variedade de células, incluindo queratinócitos das camadas basal e granulosa tem despertado a atenção de diversos pesquisadores. (Vaishnav et al.⁶¹).

3.7.2 Resposta Inflamatória:

O infiltrado inflamatório tem sido estudado por diversos autores nos subtipos do LE, relacionando as alterações epiteliais com o grau da resposta inflamatória presente nas lesões (de Jong et al.⁵⁴). Nas lesões cutâneas diversos autores abordam a qualidade dos componentes inflamatórios, com a predominância dos linfócitos T (de Jong et al.⁵⁴; Kuhn et al.¹⁹; Sanchez et al.⁶²), principalmente os CD4-positivos, que são os mais encontrados, provavelmente contribuindo para a fisiopatologia da doença (Anand et al.⁶³; Kohchiyama⁶⁴).

São escassos os estudos que enfocam tais detalhes nas manifestações cutâneas e mucosas (orais) do LE (Burge³⁹; Johnson et al.⁴⁰; Schiødt²⁷, 1984).

Nosso trabalho visa estudar de forma integrada, os aspectos clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos nas manifestações orais do LE, visando uma melhor compreensão das mesmas e angariando informações que possam auxiliar na classificação e inter-relação dos variadas facetas da doença.

4. MÉTODOS

4. Métodos:

4.1 Análise da casuística:

A análise dos casos de LE dos ambulatórios de Colagenoses e Estomatologia foi mista, compreendendo estudo retrospectivo de casos pertencentes aos ambulatórios e análise prospectiva de novos doentes no período de 2004 a 2006.

Quarenta e seis (46) doentes com diagnóstico confirmado de lúpus eritematoso e que apresentavam lesões orais foram detectados dentre os examinados nesses ambulatórios. Dados clínico-demográficos - sexo, raça, idade, localização, apresentação clínica das lesões orais do LE foram incluídos na análise. Esses dados foram tabulados para posterior correlação com os achados histopatológicos das lesões biopsiadas. As lesões orais encontradas foram registradas fotograficamente por meio de câmera digital. Resumo do protocolo de exame encontra-se no Anexo 3.

4.2 Aprovação do comitê de ética:

O projeto foi submetido para análise do Comitê de Ética, tendo sido aprovado. A carta de aprovação encontra-se em anexo.

4.3 Classificação das lesões orais:

As lesões orais foram classificadas clinicamente de acordo com seu aspecto, que foi fotografado em cada caso. Em nosso protocolo de exames dividimos as lesões segundo seu aspecto clínico-morfológico em: lesão discóide, lesão verrucosa, púrpura, lesões bolhosas, lesões hipercrômicas e cicatriciais.

4.4 Análise dos aspectos histopatológicos:

Lesões orais dos quarenta e seis doentes incluídos no estudo foram biopsiadas e submetidas ao exame histopatológico de rotina. As biópsias realizadas para confirmação e documentação do diagnóstico de LE foram analisadas morfológicamente à microscopia óptica. Os espécimes foram processados histologicamente, embebidos em parafina e, posteriormente, cortes de 5 μ m foram preparados em lâminas de vidro e corados em hematoxilina/eosina (HE) e PAS para análise histológica dos espécimes.

4.5 Análise imuno-histoquímica:

Análise imuno-histoquímica

Fragmentos de 3 μ m foram seccionados em cortes semi-seriados para a realização da técnica imuno-histoquímica da estreptavidina-biotina peroxidase, cujo protocolo é descrito a seguir:

Protocolo:

Os cortes de 3 μ m foram desparafinizados em banho de xilol a 60°C por 30 minutos e dois banhos de xilol a temperatura ambiente por 7 minutos cada. Em seguida os espécimes foram re-hidratados por meio de banhos em cadeia descendente de etanol 100% e 95%, respectivamente, e por fim foram imersos em solução de hidróxido de amônio 10% com álcool 95% por 10 minutos, para a remoção dos pigmentos formólicos.

Após lavagem em água corrente, os cortes foram mergulhados em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena tecidual.

Após nova lavagem em água corrente, procedeu-se a recuperação dos epítomos antigênicos e a posterior incubação com o soro primário diluído em solução de 1% BSA (Sigma) em Tris HCl pH 7,4. As informações específicas

sobre a recuperação antigênica e sobre cada anticorpo utilizado estão descritas na Tabela 4.1.

Após essa etapa, os cortes foram imersos em duas soluções de Tris HCl pH 7,4, por 5 minutos cada, e depois incubados com os reagentes para revelação da reação imuno-histoquímica, também descritos na Tabela 4.1. Segue-se então a imersão dos cortes em duas soluções de Tris HCl pH 7,4.

Para a reação de revelação final da reação, os espécimes foram incubados por 3 minutos em solução contendo o agente cromogênico 3'3 diaminobenzidina – DAB (Sigma) na concentração de 60 mg em 100 ml de Tris-HCl pH 7,4, ativada por 100 µl de peróxido de hidrogênio 0,3%.

Os cortes foram posteriormente lavados em água corrente e água destilada e contra-corados com hematoxilina de Carazzi por 2 minutos.

Em seguida, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis, diafinizados em três banhos de xilol e montados com resina permount para o exame ao microscópio óptico.

Em todas as reações, foram realizados controles negativos, utilizando soro não reagente no lugar do anticorpo primário, durante a etapa de incubação dos espécimes.

Tabela 1: Anticorpos e detalhes sobre o protocolo utilizado

Soro primário	Clone	Procedência	Recuperação antigênica	Título	Kit de revelação
CK14	LL002	NeoMakers	MW 10min em tampão citrato	1:50	LSAB
CK16	LL025	NeoMakers	MW 10min em tampão citrato	1:50	LSAB
CK13	1C7+2D7	NeoMakers	MW 10min em tampão citrato	1:50	LSAB
p-53	DO-7	Dako Cytomation	MW 15min em tampão citrato	1:25	LSAB
Ki-67	MIB-1	Dako Cytomation	MW 15min em tampão citrato	1:25	LSAB
E-caderina	NCH-38	Dako Cytomation	Steamer 60min em tampão citrato	1:10	En Vision
CD1A	sc-5265	Santa Cruz Biotech	MW 10min em tampão citrato	1:40	En Vision
CD20	L26	Dako Cytomation	MW 18min em tampão citrato	1:50	En Vision
CD3	F7.2.38	Dako Cytomation	MW 10min em tampão citrato	1:50	En Vision
CD8	C8/144B	Dako Cytomation	MW 10min em tampão citrato	1:50	En Vision
CD68	KP1	Dako Cytomation	MW 10min em tampão citrato	1:50	En Vision
CD4	MT310	Dako Cytomation	MW 10min em tampão citrato	1:20	En Vision
CK5/6	D5/16B4	Dako Cytomation	Panela de pressão 3 min	1:25	LSAB
CK10	DE-K10	Dako Cytomation	Panela de pressão 3 min	1:50	LSAB
Fas	DX2	Dako Cytomation	MW 15min em tampão citrato	1:50	En Vision
Colágeno IV	CIV 22	Dako Cytomation	Pepsina 1% a 37°C	1:100	LSAB
Fibronectina	A 0245	Dako Cytomation	Pepsina 1% a 37°C	1:500	LSAB
Laminina	4C7	Dako Cytomation	Pepsina 1% a 37°C	1:50	LSAB

CK14 – citoqueratina 14; CK16- citoqueratina 16; CK13 -citoqueratina 13; CK5/6- citoqueratina 5/6; CK10- citoqueratina 10; MW- micro-ondas.

LSAB – DAKO LSAB®+Kit, Peroxidase K0690;

CSA – DAKO Catalysed Signal Amplification (CSA) System, Peroxidase K1500;

En Vision – DAKO EnVision+™, Peroxidase, Mouse K4001.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Foram detectadas lesões orais em 46 doentes de um total de 298 com diagnóstico confirmado lúpus eritematoso em acompanhamento nos ambulatórios de Colagenoses e de Estomatologia do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP, no período compreendido entre agosto de 2004 a setembro de 2006 (15,43% dos doentes acometidos).

A avaliação incluiu o exame da mucosa oral no momento do exame, e os doentes foram classificados com relação ao sexo masculino ou feminino, raça (branco, negro, mulato e asiática), localização da lesão e características clínicas. Os detalhes do exame clínico de cada caso estão na Tabela 8.2 (anexos).

Trinta e quatro (34) doentes do sexo feminino e 12 do sexo masculino apresentavam lesões clinicamente caracterizadas como lesões orais específicas de LE.

As áreas de ocorrência das lesões orais de LE foram:

1. Lesões discóides (placas irregulares eritemato-queratósicas com centro atrófico e/ou ulcerado e borda queratósica em padrão radiado) Região da mucosa jugal (13 doentes), lábios (18 doentes), palato duro (3 doentes e língua e assoalho da boca (1 doente); acometimento da mucosa jugal associadas a lesões no palato duro (2 doentes), mucosa jugal e lábios (3 doentes) e lábio e palato duro (1 doente).

2. Lesões cicatriciais e hipercrômicas: 1 doente com lesão no palato; 5 doentes com lesão nos lábios e 2 (dois) na mucosa jugal.

3. Lesões purpúricas: 7 doentes com lesões no palato duro.

4. Lesões bolhosas: 5 doentes com lesões na mucosa jugal.

Gráfico 1: Localização das lesões discóides

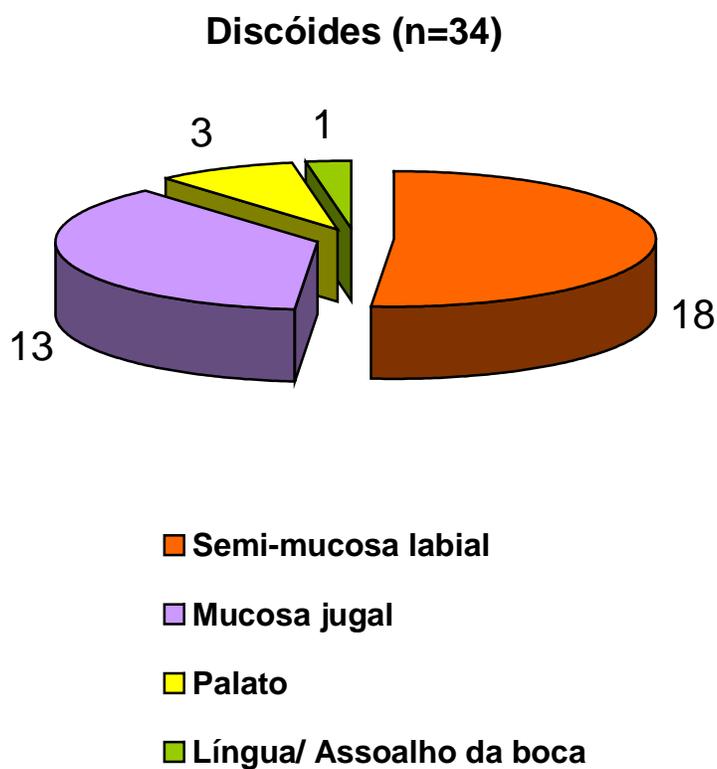
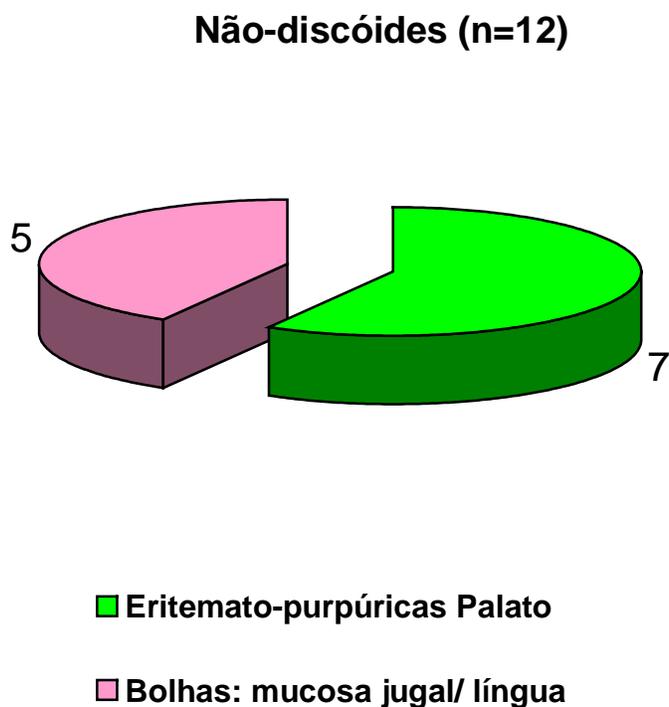


Gráfico 2: Localização das lesões não-discóides

Aspectos Histopatológicos das lesões orais de LE

Os aspectos histopatológicos das lesões biopsiadas foram estudados qualitativamente, e em uma análise global, mostram mucosite liquenóide acompanhada de infiltrado superficial e profundo associado a infiltrado perivascular. O epitélio mostrou áreas de acantose e áreas de atrofia, por vezes com padrão alternado. Em alguns casos, hiperplasia pseudo-

epiteliomatosa foi observada. Espongiose foi freqüente na maioria dos casos. Três espécimes analisados mostraram atipia epitelial em áreas focais. Degeneração hidrópica da camada basal acompanhada de corpos colóides estavam presentes focalmente ou de forma mais generalizada. Apenas 2 casos não apresentaram revestimento epitelial (lúpus bolhoso, sendo evidenciado apenas um intenso infiltrado neutrofílico). Em muitos casos foi observada área focal de ulceração. Na lâmina própria, infiltrado inflamatório liquenóide linfomononuclear foi visto em intensidades variáveis e, infiltrado superficial, profundo e perivascular também foi observado. A coloração histoquímica pelo PAS mostrou espessamento da membrana basal epitelial e vascular. O espessamento da membrana basal epitelial foi observado em padrões variáveis – contínuo e focal.

Trinta casos apresentaram depósitos de IgM na zona da membrana basal, evidenciados pela técnica da imunofluorescência direta, encontrou-se também fluorescência para IgG (12 casos), IgA (10 casos) e C3 (14 casos), ou ainda corpos citóides intercelulares. A disposição destes depósitos variou com bandas granulosas ou homogêneas, de padrão intenso ou moderado, contínuo ou descontínuo (Tabela 7.1 - anexos).

Figura 1- Aspectos clínicos das lesões lúpicas labiais

Figura 1.A- Lesão discóide no lábio inferior.

Figura 1.B- Lesão discóide no lábio inferior.

Figura 1.C- Lesão discóide no lábio superior e inferior. Notar no lábio superior, a perda do limite entre o vermelhão e a pele.

Figura 1.D- Lesão discóide no lábio superior.

Figura 1.E- Lesão discóide nos lábios.

Figura 1.F- Lesão cicatricial residual no lábio superior.

Figura 2- Aspectos clínicos

Figura 2.A- Lesão discóide linear na mucosa jugal.

Figura 2.B- Lesão discóide ulcerada na mucosa jugal. Notar a disposição radiada da lesão branca.

Figura 2.C- Lesão eritematosa com radiações queratósicas.

Figura 2.D- Lesão leucoqueratósica na mucosa jugal.

Figura 2.E- Lesão verrucosa na mucosa jugal.

Figura 2.F- Lesão leucoqueratósica pigmentada na mucosa jugal.

Figura 3- Aspectos clínicos das lesões lúpicas orais

3.A e 3.B- Lesões discóides erosivas na região sublingual.

3.C-3.F-Lesões bolhosas na mucosa jugal, mucosa labial, língua e palato, respectivamente.

Figura 4- Aspectos clínicos das lesões lúpicas orais

Figura 4.A – 4E Diferentes aspectos de lesões eritemato-purpúricas no palato duro .

Figura 4.F- Lesão eritemato-escamosa exulcerada exuberante em região de palato duro (lesão em favo de mel) (aspecto típico de lesão discóide) (Urman et al.⁴²).

Figura 5- Aspectos histopatológicos das lesões lúpicas orais

Figura 5.A- Lesão oral mostrando hiperqueratose, áreas de acantose e atrofia epitelial. Infiltrado inflamatório subepitelial (HE).

Figura 5.B- Fragmento de mucosa com hiperqueratose, acantose e infiltrado inflamatório subepitelial (liquenóide) (HE, magnificação original X150).

Figura 5.C- Hiperqueratose e hipergranulose (HE, magnificação original X400).

Figura 5.D e 5E- Atipia celular e alterações arquiteturais do epitélio de lesão lúpica oral (HE, magnificação original X250).

Figura 5.F- Infiltrado inflamatório perivascular (HE, magnificação original X150).

Figura 5.G- Espessamento da membrana basal (PAS, magnificação original X250).

Figura 5.H- Presença de banda lúpica (IgG) (Imunofluorescência).

Resultados da análise imuno-histoquímica
das de lesões lúpicas orais

Marcadores epiteliais:

Positividade para CK 14 foi observada em todas as camadas do epitélio; presença da CK 5/6 nas camadas basal e supra-basais do epitélio. Em alguns casos a expressão de CK5/6 foi variável, estando presente ora na camada basal, ora nas camadas mais superiores do revestimento epitelial. A CK 10 foi detectada em todas as camadas epiteliais com exceção das camadas basal e granulosa (quando presente). A CK16 marcou todo o epitélio com exceção da camada basal. Não houve nenhuma marcação da CK13 nos casos estudados.

Caderina-E, principal molécula de adesão intercelular dos queratinócitos foi detectada nos espaços intercelulares dos queratinócitos, sendo fortemente positiva nas camadas inferiores do revestimento epitelial e mais fraca nas camadas superiores do epitélio. Esse padrão foi confirmado nos espécimes de pele normal utilizados como controle.

Os aspectos imuno-histoquímicos do revestimento epitelial estão ilustrados na Figura 6.

Figura 6- Aspectos imuno-histoquímicos de marcadores do revestimento epitelial em lesões lúpicas orais

Figura 6.A- E-caderina – presença dessa proteína nos contatos intercelulares das células epiteliais (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X400).

Figura 6.B- Presença da CK10 nas camadas superiores do revestimento epitelial (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X250)

Figura 6.C- Expressão de CK14 em todas as camadas epiteliais (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X250)

Figura 6.D- Marcação da camada basal e estratificada obtida pela CK 5/6 (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X400)

Figura 6.E e 6.F- Imuno-expressão da CK16 em todas as camadas epiteliais com exceção da camada basal (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X250 e X400, respectivamente).

Resposta inflamatória

A população de células T foi acessada por meio dos anticorpos anti CD3, CD4 e CD8. Células positivas para esses marcadores foram encontradas no infiltrado inflamatório das lesões lúpicas, sendo os linfócitos T CD3 e CD4 positivos mais abundantes, seguidos dos linfócitos T CD8 positivos.

A população de linfócitos B foi acessada por meio do anticorpo anti-CD20, e células positivas para essa proteína foram encontradas em menor quantidade que as células T, sendo detectadas principalmente no infiltrado inflamatório da lâmina própria superficial (em região sub-epitelial).

Macrófagos CD68 positivos foram detectados esparsamente no infiltrado inflamatório das lesões lúpicas e células de Langerhans CD1A positivas não foram detectadas em nossa amostra.

Os resultados acima descritos estão ilustrados na Figura 7.

Figura 7- Resposta inflamatória nas lesões lúpicas da cavidade oral

Figura 7.A e B- Presença abundante de células T CD3 positivas no infiltrado inflamatório em faixa liquenóide (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X150 e X400, respectivamente).

Figura 7.C e D- Presença de células T CD4 positivas difusamente distribuídas no infiltrado inflamatório das lesões lúpicas (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X150 e X250, respectivamente).

Figura 7.E- Linfócitos CD8 positivos dispersos difusamente no infiltrado inflamatório de lesão lúpica oral (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X40).

Figura 7.F- Macrófagos CD68 positivos permeando a população de células linfocitárias (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X250).

Figura 7.G e H- Linfócitos B CD20 positivos dispostos em posição subepiteial (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X250 e X400).

Marcadores da proliferação e apoptose

Presença esparsa de células em fase proliferativa nas camadas basal e supra-basal marcadas pelo ki-67 e, em alguns casos presença freqüente de núcleos celulares positivos para o p-53 foram detectadas.

Células Fas-positivas foram encontradas esparsamente no revestimento epitelial (queratinócitos) e com maior freqüência na população de células inflamatórias da lâmina própria. Esses aspectos estão ilustrados na Figura 8.

Figura 8- Marcadores da proliferação e apoptose em lesões lúpicas da mucosa oral

Figura 8.A e 8.B- Queratinócitos com núcleos ki-67 positivos esparsamente distribuídos pelas camadas basal e supra-basal do revestimento epitelial (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X150 e X400, respectivamente).

Figura 8.C- Presença de células p-53 positivas na camada basal do epitélio de revestimento (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X600).

Figura 8.D- Presença de células apoptóticas esparsas no epitélio e difusamente distribuídas de permeio ao infiltrado inflamatório da lâmina própria, marcadas pelo anticorpo anti-Fas (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X250).

Proteínas da matriz extracelular

Nossos resultados mostraram intensa deposição de colágeno IV na área de membrana basal do revestimento epitelial, vasos e nervos. A presença de fibronectina foi detectada difusamente por todo o tecido conjuntivo da lâmina própria, concentrando-se mais fortemente em faixa sub-epitelial.

A laminina não foi detectada em nossos casos, estando fracamente positiva em casos-controle de lesões lúpicas de pele.

Os resultados da expressão das proteínas da matriz extracelular estão ilustrados na Figura 9.

Figura 9- Imuno-expressão das proteínas da matriz extracelular em lesões lúpicas da mucosa oral

Figura 9.A-D- Intensa positividade/deposição de colágeno IV evidenciando espessamento da membrana basal epitelial (A e B), vasos e filete nervoso na profundidade da lâmina própria (C e D) (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X40, X250, X250 e X400, respectivamente).

Figura 9.E- Presença difusa da fibronectina no tecido conjuntivo da lâmina própria e mais fortemente marcada em faixa sub-epitelial (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X150).

Figura 9.F- Fraca positividade para laminina em espécime de lesão lúpica de pele (controle) (streptavidina-biotina peroxidase, magnificação original X150).

6. DISCUSSÃO

6. Discussão:

É de comum acordo entre vários autores que o lúpus eritematoso é uma doença auto-imune, que afeta o tecido conjuntivo. As lesões cutâneas geralmente se desenvolvem em áreas foto-expostas, podendo acometer a face, tórax, membros superiores e inferiores. (Antonovych¹; Carrel et al.⁶; Cooper et al.¹³; Crowson e Magro⁷; de Rossi e Glick¹⁴; Hershfus⁸; Hughes et al.⁹; Moreira e Gama²; Orteu et al.¹⁰; Rhodus e Johnson¹¹; Wallace³⁴).

O LE apresenta predileção pelo sexo feminino, as mulheres são afetadas oito vezes mais que os homens na forma sistêmica da doença, e na forma cutânea as mulheres são três vezes mais afetadas que o homem (Carrel et al.⁶; Cooper et al.¹³; Rhodus e Johnson¹¹; Sontheimer²⁰). Analisando os dados da nossa amostra, podemos citar a relação entre mulheres e homens com LES de 2:1, e em relação ao LEC esta proporção é de 4,5:1.

Em relação à faixa etária, o LE geralmente acomete indivíduos entre 20 a 40 anos, podendo ocorrer em crianças e em pessoas com mais de 55 anos (Hooker²⁸; Sontheimer²⁰). Observando nossa casuística, nos doentes com LES e também nos doentes com LEC predominou a faixa etária que compõe as idades de 21 a 50 anos, corroborando os dados da literatura.

As lesões cutâneas do LE apresentam-se nas formas aguda, subaguda e crônica, e as lesões intra-orais acompanham este padrão. Clinicamente as lesões orais do LE podem apresentar uma grande variabilidade de aspectos – de placas queratósicas a lesões bolhosas. Esses achados ilustram a

complexidade na avaliação clínica do lúpus oral que muitas vezes varia das lesões classicamente descritas por outros autores. As manifestações orais do LE podem apresentar uma grande diversidade clínica abrindo um leque para outras hipóteses diagnósticas que devem ser consideradas - líquen plano, leucoplasia e lesões traumáticas.

Trabalhos de diversos autores relatam que as áreas mais acometidas pelas lesões orais do LE são a mucosa jugal, região de palato duro, vermelhão dos lábios e língua (Edwards e Gayford⁴³; Hershfus⁸; Hughes et al.⁹; Johnson et al.⁴⁰; Schiødt²⁷, em 1984; Urman et al.⁴²; Wallace³⁴). As lesões encontradas na nossa amostra acometeram a região de mucosa jugal direita e esquerda, na forma discóide, sendo esta encontrada em 11 doentes da amostra (23%). Em 2 doentes (4%), além do acometimento da mucosa jugal, a região de palato duro também apresentava lesão, sendo esta de característica purpúrica, com margens imprecisas, sem sintomatologia dolorosa e sem elevação. O acometimento dos lábios ocorreu em 20 doentes (43%), sendo que estas lesões apresentavam características descamativas e cicatriciais. Em 1 doente (2%) a lesão foi observada no lábio inferior em forma de lesão eritematosa no palato e gengiva. A ocorrência na região de palato mole e duro foi observada em 8 doentes (17%), na qual a lesão era eritemato-escamosa.

No lábio, as lesões lúpicas acometem área de semi-mucosa, sendo a manifestação mais comum, as lesões discóides nos seus variados estágios de evolução (desde lesões ativas eritemato-escamosas até lesões residuais e cicatriciais). As lesões labiais do LE podem ter como diagnósticos diferenciais a

queilite actínica, a queilite angular e o carcinoma epidermóide. Nos casos em que a lesão apresenta característica bolhosa e ulcerada, o diagnóstico diferencial se dá com doenças vésculo-bolhosas (penfigóide e líquen bolhoso) e afta.

Considerando a complexidade clínica das lesões do LE, biópsia seguida de análise histopatológica e imuno-fluorescência direta é fundamental para a elucidação diagnóstica. Nossa análise clínica e histopatológica das lesões lúpicas da cavidade oral e lábios mostrou que essas são essencialmente lesões do tipo discóide. A análise histopatológica mostrou uma reação liquenóide de interface com o epitélio de revestimento, acompanhada de infiltrado inflamatório profundo e perivascular, associado a alterações epiteliais que se concentravam principalmente nas camadas basal e para-basal como hiperproliferação e apoptose, reproduzindo o que já foi descrito por outros pesquisadores (Schjødt²⁷, em 1984; Karjalainen e Tomich⁶⁵). Os achados histopatológicos mais comuns em nossos espécimes foram a hiperqueratose, atrofia das projeções epiteliais, infiltrado inflamatório de interface associado ao infiltrado inflamatório profundo, edema da lâmina própria e espessamento da membrana basal, estando estes de acordo com os critérios histopatológicos propostos por Schjødt²⁷, em 1984; e Karjalainen e Tomich⁶⁵.

Todos os 46 casos biopsiados foram submetidos à imuno-histoquímica para se analisar a integridade epitelial, sua maturação e suas alterações proliferativas/apoptose, a resposta inflamatória e a resposta da matriz extracelular frente às alterações inflamatórias do lúpus eritematoso. Em nossa

revisão da literatura, observamos que a análise das lesões lúpicas na cavidade oral se restringe, em sua grande maioria, a estudos clínicos e morfológicos e que a análise de aspectos específicos das alterações epiteliais, inflamatórias e do tecido conjuntivo é escassa. Isto ocorre devido à escassez de casos que apresentem lesões orais que não são regra na apresentação clínica do lúpus eritematoso.

Os resultados imuno-histoquímicos mostraram que na mucosa afetada por lesões lúpicas discóides há importante alteração da maturação epitelial evidenciada por alterações na expressão das citoqueratinas e alterações na deposição de colágeno que causa um marcante espessamento das membranas basais do epitélio, vasos e nervos. As alterações na maturação das células epiteliais são ainda acompanhadas de alterações proliferativas com o aumento de células Ki-67 e p-53 positivas e também com o aumento de células apoptóticas no epitélio de revestimento observadas em nosso trabalho e em relatos publicados na literatura inglesa mostrando o aumento de células positivas para o p-53, ki-67 e PCNA em lesões lúpicas da pele (Pablos et al.⁶⁶). As alterações de maturação, proliferação e apoptose do epitélio de revestimento têm sido parcialmente relacionadas com a ação da radiação ultravioleta, e, em particular o fenômeno de apoptose parece estar associado a uma fonte potencial de auto-antígenos fragmentados que exacerba fenômenos de auto-imunidade, embora esses mecanismos não expliquem completamente as lesões intra-orais, uma vez que esta região não está exposta à radiação UV (Pablos et al.⁶⁶; Golan et al.⁶⁷; Furukawa et al.⁶⁸). Esse fenômeno também é

descrito por outros autores que relataram um estado hiperproliferativo na epiderme em lesões de lúpus eritematoso discóide, evidenciado pela timidina tritiada e confirmado pelo aumento da expressão do Ki-67 (de Jong et al.⁵⁴). A expressão da CK14, (normalmente presente apenas na camada basal), também nos outros compartimentos do revestimento epitelial confirma esse padrão hiperproliferativo dos queratinócitos de áreas afetadas pelas lesões lúpicas. Esse comportamento das células epiteliais pode ser resultado de resposta a citocinas provenientes das células inflamatórias da lâmina própria por um mecanismo de reparo na tentativa de restaurar o dano inflamatório à camada basal. Essa reação parece, em último estado, ser pouco efetiva, culminando com uma mucosa atrófica em lesões antigas ou já cicatrizadas.

Com relação a apoptose, essa é dependente de interações entre moléculas efetoras e supressoras, e uma das moléculas-chave nesse equilíbrio é o Fas, que traduz respostas apoptóticas via cadeia de caspase. O sistema Fas está envolvido na apoptose dos linfócitos T e regulação da resposta imune, bem como na apoptose de queratinócitos. Em nosso trabalho, foi possível detectar a apoptose tanto na população de células inflamatórias quanto na de queratinócitos principalmente na camada basal do revestimento epitelial. A expressão do Fas tem sido explorada em uma gama de doenças inflamatórias, dentre elas, o líquen plano, que, histologicamente exibe a arquitetura de um processo inflamatório de interface entre a lâmina própria e o revestimento epitelial similar ao LE. Neste sentido, imitando o LE, segundo o estudo de Neppelberg et al.⁶⁹, a expressão do Fas no líquen plano é observada

uniformemente no infiltrado inflamatório e de forma concentrada na camada basal do revestimento epitelial. Em nossa experiência, esse padrão se repete nas lesões discóides orais do lúpus eritematoso e tal padrão parece se correlacionar aos fenômenos de alteração da proliferação e maturação epitelial, e aos fenômenos inflamatórios do tecido conjuntivo. Esse padrão é também relatado em outros trabalhos, embora o exato fator estimulante da apoptose e suas reais implicações na patogênese da doença ainda sejam fenômenos a ser esclarecidos (Baima e Stichering⁷⁰; Nakajima et al.⁷¹).

Os marcadores da inflamação evidenciados em nossas biópsias estão de acordo com a informação disponível na literatura, onde se observa o envolvimento de uma população mista de linfócitos composta de células T e B, onde os linfócitos T CD4 positivos foram mais freqüentes que os linfócitos T CD8 positivos (Converso et al.⁷²). Alguns trabalhos consultados mostram uma escassa presença de células de Langerhans, mas essas, em nossa casuística não foram detectadas (Scheinecker et al.⁷³). O lúpus eritematoso é uma doença auto-imune caracterizada por uma hiperatividade de linfócitos B e resposta defectiva de linfócitos T, incluindo produção de interleucina-2 e proliferação celular. Esses fenômenos parecem resultar de alterações na apresentação de antígenos que alimentam uma resposta auto-imune (Scheinecker et al.⁷³; Anand et al.⁶³). Esses dados derivam de estudos que parecem tratar principalmente dos fenômenos presentes nas formas sistêmicas do lúpus eritematoso. Nossos resultados contribuem com importantes dados que mostram que o processo

inflamatório das lesões lúpicas é similar seja em lesões sistêmicas ou lesões cutâneas/orais.

Estes achados contribuem para uma melhor compreensão do processo patológico do LE assim como o envolvimento da mucosa oral.

O nosso estudo sobre lesões orais do lúpus eritematoso, tema pouco abordado na literatura, analisou as características clínicas, bem como sua localização, ressaltando a variedade e complexidade das lesões; o padrão histológico e a imuno-histoquímica, acumulando dados que podem ajudar num melhor conhecimento da apresentação da doença e melhor entendimento da sua patogenia; oferecendo assim, dados para futuros estudos que venham buscar novas informações sobre o seu mecanismo de ação e uma maior precisão do seu diagnóstico diferencial com outras entidades patológicas.

7. CONCLUSÕES

7. Conclusões:

7.1

7.1 A análise da casuística clínica das manifestações orais do lúpus eritematoso (LE) dos doentes dos ambulatórios de Colagenoses e de Estomatologia da Divisão de Dermatologia do HCFMUSP mostrou que há predominância das lesões no sexo feminino.

7.2 As características clínicas das lesões orais do LE encontradas na amostra variaram, sendo lesões discóides as mais prevalentes. Lesões purpúricas localizadas no palato duro relacionaram-se ao diagnóstico de lúpus sistêmico.

7.3 A análise dos aspectos histopatológicos das diversas apresentações clínicas orais do lúpus eritematoso revelou que em sua maioria, as lesões apresentam-se como mucosite liquenóide associada a infiltrado perivascular. Critérios histopatológicos adicionais puderam ser valorizados na análise de biópsias de lesões cuja hipótese clínica favoreceu o diagnóstico de LE. Desta forma, salientamos que dados clínico-patológicos e de IFD foram fundamentais para a diagnose destes casos.

7.4 Por meio da técnica de imuno-histoquímica, concluímos:

7.4.1 A análise da maturação e proliferação epitelial mostrou claramente que o epitélio de revestimento da mucosa encontrou-se em estado hiperproliferativo revelado por seu perfil de expressão de citoqueratinas e correlação com os dados morfológicos na análise dos espécimes corados pela técnica histoquímica de hematoxilina/eosina. Este estado epitelial pode ser

reflexo de citocinas liberadas pelas células do infiltrado inflamatório ou uma possível tentativa de reparo em resposta ao dano da camada basal. A diferenciação precoce não foi afetada nos espécimes analisados. A apoptose encontrou-se aumentada no epitélio e no infiltrado inflamatório da lâmina própria, revelada pela presença de Fas/FasL. Estes fatores possivelmente representaram um dos mecanismos na patogênese das lesões orais do LE.

7.4.2 A análise das proteínas da membrana basal revelou que houve espessamento difuso da MB do epitélio e vasos sanguíneos de lâmina própria, principalmente determinado pelo depósito de colágeno IV.

7.4.3 A análise dos componentes do infiltrado inflamatório confirmou o predomínio de linfócitos T CD4 (+), e não diferiu de dados publicados por outros autores que estudam a resposta inflamatória no LE em lesões cutâneas.

8. ANEXOS

8. Anexos

Tabela 2: Imuno-fluorescência Direta

	Resultados da imuno-fluorescência Direta
Caso 1	Presença de fluorescência granulosa, contínua e moderada na ZMB anti-IgM e anti-IgA.
Caso 2	Presença de corpos ovóides fluorescentes anti-IgM.
Caso 3	x
Caso 4	Presença de fluorescência granulosa, contínua e moderada na ZMB anti-IgM e anti-IgA.
Caso 5	x
Caso 6	Presença de fluorescência homogênea, intensa e contínua na ZMB anti-IgM.
Caso 7	Presença de fluorescência granulosa, contínua e moderada na ZMB anti-IgM.
Caso 8	Presença de fluorescência granulosa, contínua e moderada na ZMB anti-IgM e anti-IgA.
Caso 9	Presença de fluorescência granulosa e contínua na ZMB anti-IgM
Caso 10	x
Caso 11	Presença de fluorescência granulosa, contínua, espessa e intensa na ZMB anti-IgM e fluorescência homogênea e contínua anti-C3.
Caso 12	Presença de fluorescência homogênea, intensa e contínua na ZMB anti-IgM e homogênea, contínua e moderada anti-IgG, Anti-IgA e anti-C3.
Caso 13	Presença de fluorescência homogênea, intensa e contínua na ZMB anti-IgG, anti-IgM e anti-C3.
Caso 14	x

Caso 15	x
Caso 16	Presença de fluorescência focal, granulosa, discreta na ZMB anti-IgA, anti-IgM e anti-IgG.
Caso 17	x
Caso 18	Presença de fluorescência granulosa, descontínua e moderada na ZMB anti-IgM, anti-IgA e anti-C3.
Caso 19	Presença de fluorescência granulosa, discreta e contínua na ZMB anti-IgM.
Caso 20	Presença de fluorescência linear, contínua e intensa na ZMB anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA e anti-C3.
Caso 21	Presença de fluorescência granulosa, contínua e moderada na ZMB anti-IgG.
Caso 22	Presença de fluorescência homogênea, intensa e contínua na ZMB anti-IgM, anti-IgA e anti-C3.
Caso 23	Presença de corpos citóides fluorescentes anti-IgM fluorescência homogênea, focal e moderada na ZMB anti-IgG.
Caso 24	Presença de fluorescência granulosa, discreta e contínua na ZMB anti-IgM e anti-C3.
Caso 25	Presença de fluorescência granulosa, contínua e moderada na ZMB anti-IgM e linear contínua anti-C3.
Caso 26	Presença de fluorescência homogênea, intensa e contínua na ZMB anti-IgM, anti-IgG, anti-IgA e anti-C3.
Caso 27	Presença de fluorescência granulosa, discreta e contínua na ZMB anti-IgM.
Caso 28	Presença de fluorescência linear, contínua e intensa na ZMB anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA e anti-C3.
Caso 29	Presença de fluorescência granulosa, moderada e contínua na ZMB anti-IgM.
Caso 30	x
Caso 31	Presença de fluorescência granulosa, contínua e moderada na ZMB anti-IgM, anti-IgG e anti-C3.
Caso 32	Presença de fluorescência homogênea, intensa e contínua na ZMB anti-IgM, anti-IgG, anti-IgA e anti-C3.
Caso 33	Presença de fluorescência intracelular moderada para anti-IgG.
Caso 34	Presença de fluorescência granulosa, contínua e moderada na ZMB anti-IgM.

Caso 35	Presença de fluorescência granulosa, contínua e moderada na ZMB anti-IgM.
Caso 36	Presença de corpos ovóides fluorescentes na derme papilar anti-IgM.
Caso 37	Presença de fluorescência granulosa, descontínua e discreta na ZMB anti-IgM, e homogênea descontínua e moderada anti-IgG e anti-C3.
Caso 38	Ausência de fluorescência específica.
Caso 39	Presença de corpos ovóides fluorescentes na derme papilar anti-IgM.
Caso 40	Ausência de fluorescência específica.
Caso 41	Presença de fluorescência intercelular nas junções do epitélio anti-IgG e anti-C3.
Caso 42	x
Caso 43	Presença de fluorescência granulosa, intensa e contínua na ZMB anti-IgM.
Caso 44	Presença de fluorescência granulosa, moderada e contínua na ZMB anti-IgM moderada contínua anti-C3.
Caso 45	Presença de fluorescência granulosa, moderada e descontínua na ZMB anti-IgM.
Caso 46	Presença de fluorescência granulosa, moderada e contínua na ZMB anti-IgM

x- casos sem presença de fluorescência.

Tabela 3: Casos clínicos de Lúpus Eritematoso

	Sexo/ Idade	Raça	Envolvimento e extensão	Local da lesão	Aspectos clínicos da lesão oral
Caso 1	F/ 29	Branca	Cutâneo	Mucosa jugal	Lesão eritematosa com placas atróficas
Caso 2	F/ 59	Branca	Sistêmico	Lábios e mucosa jugal	Lesões descamativas nos lábios e eritematosa na mucosa jugal
Caso 3	F/ 44	Mulata	Sistêmico	Lábios	Lesões cicatriciais
Caso 4	F/ 57	Negra	Cutâneo	Lábios	Lesões descamativas
Caso 5	F/ 49	Branca	Cutâneo	Lábios	Lesões descamativas
Caso 6	F/ 20	Mulata	Cutâneo	Mucosa jugal	Enathematous lesions
Caso 7	F/ 32	Negra	Cutâneo	Palato	Placa eritematosa
Caso 8	F/ -	Branca	Cutâneo	Mucosa jugal	Lesão eritematosa
Caso 9	F/ 41	Branca	Cutâneo	Mucosa jugal e palato	Lesão enantematosa na mucosa jugal e lesão queratótica branca no palato
Caso 10	F/ 59	Mulata	Cutâneo	Palato	Mancha hiperocrômica
Caso 11	F/ 49	Branca	Cutâneo	Mucosa jugal	Lesões residuais hiperocrômicas
Caso 12	F/ 35	Branca	Cutâneo	Palato	Lesão branca
Caso 13	M/ 55	Branca	Cutâneo	Lábios	Lesões vesículo-bolhosas
Caso 14	F/ 55	Branca	Cutâneo	Palato	Lesão queratótica

Caso 15	F/ 43	Negra	Cutâneo	Palato	Lesões eritematosas
Caso 16	F/ 51	Branca	Cutâneo	Lábios	Lesões ulcerativas
Caso 17	F/ 39	Mulata	Sistêmico	Palato e gengiva	Lesões eritematosas no palato e na borda gengival
Caso 18	M/ 38	Branca	Sistêmico	Palato e mucosa jugal	Lesão purpúrica no palato e lesões eritematosas na mucosa jugal
Caso 19	F/ 49	Branca	Cutâneo	Lábios	Mancha hipercrômica
Caso 20	F/ 21	Branca	Sistêmico	Mucosa jugal	Lesão branca
Caso 21	M/ 37	Branca	Cutâneo	Mucosa jugal	Lesão arboriforme na mucosa jugal esquerda.
Caso 22	M/ 6	Mulata	Cutâneo	Lábios	Lesões descamativas
Caso 23	F/ 62	Asiática	Sistêmico	Lábios	Lesão eritemato-descamativa
Caso 24	F/ 45	Branca	Cutâneo	Lábios	Lesão cicatricial
Caso 25	F/ 46	Mulata	Sistêmico	Lábios	Lesão cicatricial
Caso 26	F/ 23	Negra	-	Lábios e palato	Lesões eritemato-descamativas nos lábios e lesão eritematosa no palato
Caso 27	F/ 25	-	-	Mucosa jugal	-
Caso 28	F/ 21	-	Sistêmico	Lábios	Lesão discóide
Caso 29	F/ 27	-	Sistêmico	Palato	Lesão eritemato-queratótica
Caso 30	M/ 37	-	Cutâneo	Palato	-
Caso 31	M/ 35	-	Cutâneo	Lábios	Lesão discóide
Caso 32	M/ 38	-	Cutâneo	Lábios	Lesão discóide

Caso 33	F/ 45	-	Cutâneo	Mucosa jugal e lábios	Lesão discóide na mucosa jugal e lábios
Caso 34	M/ 25	-	Cutâneo	Mucosa jugal	Lesões ulcerativas e queratóticas
Caso 35	F/ 47	-	Cutâneo	Palato	Lesões purpúricas
Caso 36	F/ 41	-	Cutâneo	Lábios	Lesões descamativas
Caso 37	M/ 42	-	Cutâneo	Lábios	Lesões cicatriciais
Caso 38	M/ 21	-	Cutâneo	Lábios	Lesão discóide
Caso 39	F/ 39	-	Cutâneo	Lábios	Lesão discóide
Caso 40	F/ 35	Mulata	-	Lábios e mucosa jugal	Erosão nos lábios e mucosa jugal
Caso 41	F/ 68	Branca	Cutâneo	Mucosa jugal	Lesões queratóticas
Caso 42	F/ 46	Mulata	Sistêmico	Lábios	Lesões descamativas
Caso 43	F/ 48	Branca	-	Mucosa jugal	Lesões cicatriciais
Caso 44	F/ 49	Negra	-	Mucosa jugal	-
Caso 45	M/ 26	Branca	Cutâneo	Lábios	Lesões cicatriciais e residuais
Caso 46	M/ 15	Mulata	Cutâneo	Lábios e mucosa jugal	Placa eritematosa

Aprovação do Comitê de ética

Protocolo de Exame

1- Identificação do Paciente:

Nome:

RGHC:

Idade:

Gênero: Feminino Masculino

Raça: Branca Negra Mulata Amarela

2- Classificação da doença:

LES

LED

LESA

Localização e descrição das lesões cutâneas:

Localização e descrição das lesões orais:

3- Medicação em uso:

8. REFERÊNCIAS

1. Antonovych TT. *Pathology of systemic lupus erythematosus*. Washington, DC, American Registry of Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, 1995.
2. Moreira C, Gama GG. *Reumatologia-Diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Editora Médica e Científica; 2001.
3. Louis PJ, Fernandes R. *Review of systemic lupus erythematosus*. Oral Surg Oral med Oral pathol Radiol Endod 2001;91(5):512-6.
4. Plemons JM, Gonzales TS, Burkhart NW. *Vesiculobullous diseases of the oral cavity*. Periodontology 2000 1999;21:158-75.
5. Sampaio SAS, Rivitti EA. *Dermatologia*. 2^a ed. São Paulo: Artes Médicas; 2001.
6. Carrel R, Anderson R, Jackson T, Slanek, S. *Systemic lupus erythematosus: A teenage patient*. J Clin Pediatric Dent 1990;15(1):55-9.
7. Crowson NA, Magro C. *The cutaneous pathology of lupus erythematosus: a review*. J Cut Pathol 2001; 28: 1-23.
8. Herschfus L. *Lupus erythematosus*. J Oral Med 1972;27(1):12-18.
9. Hughes CT, Downey MC, Winkley GP. *Systemic lupus erythematosus: a review for dental professionals*. J Dent Hyg 1998;72(2):35-40.
10. Orteu CH, Buchanan JAG, Hutchison I, Leigh IM, Bull RH. *Systemic lupus erythematosus presenting with oral mucosal lesions: easily missed?* Br J Dermatology 2001;144:1219-23.

11. Rhodus LN, Johnson DK. *The prevalence of oral manifestations of systemic lupus erythematosus*. Quintessence Int 1990;21(6):461-5.
12. Sontheimer RD, Provost TT. *Lupus erythematosus*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1997: 569-623.
13. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, Clair EW, Gilkeson GS. *Risk factors for development of systemic lupus erythematosus: Allergies, infections, and family history*. J Clin Epidemiol 2002;55:982-9.
14. de Rossi SS, Glick M. *Lupus erythematosus: considerations for dentistry*. JADA 1998;129(3):330-9.
15. Duarte AA. *Colagenoses e a Dermatologia*. São Paulo: Ed. do Autor; 2004.
16. Tan EM. *Pathophysiology of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus and related diseases*. Adv Dent Res 1996;10(1):44-6.
17. Hahn BH. *An overview of the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Dubois lupus erythematosus 5ed, Baltimore, Williams & Wilkins, 1997:69-76.
18. Synkowski DR, Herman SM, Provost TT. *Lupus erythematosus: laboratory testing and clinical subsets in the evaluation of patients*. Med Clin North Am. 1980; 64:921-40.
19. Kuhn A, Herrmann M, Kleber S, Beckmann-Welle M, Fehsel K, Martin-Villalba A, et al. *Accumulation of apoptotic cells in the epidermis of patients with cutaneous lupus erythematosus after ultraviolet irradiation*. Arthritis Rheum. 2006;54(3):939-50.

20. Sontheimer RD. *Lupus Erythematosus. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 6ed, volume II, New York, McGraw-Hill Companies, 2003: 1677-93.
21. Hochberg MC. *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9): 1725.
22. Freitas THP, Proença NG. *Chronic cutaneous Lupus erythematosus: study of 290 patients*. *An bras Dermatol*, Rio de Janeiro, 78(6):703-12, nov/dez 2003.
23. Kalunian KC. *Definition, classification, activity, and damage indices*. *Dubois lupus erythematosus* 5ed, Baltimore, Williams & Wilkins, 1997:19-29.
24. Oliveira SKF. *Lupus eritematoso sistêmico, dermatopoliomiosite, esclerose sistêmica e vasculites juvenis*. *Reumatologia-Diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Editora Médica e Científica; 2001.
25. Bieseker G, Lavin L, Ziskind M, Koffler D. *Cutaneous localization of membrane attack complex in discoid and systemic lupus erythematosus*. *New Engl J Med* 1982;306:264-270.
26. Esdaile JM. *A deforming arthritis in systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheumatol Dis* 1981; 40:124-6.
27. Schiødt M. *Oral manifestations of lupus erythematosus*. *Int J Oral Surg* 1984; 13:101-47.
28. Hooker RS. *Systemic lupus erythematosus*. *Phys Assist* 1988;12:71-90.

29. Wallace DJ, Metzger AL. *Systemic lupus erythematosus and the nervous system*. Dubois lupus erythematosus 5ed, Baltimore, Williams & Wilkins, 1997:723-54.
30. Kiss E, Shoenfeld Y. Are anti-ribosomal P protein antibodies relevant in systemic lupus erythematosus? *Clin Rev Allergy Immunol*. 2007;32(1):37-46.
31. Jr Quismorio FP. *Cardiac Abnormalities in Systemic Lupus Erythematosus*. Dubois lupus erythematosus 5ed, Baltimore, Williams & Wilkins, 1997:653-71.
32. Schwartz S, Esseltine D. *Post extraction hemorrhage in a Young male patient with SLE*. *Oral Surgery* 1984;57:254-7.
33. Connolly K. *Lupus erythematosus: Cutaneous medicine and surgery*. Philadelphia, WB Saunders, 1996, 260-82.
34. Wallace DJ. *Cutaneous and cutaneousvascular manifestation of systemic lupus erythematosus*. Dubois lupus erythematosus 5ed, Baltimore, Williams & Wilkins, 1997: 693-722.
35. Callen JP. *Collagen vascular diseases*. *J Am Acad Dermatol*, 2004; 51(3):427-39.
36. Chlebus E, Wolska H, Blaszczyk M, Jablonska S. *Subacute cutaneous lupus erythematosus versus systemic lupus erythematosus: diagnostic criteria and therapeutic implications*. *J Amer Acad Dermatol* 1998; 38: 405-12.

37. Tomszewki MM. *Skin manifestations of systemic lupus erythematosus*. Washington, DC, American Registry of Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, 1995, 45-57.
38. Childers ELB. *Oral manifestations of systemic lupus erythematosus*. Washington, DC, American Registry of Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, 1995; 56-72.
39. Burge SM, Frith PA, Juniper RP, Wojnarowska F. *Mucosal involvement in systemic and chronic cutaneous lupus erythematosus*. Br J Dermatol, 121 (6):727-41, 1989.
40. Johnson R, Heyden G, Westberg NG, Nyberg G. *Oral mucosal lesions in systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol 1984;11:38-42.
41. Jungell P, Malmström M, Wartiovaara J. *Light, electron and immunofluorescence microscopic features of oral lichen planus, lupus erythematosus and leukoplakia*. Proc Finn Dent Soc 1984;80:107-14.
42. Urman JD, Lowenstein MB, Abeles M, Weinstein A. *Oral mucosal ulceration in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum 1978;21:58-61.
43. Edwards MB, Gayford JJ. *Oral lupus erythematosus*. Oral Surg 1977;31:332-42.
44. Shklar G, McCarthy PL. *The oral lesions of discoid lupus erythematosus*. Arch Dermatol 1978;114:1031.

45. Plotnick H, Burnham TK. *Lichen planus and co-existing lupus erythematosus versus lichen planus-like lupus erythematosus*. J Am Acad Dermatol 1986;14:931-8.
46. Jensen JL, et al. *Oral and ocular sicca symptoms and findings are prevalent in systemic lupus erythematosus*. J Oral Pathol Med 1999;28:317-22.
47. Jorizzo, J. L, Salisbury PL, Rogers RS 3rd, Goldsmith SM, Shar GG, Callen JP. *Oral lesions in systemic lupus erythematosus. Do ulcerative lesions represent a necrotizing vasculitis?* J Am Acad Dermatol 1992;27:389-94.
48. Plemons JM, Gonzales TS, Burkhart NW. *Vesiculobullous diseases of the oral cavity*. Periodontology 2000 1999;21:158-75.
49. Burnham TK, Neblett TR, Fine G. *The application of the fluorescent antibody technic to the investigation of lupus erythematosus and various dermatoses*. J Invest Dermatol 1963; 41: 451-6.
50. Burnham TK, Fine G. *The immunofluorescent "band test" for lupus erythematosus. Morphologic variations of the band of localized immunoglobulins at the dermal-epidermal junction in lupus erythematosus*. Arch Dermatol 1969;99:413-20.
51. Al-Suwaid AR, Venkataram MN, Bhushnurmath SR. *Cutaneous lupus erythematosus: comparison of direct immunofluorescence findings with histopathology*. Int J Dermatol 1995;34:480-2.

52. Sugai SA, Gerbase AB, Cernea SS, Sotto MN, Oliveira ZNP, Villela MAC, et al. *Cutaneous lupus erythematosus: direct immunofluorescence and epidermal basal membrane study*. Int J Dermatol. 1992;31:260-4.
53. Schiødt M. *Deposits of immunoglobulins, complement, and fibrinogen in oral lupus erythematosus, lichen planus, and leukoplakia*. Oral Surg 1981;51:603-8.
54. de Jong EM, van Erp PR, Ruiter DJ, van de Kerkhof PC. *Immunohistochemical detection of proliferation and differentiation in discoid lupus erythematosus*. J Am Acad Dermatol, 25: 1032-1038, 1991.
55. Tebbe B, Mazur L, Stadler R, Orfanos CE. *Immunohistochemical analysis of chronic discoid and subacute cutaneous lupus erythematosus--relation to immunopathological mechanisms*. Br J Dermatol. 1995; 132(1):25-31.
56. Fuchs E, Green H. *Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte*. Cell. 1980 Apr;19(4):1033-42.
57. Quinlan RA, Schiller DL, Hatzfeld M, Achtstatter T, Moll R, Jorcano JL, Magin TM, Franke WW. *Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments*. Ann N Y Acad Sci. 1985;455:282-306.
58. de Berker D, Dean D, Leigh IM, Burge S. *Keratin expression in discoid lupus erythematosus*. Exp Dermatol. 1995;4(6):350-6.
59. Ichikawa E, Watanabe S, Takahashi H. *Keratin and involucrin expression in discoid lupus erythematosus and lichen planus*. Arch Dermatol Res. 1997;289(9):519-26.

60. Yu CC, Filipe MI. *Update on proliferation-associated antibodies applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue and their clinical applications.* Histochem J. 1993;25(12):843-53.
61. Vaishnaw AK, Toubi E, Ohsako S, Drappa J, Buys S, Estrada J, Sitarz A, Zemel L, Chu JL, Elkon KB. *The spectrum of apoptotic defects and clinical manifestations, including systemic lupus erythematosus, in humans with CD95 (Fas/APO-1) mutations.* *Arthritis Rheum.* 1999;42(9):1833-42.
62. Sanchez R, Jonsson R, Ahlfors E, Backman K, Czerkinsky C. *Oral lesions of lupus erythematosus patients in relation to other chronic inflammatory oral diseases: an immunologic study.* *Scand J Dent Res.* 1988;96(6):569-78.
63. Anand A, Dean GS, Quereshi K, Isenberg DA, Lydyard PM. *Characterization of CD3+ CD4- CD8- (double negative) T cells in patients with systemic lupus erythematosus: activation markers.* *Lupus* 2002, 11(8), 493-500.
64. Kohchiyama A, Oka D, Ueki H. *T-cell subsets in lesions of systemic and discoid lupus erythematosus.* *J Cutan Pathol.* 1985;12(6):493-9.
65. Karjalainen TK, Tomich CE. *A histopathologic study of oral mucosal lupus erythematosus.* *Oral Surg Oral Med Oral Pathol,* 1989; 67: 547.
66. Pablos JL, Santiago B, Galindo M, Carreira PE, Ballestin C, Gomez-Reino JJ. *Keratinocyte apoptosis and p53 expression in cutaneous lupus and dermatomyositis* *Journal of Pathology.* 1999;188; 63-68.

67. Golan TD, Elkon KB, Ghavari AE, Krueger JG. *Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after ultraviolet B/ultraviolet A irradiation*. J Clin Invest 1992;90:1067-76.
68. Furukawa F, Kashihara-Sawami M, Lyons MB, Norris DA. *Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus*. J Invest Dermatol 1990;94:77-85.
69. Neppelberg E, Johanennessen AC, Jonsson R. *Apoptosis in oral lichen planus*. European Journal of Oral Sciences, 2001; 109: 361-364.
70. Baima B, Sticherling M. *Apoptosis in different cutaneous manifestations of lupus erythematosus*. British Journal of Dermatology 2001; 144: 958-966.
71. Nakajima M, Nakajima A, Kayagaki N, Honda M, Yagita H, Okumura K. *Expression of Fas ligand and its receptor in cutaneous lupus: implication in tissue injury*. Clinical Immunology and Immunopathology, 1997; 83;3:223-229.
72. Converso M, Bertero MT, Vallario A, Caligaris-Capio F. *Analysis of T-cell clones in systemic lupus erythematosus*. Haematologica 2000; 85(2):118-123.

73. Scheinecker C, Zwolfer B, Koller M, Manner G, Smolen JS. *Alterations of dendritic cells in systemic lupus erythematosus: phenotypic and functional deficiencies*. Arthritis Rheum 2001;44(4): 856-65.

ARTIGOS PUBLICADOS

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)