

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE SAÚDE E BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - ESTOMATOLOGIA

JOÃO PAULO DE CARLI

LÍQUEN PLANO BUCAL E HEPATITE C – REVISÃO DE
LITERATURA, ESTUDO CLÍNICO LONGITUDINAL E
HISTOQUÍMICO PELO MÉTODO AgNOR

CURITIBA

2012

JOÃO PAULO DE CARLI

LÍQUEN PLANO BUCAL E HEPATITE C – REVISÃO DE
LITERATURA, ESTUDO CLÍNICO LONGITUDINAL E
HISTOQUÍMICO PELO MÉTODO AgNOR

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Odontologia da Pontifícia
Universidade Católica do Paraná, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Odontologia – Área de
Concentração: Estomatologia

Orientador – Prof. Dr. Paulo Henrique Couto Souza

CURITIBA

2012



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

TERMO DE APROVAÇÃO

JOÃO PAULO DE CARLI

RELAÇÃO ENTRE LIQUEN PLANO BUCAL E HEPATITE C – REVISÃO DE LITERATURA, ESTUDO CLÍNICO LONGITUDINAL E HISTOQUÍMICO PELO MÉTODO AgNOR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Estomatologia**.

Orientador (a): 
Prof. Dr. Paulo Henrique Costa Souza
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Aline Cristina B. Rodrigues Johann
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Renata Iani Werneck
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Soluete Oliveira de Silva
Curso de Odontologia, UFERS


Prof. Dr. Antonio Fernando Pereira Falcão
Faculdade de Odontologia, UFBA

Curitiba, 26 de setembro de 2012.

Dedicatórias e Agradecimentos...

Dedico este trabalho:

Em primeiro lugar, a Deus, mestre dos mestres. Foi nele que busquei e sempre buscarei forças e inspiração para a realização de meus ideais de vida.

Aos meus queridos pais, Benigna e Célio, que estiveram incondicionalmente ao meu lado durante os períodos difíceis de minha vida. Mãe e Pai! Podem ter certeza que vocês serão eternamente meus maiores professores, pois me ensinaram lições de humildade, dedicação e persistência. Este trabalho também é de vocês!

À minha amada esposa Bethânia, que esteve ao meu lado durante a parte mais árdua dessa caminhada, soube compreender as dificuldades que passei e me incentivou com seu sorriso e palavras confortantes.

A minhas irmãs, Luciane e Alexandra, que mesmo distantes sempre me incentivaram a seguir a carreira acadêmica, com palavras de apoio e sabedoria.

Agradeço sinceramente:

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCPR, na pessoa do seu Coordenador, Professor Doutor Sérgio Vieira.

Ao meu Orientador, Professor Doutor Paulo Henrique Couto Souza, pelo acolhimento e exemplos de honestidade, humildade e paciência. Sem sua ajuda eu não teria atingido meu objetivo. Sou grato pela confiança que o senhor depositou em mim e pelos ensinamentos que me passou ao longo desses três anos, que não foram apenas lições de Estomatologia, mas lições de vida.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, especialmente à Professora Doutora Soluete Oliveira da Silva e Professor Tadeu da Rocha Pereira, que desde cedo me incentivaram a seguir a carreira acadêmica, e sem os quais eu não seria o que sou. Obrigado pelo apoio e ensinamentos fortalecedores. Saibam que tenho vocês como segundos pais e que sempre poderão contar comigo.

Aos Professores Silvana e José Carlos Moraes, que, desde cedo, me serviram de exemplo e idealização em relação à carreira docente.

À Direção e Coordenação da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo (FO-UPF) e do Hospital São Vicente de Paulo. Meu muito obrigado por terem possibilitado o acesso aos pacientes e material necessário para confecção deste trabalho.

À Professora Doutora Carmen Silvia Busin, e Acadêmicos Mauro Necker e Micheli Severo, do Instituto de Ciências Biológicas da UPF, que auxiliaram na parte laboratorial deste trabalho.

Ao Professor Sérgio Aparecido Ignácio, pelo auxílio na análise estatística dos dados do presente estudo.

À Professora Maria Emilse Locatelli (*in memoriam*), pela revisão ortográfica deste trabalho.

Aos pacientes que se prontificaram em participar da pesquisa e possibilitaram a realização deste estudo.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização do presente trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... | 07 |
| RESUMO..... | 08 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 09 |
| 2. OBJETIVOS..... | 12 |
| 3. HIPÓTESES..... | 13 |
| 4. ARTIGO I - Líquen Plano Bucal como um marcador precoce de Hepatite C – revisão de literatura..... | 14 |
| 4.1. Resumo/Abstract..... | 14 |
| 4.2. Introdução..... | 15 |
| 4.3. Revisão de literatura..... | 15 |
| 4.4. Conclusão..... | 25 |
| 4.5. Referências..... | 25 |
| 5. ARTIGO II – Estudo clínico longitudinal para avaliar a relação entre Líquen Plano Bucal e Hepatite C..... | 28 |
| 5.1. Resumo..... | 28 |
| 5.2. Introdução..... | 29 |
| 5.3. Materiais e Métodos..... | 30 |
| 5.4. Resultados..... | 31 |
| 5.5. Discussão..... | 35 |
| 5.6. Conclusão..... | 39 |
| 5.7. Referências..... | 39 |
| 6. ARTIGO III – Avaliação da atividade proliferativa celular em pacientes com Líquen Plano Bucal e Hepatite C por meio do método AgNOR..... | 42 |
| 6.1. Resumo..... | 42 |
| 6.2. Introdução..... | 43 |
| 6.3. Materiais e Métodos..... | 44 |
| 6.4. Resultados..... | 48 |
| 6.5. Discussão..... | 50 |
| 6.6. Conclusão..... | 53 |
| 6.7. Referências..... | 53 |
| 7. DISCUSSÃO..... | 56 |
| 8. CONCLUSÕES..... | 60 |
| 9. REFERÊNCIAS..... | 61 |
| 10. ANEXOS..... | 64 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- LPB / OLP – Líquen Plano Bucal / *Oral Lichen Planus*
- VHC / HCV – Vírus da Hepatite C / *Hepatitis C Virus*
- NORs – Regiões Organizadoras Nucleolares / *Nucleolar Organizer Regions*
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico / *Deoxyribonucleic Acid*
- RNA – Ácido Ribonucléico / *Ribonucleic Acid*
- AgNOR – Técnica de Impregnação pela Prata das Regiões de Organização Nucleolar / *Technique for Impregnation of Nucleolar Organizer Regions by Silver*
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase / *Polymerase Chain Reaction*
- SUS – Sistema Único de Saúde / *Unic Health System*
- H.E. – Hematoxilina-Eosina / *Hematoxylin-Eosin Staining*
- D.P. / S.D. – Desvio-Padrão / *Standard Deviation*
- ECA / ACE – Enzima Conversora de Angiotensina / *Angiotensin Converting Enzyme*
- AINEs / NSAIDs – Antinflamatórios não Esteroidais / *Nonsteroidal anti-inflammatory*
- ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- Anti-VHC – Exame ELISA anti-vírus da Hepatite C / *Examination ELISA anti-Hepatitis C*
- VHC-RNA – Exame PCR para detecção do RNA do vírus da Hepatite C / *Examination of RNA PCR for detection of Hepatitis C virus*
- mm³ – milímetro cúbico / *cubic millimeter*
- UCM – *Universal Collection Medium*
- mL – mililitros / *milliliters*
- r.p.m. – rotações por minuto / *rotations for minute*
- g – gramas / *grams*
- h – horas / *hours*
- °C – graus Celsius / *degrees Celsius*
- ANOVA – Análise de Variância / *Analysis of Variance*
- p* – significância estatística / *statistical significance*

RESUMO

Introdução: O Líquen Plano Bucal (LPB) é uma doença inflamatória crônica. Estudos confirmaram associação entre LPB e Vírus da Hepatite C (VHC). A avaliação das Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) em lesões bucais reflete o índice proliferativo celular. **Objetivo:** O presente trabalho se dividiu em três estudos: no primeiro realizou-se revisão de literatura sobre relação entre LPB e VHC; no segundo, realizou-se estudo clínico longitudinal de pacientes LPB+ ou VHC+ para verificar relação dessas doenças. No terceiro, avaliou-se a proliferação celular do LPB de pacientes sem VHC pelo método AgNOR, comparando-a à da mucosa bucal de pacientes VHC+, tratados ou não com interferon e ribavirina. **Materiais e Métodos:** No primeiro artigo, foram coletadas da literatura informações sobre o papel do LPB como marcador da infecção pelo VHC. No segundo, 51 pacientes - 33 VHC+ [GRUPO VHC+] e 18 com LPB confirmado [GRUPO LPB+] - foram clinicamente avaliados em três momentos (0, 6 e 12 meses). No terceiro, realizou-se estudo transversal para investigar a mucosa bucal de 4 grupos: 20 pacientes VHC+ sem sinais clínicos de LPB (10 nunca tratados para VHC – GRUPO 1 – e 10 sob tratamento com interferon e ribavirina – GRUPO 2); 15 pacientes com LPB reticular, sem VHC – GRUPO 3, e 15 sem infecção por VHC ou LPB (GRUPO 4 – Controle). A citologia esfoliativa realizada para cada grupo foi impregnada pelo método AgNOR seguida da contagem das NORs em 100 núcleos celulares por paciente. **Resultados:** A literatura reporta controvérsias na relação LPB x VHC. No segundo artigo, dentre os 33 pacientes VHC+, apenas um foi LPB+ ($p < 0,05$). Idade, sexo, doenças sistêmicas e fármacos utilizados pelos pacientes não mostraram influência na ocorrência de LPB ou infecção por VHC ($p > 0,05$). A mucosa dos pacientes VHC+ tratados com fármacos anti-VHC apresentou maior número de NORs por núcleo ($p < 0,05$). **Conclusões:** Apesar de um paciente VHC+ ter apresentado LPB, mais estudos devem ser realizados para esclarecer a relação entre LPB e VHC. O tratamento anti-VHC pode estar relacionado ao aumento da proliferação celular bucal, indicando uma possível relação entre LPB e pacientes VHC+ tratados com interferon e ribavirina.

Palavras-chave: Hepatite C; Líquen Plano; Mucosa Bucal; Nucléolo Celular Proliferação Celular.

1. INTRODUÇÃO

A relação entre a infecção pelo Vírus da Hepatite C (VHC) e o Líquen Plano Bucal (LPB) persiste num assunto de controvérsia. Se essa associação for verdadeira, o LPB pode ser utilizado como um sinal indicativo de infecção pelo VHC em pacientes assintomáticos, bem como para o diagnóstico e tratamento precoce desta doença, com possibilidade de um prognóstico melhor (CHAINANI-WU *et al.*, 2004).

O primeiro estudo indicando associação entre doenças crônicas do fígado e líquen plano foi publicado por Rebora *et al.* (1978). Após a descrição do genoma do VHC em 1989, e quando as sorologias para o vírus se tornaram disponíveis, em 1990, estudos clínicos tem reportado a coexistência de Hepatite C crônica e Líquen Plano, em especial o LPB (CHAINANI-WU *et al.*, 2004; GROSSMANN *et al.*, 2007; GROSSMAN *et al.*, 2009; BERMEJO-FENOLL *et al.*, 2010; BIRKENFELD *et al.*, 2010; VACHIRAMON *et al.*, 2010). No entanto, essa relação ainda permanece indefinida (CHAINANI-WU *et al.*, 2004; RANDAZZO *et al.*, 2005; CARROZZO, 2008), uma vez que tanto o LPB quanto a infecção por VHC podem ocorrer de forma concomitante e sem relação causal em pacientes com idade de 50 anos ou mais (LODI *et al.*, 2004). A influência da localização geográfica também deve ser considerada, uma vez que a associação entre VHC e LPB parece ser muito prevalente no Japão, nos Estados Unidos da América e na região sul da Europa (CARROZZO e THORPE, 2009).

Pilli *et al.* (2002) afirmam existir, em lesões de LPB, células T que respondem especificamente ao VHC. Os autores reportam que esse achado e a detecção de RNA do VHC no LPB sugerem fortemente a existência de resposta celular T associada com a infecção pelo VHC na patogênese do LPB.

A terapia antiviral para a Hepatite C também tem sido responsável por vários efeitos sobre lesões de LPB. Strumia *et al.* (1993) relataram que o interferon pode induzir a migração de células T para a pele devido à sua capacidade de estimular queratinócitos a produzirem interleucina-2. Para Sookoian *et al.* (1999), a ribavirina é responsável por aumentar o risco de reações adversas cutâneas liquenóides, tendo sido envolvida na melhora ou exacerbação do LPB. No entanto, Schlesinger *et al.* (1997) reportam que pouca atenção tem sido dada ao efeito variável do interferon, associado ou não com a ribavirina, sobre a patogênese do LPB.

Apesar da quantidade de estudos clínicos realizados em torno da associação entre LPB e VHC, não há até o momento dados sobre a atividade proliferativa celular da mucosa bucal em portadores das duas enfermidades, o que poderia indicar uma possível relação entre as mesmas.

Segundo Anastassova-Kristeva (1977), as Regiões Organizadoras Nucleolares (do inglês – *Nucleolar Organizer Regions* - NORs) são estruturas que estão presentes no interior do nucléolo das células em interfase e nos cromossomos acrocêntricos dos pares 13, 14, 15, 21 e 22 nas células humanas em divisão. As NORs são fitas de DNA ribossomal (rDNA) transcrevendo ativamente RNA ribossomal (rRNA), que, juntamente com proteínas, formarão os ribossomos. As NORs ativas são associadas com proteínas acídicas, argirofílicas não histônicas, que são visualizadas pelo uso de uma técnica de coloração a base de prata: a técnica de coloração das regiões de organização nucleolar (AgNOR).

Tem sido demonstrado que um número aumentado de NORs está associado a uma maior agressividade das enfermidades (DE CARLI *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2011), uma vez que o número médio de NORs por núcleo é maior em lesões malignas e cancerizáveis quando comparadas com lesões benignas (SANO, 1991; SILVA

FONSECA e CARMO, 2001; SOUSA *et al.*, 2009; WARMAKULASURIYA e JOHNSON, 1993; XIE, 1997).

Silva Fonseca e Carmo (2001) avaliaram, por meio do método AgNOR, grupos de portadores de LPB, de queratose bucal e com mucosa bucal normal. Segundo os autores, o número de NORs dos queratinócitos foi significativamente maior nos pacientes com LPB quando comparado aos demais grupos.

Sousa *et al.* (2009), utilizando-se do método AgNOR, compararam o nível de atividade proliferativa celular do LPB, da displasia epitelial e do carcinoma de células escamosas bucal. O número médio de NORs por núcleo foi estatisticamente menor no LPB, quando comparado às outras enfermidades.

Conforme visto anteriormente, diversos estudos têm aplicado o método AgNOR nos queratinócitos, sugerindo que a análise quantitativa das NORs em tais células pode ser útil em estimar a atividade proliferativa das doenças. Tendo em vista que a impregnação tecidual pela prata já consiste numa técnica bem delineada para os queratinócitos e que tais células estão diretamente envolvidas no mecanismo do LPB, justifica-se a utilização da metodologia AgNOR no presente estudo.

Face às informações apresentadas, este estudo se dividiu em três artigos. No primeiro, já publicado, realizou-se uma revisão de literatura enfocando informações sobre o LPB, o VHC e acerca da relação entre as duas enfermidades. No segundo, procurou-se, através da avaliação clínica longitudinal de pacientes com LPB ou portadores de VHC, estabelecer uma possível relação clínica entre as enfermidades. Finalmente, no terceiro trabalho, avaliou-se por meio do método AgNOR a atividade proliferativa celular das lesões de LPB de pacientes sem VHC e da mucosa bucal normal de portadores de VHC, tratados ou não por interferon e ribavirina.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista o referencial teórico exposto anteriormente, o presente trabalho tem como objetivos principais:

A – Realizar uma revisão de literatura acerca do Líquen Plano Bucal, do vírus da Hepatite C e da possível relação entre tais enfermidades;

B – Conduzir um estudo clínico longitudinal com portadores de LPB ou infecção pelo VHC, “virgens de tratamento”, com o objetivo de verificar uma possível relação entre tais enfermidades e, adicionalmente, avaliar a relação do sexo, idade, doenças sistêmicas e fármacos utilizados pelos pacientes na ocorrência do LPB ou infecção pelo VHC;

C – Avaliar, por meio do método AgNOR, a atividade proliferativa celular das lesões de LPB de pacientes sem VHC e a atividade proliferativa celular da mucosa bucal normal de pacientes com VHC, sob tratamento ou não com interferon e ribavirina.

3. HIPÓTESES

Tendo em vista os dois artigos de investigação desenvolvidos no presente estudo, as hipóteses levantadas são as seguintes:

A) ESTUDO CLÍNICO LONGITUDINAL:

H_0 (hipótese nula) – O LPB e a infecção pelo VHC não apresentam relação de causalidade entre si; o sexo, idade e doenças sistêmicas dos pacientes avaliados, bem como os fármacos utilizados pelos mesmos não exercem influência na ocorrência do LPB ou infecção pelo VHC.

H_1 (hipótese em estudo) – O LPB e a infecção pelo VHC apresentam relação de causalidade entre si; o sexo, idade ou doenças sistêmicas dos pacientes avaliados, bem como os fármacos utilizados pelos mesmos exercem influência na ocorrência do LPB e/ou infecção pelo VHC.

B) ESTUDO HISTOQUÍMICO TRANSVERSAL (MÉTODO AgNOR):

H_0 (hipótese nula) – A atividade proliferativa celular das lesões de LPB de pacientes sem VHC não é estatisticamente diferente da atividade proliferativa celular da mucosa bucal normal de pacientes com VHC, sob tratamento ou não com interferon e ribavirina.

H_1 (hipótese em estudo) – A atividade proliferativa celular das lesões de LPB de pacientes sem VHC é estatisticamente diferente da atividade proliferativa celular da mucosa bucal normal de pacientes com VHC, sob tratamento ou não com interferon e ribavirina.

4. ARTIGO I ¹

Líquen Plano Bucal como um marcador precoce de Hepatite C – revisão de literatura - *Oral lichen planus as an early marker of hepatitis C - literature review*

4.1. Resumo

Objetivo: o presente trabalho objetiva, a partir de uma revisão de literatura, esclarecer o cirurgião-dentista sobre o papel potencial do líquen plano como marcador precoce da infecção pelo vírus da hepatite C (VHC). **Revisão de literatura:** o VHC representa um grande problema de saúde pública, uma vez que pode ser responsável por desenvolver hepatite crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular. Além disso, tal vírus pode induzir um amplo espectro de manifestações extra-hepáticas, algumas das quais se manifestam em pele e mucosas, a exemplo do líquen plano. **Conclusão:** entretanto, a literatura afirma que existem muitas controvérsias acerca de tal relação.

Palavras-chave: Hepatite C; Líquen Plano Bucal; Associação.

Abstract

Aim: This paper aims, through a literature review, enlighten the reader about the potential role of lichen planus as an early marker of hepatitis C virus (HCV) infection. **Literature review:** HCV is a major public health problem, since it may be responsible for developing chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Furthermore, this virus can induce a wide spectrum of extrahepatic manifestations, some of which are manifested in the skin and mucous membranes, such as lichen planus. **Conclusion:** However, the literature states that there are many controversies about this relationship.

Key words: Hepatitis C; Lichen Planus, Oral; Association.

¹ Revista Odonto UMESP, v. 19, n. 37, p. 89-97, 2011.

4.2. Introdução

O líquen plano é uma enfermidade mucocutânea, em alguns casos cancerizável, que possui etiologia desconhecida e frequentemente acomete a mucosa bucal, podendo apresentar associação com a hepatite C. Embora alguns estudos¹⁻⁴ evidenciem significativa correlação entre essas alterações patológicas, permanece uma controvérsia em torno dessa possibilidade⁵⁻⁹.

Estudos experimentais e dados epidemiológicos recentes sugerem que os pacientes são infectados pelo vírus da hepatite C (VHC) muito precocemente e só depois desenvolvem as lesões de líquen plano bucal, provavelmente por uma via imunopatológica possibilitada pelo VHC e ainda não definida claramente¹⁰.

Se a associação entre líquen plano bucal (LPB) e infecção pelo VHC for verdadeira, o LPB certamente pode ser usado como um sinal da infecção pelo VHC em pacientes assintomáticos, para o diagnóstico principal e tratamento precoce, com possibilidade de melhores prognósticos⁷.

Tendo em vista o exposto, o presente trabalho objetiva, com base numa revisão de literatura, esclarecer o cirurgião-dentista sobre o possível papel do LPB como marcador precoce da infecção pelo VHC.

4.3. Revisão de literatura

Líquen Plano Bucal (LPB)

O líquen plano é uma doença inflamatória crônica relativamente comum, cuja prevalência na boca está entre 0,1% e 2,2% da população. Descrita pela primeira vez em 1869, por Erasmus Wilson, pode envolver pele/anexos e mucosas, separada ou

simultaneamente. Na boca, esse comprometimento pode acontecer isoladamente ou com envolvimento cutâneo concomitante¹¹.

A etiologia do líquen plano ainda não foi totalmente esclarecida, mas tem sido considerada uma doença multifatorial mediada por um mecanismo imunopatológico, envolvendo particularmente os linfócitos T⁶. Num número expressivo de casos está associado a ansiedade e depressão, segundo Garcia-Póla Vallejo *et al.*¹ (2001), consideradas um fator de risco que influencia no seu desenvolvimento.

Ocorre em pacientes de ambos os sexos, com predominância na mulher, em geral acima dos 40 anos de idade¹².

Um total de 50 dermatologistas da cidade de Bauru e região foram entrevistados e responderam a um questionário contendo 19 perguntas sobre a etiologia, o diagnóstico e o tratamento do líquen plano. Os principais fatores etiológicos citados incluíram: fator idiopático (22,4%), psicossomático (21,5%), imunológico (14,0%) e viral (14,0%). Outras associações do líquen plano, como diabetes melito, alterações infecciosas, anemia, predisposição genética, alergias, tabagismo e exposição solar, também foram citadas e relacionadas com a etiopatogenia da doença⁶.

Segundo Souza e Rosa² (2008), estresse, alimentos como tomate, frutas cítricas e pratos condimentados, procedimentos odontológicos, doenças sistêmicas, consumo exagerado de álcool e uso de tabaco em todas as suas formas têm sido associados a períodos de exacerbação da doença. As doenças sistêmicas, em especial as decorrentes da infecção pelo vírus da hepatite C, vêm ganhando grande destaque nos últimos anos.

O LPB tem aspecto clínico polimorfo, sendo classificado em formas típicas e atípicas. As formas típicas podem ser divididas em: reticular (estrias de Wickham), papular, placa (Fig. 1) e verrucosa. As formas atípicas são: ulcerada, atrófica,

eritematosa, erosiva, pigmentar e bolhosa. Na mucosa bucal ocorre principalmente na mucosa jugal, bilateralmente, na margem e dorso da língua e na semimucosa labial¹².



Figura 1 - Líquen plano em placa em face lateral direita e inferior de língua

Segundo Neville *et al.*⁵ (2009), essencialmente, existem duas formas de lesões bucais: reticular e erosiva. O líquen plano reticular é muito mais comum do que a forma erosiva, porém a forma erosiva predomina em vários estudos. Isso provavelmente se deve ao viés estatístico, uma vez que a forma erosiva é sintomática e, em muitos casos, os pacientes buscam atendimento apenas quando apresentam esta variedade de LPB. A forma reticular geralmente não provoca sintomas e envolve a região posterior da mucosa da bochecha, bilateralmente. Outras áreas da mucosa bucal também podem ser afetadas concomitantemente, como a margem lateral e o dorso da língua, gengiva, palato e o vermelhão do lábio.

O diagnóstico do líquen plano é realizado por meio de biópsia e/ou exame clínico das lesões cutâneas ou bucais⁶. As estrias brancas entrelaçadas que aparecem bilateralmente na região posterior da mucosa da bochecha são virtualmente patognomônicas. Podem surgir dificuldades no diagnóstico caso a candidose esteja sobreposta nas lesões, porque o microrganismo *Candida albicans* pode alterar o padrão

reticular característico do LPB. Assim, a biópsia incisional das lesões frequentemente é necessária para se afastar a hipótese de outras doenças ulcerativas ou erosivas, como o lúpus eritematoso ou a estomatite ulcerativa crônica⁵.

Os aspectos histopatológicos do líquen plano são característicos, mas podem não ser específicos, porque outras condições, como as reações liquenoides a drogas, também podem mostrar padrões semelhantes. Graus variados de ortoceratose e paraceratose podem estar presentes na superfície do epitélio, o que está na dependência de a amostra ter sido retirada de uma lesão erosiva ou reticular. A espessura da camada espinhosa também pode variar. As cristas interpapilares podem estar ausentes ou hiperplásicas, mas classicamente são pontudas ou em forma de “dente-de-serra”. A destruição da camada de células basais do epitélio (degeneração hidrópica) também é evidente, sendo acompanhada por um infiltrado intenso e semelhante a uma faixa, principalmente de linfócitos T, imediatamente subjacente ao epitélio. Ceratinócitos degenerados podem ser vistos na área da interface epitélio-tecido conjuntivo, sendo chamados corpos de Civatte, coloides, citoides ou hialinos^{5,13}.

Sugerman *et al.*¹⁴ (2002) acreditam que mecanismos específicos e não-específicos podem estar envolvidos na etiopatogenia do líquen plano. Os primeiros incluem apresentação de antígenos por queratinócitos da camada basal e morte de queratinócitos antígeno-específicos por linfócitos T citotóxicos, ao passo que os últimos incluem degranulação dos mastócitos e ativação de metaloproteinases matriciais. Esses mecanismos, combinados, levariam ao acúmulo de linfócitos na lâmina própria subjacente ao epitélio, rompimento da membrana basal, migração dos linfócitos T intraepitelial e apoptose dos queratinócitos, achados característicos do LPB. Além disso, para estes autores a cronicidade da doença pode ser explicada, em parte, por uma

deficiência nos mecanismos de imunossupressão mediada pelo fator transformador de crescimento *beta*.

Em relação ao tratamento do LPB, 27,6% dos profissionais utilizam a corticoterapia e alguns relataram outras terapias, como o uso de cauterização com ácido tricloroacético, bochechos com ureia e água destilada, prescrição de derivados da vitamina A e de tranquilizantes em líquen plano do tipo reticular com lesões restritas à mucosa bucal⁶.

Segundo Regezi e Sciubba¹³ (2008), os corticoesteroides são os medicamentos de escolha de tratamento do líquen plano, o que se deve à sua capacidade de modular a resposta inflamatória e imunológica. A aplicação tópica e a injeção local de esteroides têm sido usadas com sucesso no controle da doença. Todavia, nos casos em que os sintomas são graves, pode-se optar pelo uso sistêmico. A adição de antifúngicos ao tratamento potencializa os resultados clínicos. Tal fato, aparentemente, é consequência da eliminação do crescimento secundário da *Candida albicans* no tecido envolvido pelo LPB. Os antifúngicos também previnem o crescimento fúngico associado ao uso de corticoesteroides.

Gandolfo *et al.*¹⁵ (2004), que avaliaram 402 pacientes com líquen plano bucal diagnosticados entre janeiro de 1988 e julho de 1999 e acompanhados periodicamente até fevereiro de 2001, concluíram que nesse período dois homens (1,3%) e sete mulheres (2,8%) desenvolveram carcinoma epidermoide, mostrando um risco de transformação maligna maior entre as mulheres do que entre os homens. Além disso, foi observado que pacientes infectados pelo vírus da hepatite C tinham uma chance três vezes superior de desenvolver câncer bucal do que os não infectados. Esses resultados não só reforçam as suspeitas quanto ao potencial de transformação maligna do LPB, como chamam a atenção para a participação do vírus da hepatite C nesse processo.

Vírus da Hepatite C (VHC)

O VHC é um RNA vírus da família *Flaviviridae*, identificado em 1989 por Choo *et al.*¹⁶. Estima-se que no mundo haja 170 milhões de pessoas infectadas por esse vírus, das quais aproximadamente 3,2 milhões se encontram no Brasil. Trata-se, portanto, de um dos maiores problemas de saúde pública enfrentados mundialmente³.

Segundo Mignona¹⁷ (1998), a hepatite C afeta 0,5-2% da população, com uma predileção por mulheres na quarta e quinta décadas de vida.

Após exposição ao vírus, o indivíduo infectado passa por um período de incubação, que pode variar de um a cinco meses (em geral 50 dias). Entre 30% e 40 % dos adultos com infecção aguda pelo VHC apresentam sintomas leves, predominando febre, mal-estar, fadiga, náuseas, vômitos e discreta dor abdominal^{3,18}.

A hepatite crônica por VHC é, na maioria dos casos, assintomática ou oligossintomática. De modo geral, as manifestações clínicas aparecem em fases adiantadas da doença. Por esse motivo, muitas vezes o diagnóstico é feito ao acaso, por meio de exames de sangue solicitados para outros fins³.

Acredita-se que, em média, 80% dos casos de infecção pelo VHC evoluam para a cronicidade e que um quarto ou um terço possam evoluir para formas histológicas graves ou cirrose em um período de vinte anos, caso não haja intervenção terapêutica. O restante evolui para formas mais lentas e talvez nunca resulte em hepatopatia grave. A infecção pelo VHC já é a maior responsável por cirrose e transplante hepático no mundo ocidental¹⁹.

A transmissão do VHC se dá essencialmente por contato direto com sangue e hemoderivados contaminados, colocando sob risco os usuários de drogas, os politransfundidos, as pessoas submetidas à hemodiálise e os pacientes que tenham sofrido acidente com material perfurocortante contaminado. A possibilidade de

transmissão sexual é pouco frequente (menos de 1%), ocorrendo principalmente em relações desprotegidas (sem o uso de preservativo). São consideradas também populações de risco acrescido para infecção pelo VHC por via parenteral os pacientes que receberam transfusão de sangue e/ou hemoderivados antes de 1993¹⁸.

O diagnóstico laboratorial da hepatite C, bem como da hepatopatia resultante, é feito em etapas. Os pacientes anti-VHC positivos são submetidos ao exame de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) qualitativo, que pode ser detectado entre uma e duas semanas após a infecção. O tratamento da hepatite C é considerado difícil e oneroso, sendo as principais drogas utilizadas e preconizadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) o interferon e a ribavirina^{3,18}.

Relação entre LPB e infecção pelo VHC

As infecções com origem bucal podem ter repercussões sistêmicas importantes, assim como as infecções de ordem sistêmica podem resultar em manifestações bucais e/ou implicar cuidados especiais quando da necessidade de intervenções odontológicas. Nesse sentido, é relatado que a infecção pelo VHC, e em menor proporção pelo vírus da hepatite B, predispõem o paciente ao desenvolvimento de manifestações extra-hepáticas, incluindo manifestações imunologicamente mediadas, como o líquen plano^{18,20}.

O primeiro trabalho indicando associação entre doenças crônicas do fígado e líquen plano foi publicado em 1978. Após a identificação do genoma do VHC em 1989, muitos estudos têm reportado a coexistência de hepatite C crônica e líquen plano, em especial o LPB, com uma prevalência de 1% a 4% da população geral. Nesse sentido, foi realizada uma pesquisa na base de dados MEDLINE com as palavras-chave *hepatitis* e *lichen planus*, tendo sido encontradas 263 citações desde 1966 até 2003, das quais 80

sugeriram existir uma associação entre LPB e a infecção por VHC. Muitos artigos, porém, negaram existir qualquer conexão entre as duas entidades. Os trabalhos pesquisados variaram quanto às populações estudadas, aos desenhos de estudo e à distribuição de possíveis confundidores, revelando muitas *bias* importantes, que podem levar a conclusões equivocadas⁷.

O LPB tem sido relatado como mais prevalente em pacientes portadores de hepatite C crônica em comparação com a população geral; porém, a associação entre essas enfermidades ainda permanece controversa. A literatura afirma que, se tal associação é verdadeira, o LPB certamente pode, em certas populações, ser usado como um sinal da infecção pelo VHC em pacientes assintomáticos, para o diagnóstico principal e tratamento precoce, com possibilidade de melhores prognósticos^{7,21}.

A grande prevalência da infecção pelo VHC na população em geral, especialmente em pessoas com mais de cinquenta anos, tem sido indicada como um possível fator de confusão em estudos sobre a relação entre VHC e LPB. Nesse sentido, Lodi *et al.*⁹ (2004) afirmam que em seu estudo, como vários pacientes com LPB possuíam cinquenta anos ou mais, a grande frequência de VHC soropositivos encontrados em grupos de portadores de líquen plano foi apenas uma coincidência, uma vez que as duas enfermidades acometem indivíduos nessa faixa etária.

Para Chainani-Wu *et al.*⁷ (2004), a idade é um aspecto pouco contributivo na verificação de relação entre infecção por VHC e LPB, porque em muitas populações a prevalência das várias exposições pelo VHC acontece em diferentes grupos etários, não apresentando coincidência com o LPB. Além disso, a associação do LPB com VHC talvez seja confundida em virtude da idade dos pacientes, uma vez que ambas as enfermidades são mais comuns em pessoas de mais idade.

Michele *et al.*⁸ (2007) realizaram um estudo na Itália com o objetivo de analisar a possível correlação entre LPB e a infecção por hepatite C. Os autores analisaram três grupos, sendo um de pacientes portadores de líquen plano histologicamente comprovado, outro de pacientes comprovadamente VHC+ e o terceiro composto por pacientes saudáveis, hospitalizados em virtude de trauma ortopédico. Concluíram, com base no estudo, que não existe uma associação clara entre a ocorrência de LPB e a infecção crônica por VHC, sendo possível que a ocorrência concomitante das duas enfermidades se dê por coincidência.

Birkenfeld *et al.*²² (2010) realizaram um estudo incluindo 1557 portadores de LPB e 3115 pacientes-controle, tendo como resultado que a prevalência de hepatite C nos pacientes com líquen plano foi estatisticamente maior do que nos pacientes do grupo de controle (1,9% e 0,4%, respectivamente – $p < 0,001$). Assim, os autores sugerem que o clínico que atende pacientes com lesões compatíveis com LPB deveria considerar o rastreamento de hepatite C.

Nesse sentido, Bermejo-Fenoll *et al.*²³ (2010) realizaram um estudo clínico envolvendo 550 pacientes portadores de LPB, encontrando que a prevalência de hepatite C em tais pacientes foi de 3,5%.

A questão geográfica dos estudos deve também ser considerada, uma vez que a associação entre LPB e hepatite C parece ser mais prevalente no sul da Europa, Japão e Estados Unidos da América²⁴.

Outros estudos^{25,26} investigaram a presença de líquen plano em portadores de hepatite C e mostraram uma prevalência geralmente maior do que a esperada (1,6% a 20%), independentemente da localização geográfica. Tais achados indicam que a associação entre LPB e VHC não pode ser explicada apenas com base na prevalência de

infecção por VHC na população geral, mas também por fatores genéticos das populações estudadas.

Schlesinger *et al.*²⁷ (1997) afirmam que uma associação entre a hepatite C crônica ativa e o líquen plano foi estabelecida em inúmeros estudos, sendo a terapia viral por interferon-alfa responsável por iniciar, curar, exacerbar ou não apresentar efeito nas lesões de líquen plano. Nesse sentido, os autores descrevem um caso de líquen plano bucal iniciado num paciente tratado com interferon-alfa 2b. Ainda afirmam que o interferon pode induzir a expressão de antígenos de superfície nos queratinócitos, os quais podem desempenhar um papel importante na formação do líquen plano.

Nagao *et al.*²⁸ (2005), baseados no relato de um caso clínico, afirmam que o tratamento antiviral para hepatite C com interferon associado à ribavirina exacerbou as lesões de líquen plano erosivo bucal de um paciente.

Carozzo¹⁰ (2008) reporta que estudos experimentais e dados epidemiológicos recentes sugerem que os pacientes são infectados pelo VHC muito precocemente e só depois desenvolvem as lesões de LPB, provavelmente por uma via imunopatológica possibilitada pelo vírus e ainda não definida claramente. O autor ainda afirma que pouca atenção tem sido dada nas pesquisas ao efeito variável do interferon-alfa (associado ou não à ribavirina) na terapia do líquen plano. Assim, estudos específicos que analisem o efeito do tratamento da infecção por VHC no líquen plano são necessários.

Grossmann *et al.*⁴ (2008) afirmam que existem de 170 a 200 milhões de pessoas infectadas cronicamente pelo vírus da hepatite C em todo o mundo. Segundo os autores, esse fato indica que a prevenção e o tratamento da infecção pelo vírus da hepatite C são uma prioridade em saúde pública, sendo atualmente uma combinação de interferon e ribavirina a melhor opção de tratamento, embora esses dois medicamentos sejam associados a inúmeros efeitos colaterais, como o aparecimento e exacerbação das lesões

buciais de líquen plano. Assim, os autores examinam três casos de exacerbação de líquen plano bucal durante o tratamento de hepatite C crônica com interferon e ribavirina.

Por outro lado, Ojha *et al.*²⁹ (2008) afirmam que o tratamento de um paciente portador de hepatite C com interferon-alfa levou a que, dentro de dias, as lesões liquenoides que o paciente apresentava na cavidade bucal regredissem.

Algumas sugestões da literatura acerca de estudos a serem realizados são a estratificação da faixa etária dos grupos comparados, realização de estudos tipo caso-controle, verificação da procedência dos pacientes em estudo, utilização de técnicas de PCR para confirmar o diagnóstico de infecção por VHC, investigação da relação entre tratamento da hepatite C e evolução das lesões de líquen plano e a pesquisa da relação entre diferentes genótipos de VHC e líquen plano nos diferentes países³.

4.4. Conclusão

A partir do presente trabalho, nota-se que a literatura se mostra nitidamente dividida em relação ao papel do LPB como marcador precoce de infecção pelo VHC. Nesse sentido, são aventadas diversas hipóteses acerca da correlação de tais enfermidades, mas ainda não se pode chegar a uma conclusão definitiva com relação ao assunto, carecendo-se, assim, de maiores estudos clínicos acerca do tema. Pode-se, no entanto, inferir que na prática clínica diária do cirurgião-dentista existe a necessidade de atenção não somente à cavidade bucal, mas aos diferentes cenários do organismo para o fortalecimento das ações de promoção à saúde, prevenção de doenças e diagnóstico precoce das mesmas.

4.5. Referências

1. García-Pola Vallejo MJ, Huerta G, Cerero R, Seoane JM. Anxiety and Depression as Risk Factors for Oral Lichen planus. *Dermatology* 2001; 203(4):303-7.

2. Souza FAC, Rosa LEB. Líquen Plano Bucal: considerações clínicas e histopatológicas. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2008; 74(2):284-92.
3. Guerreiro TDT, Machado MM, Freitas THP. Associação entre líquen plano e infecção pelo vírus da hepatite C: um estudo prospectivo envolvendo 66 pacientes da clínica de dermatologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. *An Bras Dermatol* 2005; 80(5):475-80.
4. Grossmann SM, Teixeira R, de Aguiar MC, do Carmo MA. Exacerbation of oral lichen planus lesions during treatment of chronic hepatitis C with pegylated interferon and ribavirin. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20(7):702-6.
5. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial*. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.
6. Dorta RG, Colaço CS, Costa CG, Oliveira DT. Conduta médica em pacientes com líquen plano cutâneo e bucal. *Rev Fac Odontol Bauru* 2000; 8(3/4):23-8.
7. Chainani-Wu N, Lozada-Nur F, Terrault N. Hepatitis C virus and lichen planus: A review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98(2):171-83.
8. Michele G, Carlo L, Mario MC, Giovanni L, Pasquale M, Alessandra M. Hepatitis C virus chronic infection and oral lichen planus: an Italian case-control study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19(8):647-52.
9. Lodi G, Giuliani M, Majorana A, Sardella A, Bez C, Demarosi F, Carrassi A. Lichen planus and hepatitis C virus: a multicentre study of patients with oral lesions and a systematic review. *Brit J Dermatol* 2004; 151(6):1172-81.
10. Carrozzo M. Oral diseases associated with hepatitis C virus infection. Part 2: lichen planus and other diseases. *Oral Dis* 2008; 14(3):217-28.
11. Navas-Alfaro SE, Fonseca EC, Guzmán-Silva MA, Rochael MC. Análise comparativa entre líquen plano oral e cutâneo. *J Bras Patol Med Laboratorial* 2003; 39(4):351-60.
12. Marcucci G. *Estomatologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
13. Regezi JA, Sciubba JJ. *Patologia bucal: correlações clínico-patológicas*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
14. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, *et al*. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Méd* 2002; 13(4):350-65.
15. Gandolfo S, Richiardi L, Carrozzo M, Brocchetti R, Carbone M, Pagano M, *et al*. Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncology* 2004; 40(1):77-83.
16. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a CDNA clone derived from a blood born non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244(4902):359-62.

17. Mignona MD. Oral lichen planus and HCV infection: a clinical evaluation of 263 cases. *Int J Dermatology* 1998, 37:575-8.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Manual A B C D E das Hepatites Virais para Cirurgiões-Dentistas. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Hepatites virais: o Brasil está atento. 3.ed. Brasília, 2008b. 60p. Disponível em: www.cdcpin.org. Acesso em: 02 set. 2010.
20. Zignego AL, Ferry C, Pileri SA, Caini P, Bianchi FB. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection: A general overview and guidelines for a clinical approach. *Dig Liver Dis* 2007; 39:2-17.
21. Grossmann SMC, Aguiar MCF, Teixeira R, Carmo MAV. Oral lichen planus and chronic hepatitis C. A controversial association. *Am J Clin Pathol* 2007; 127:800-4.
22. Birkenfeld S, Dreiherr J, Weitzman D, Cohen AD. A study on the association with hepatitis B and hepatitis C in 1557 patients with lichen planus. *JEADV* 2010; DOI: 10.1111/j.1468-3083.2010.03809.x, p. 1-5.
23. Bermejo-Fenoll A, Sánchez-Siles M, López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Salazar-Sánchez N. A retrospective clinicopathological study of 550 patients with oral lichen planus in south-eastern Spain. *J Oral Pathol & Medicine* 2010; 39:491-6.
24. Carrozzo M, Thorpe R. Oral lichen planus: a review. *Minerva Stomatol* 2009; 58:519-37.
25. Carrozzo M. Oral health in patients with hepatitis C virus infection: an underestimated problem? *Oral Dis* 2001; 7(5):267-70.
26. Dervis E, Serez K. The prevalence of dermatologic manifestations related to chronic hepatitis C virus infection in a study from a single center in Turkey. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 2005; 14:93-8.
27. Schlesinger TE, Camisa C, Gay D, Bergfeld WF. Oral erosive lichen planus with epidermolytic hyperkeratosis during interferon alfa-2b therapy for chronic hepatitis C virus infection. *J Am Academy Dermatol* 1997; 36(6):1023-5.
28. Nagao Y, Kawaguchi T, Ide T, Kumashiro R, Sata M. Exacerbation of oral erosive lichen planus by combination of interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Int J Mol Med* 2005; 15(2):237-41.
29. Ojha J, Bhattacharyya I, Islam N, Cohen DM, Stewart CM, Katz J. Xerostomia and lichenoid reaction in a hepatitis C patient treated with interferon-alpha: a case report. *Quintessence Int* 2008; 39(4):343-8.

5. ARTIGO II ²

João Paulo De Carli^a, Paulo Henrique Couto Souza^b

^a Faculdade de Odontologia, Universidade de Passo Fundo, 99052-900, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil

^b Escola de Saúde e Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 80215-901, Curitiba, Paraná, Brasil

Estudo clínico longitudinal para avaliar a relação entre Líquen Plano Bucal e Hepatite C

5.1. Resumo

Introdução: O Líquen Plano Bucal (LPB) é uma doença inflamatória mucocutânea crônica que frequentemente envolve a mucosa bucal. Estudos recentes tem confirmado uma associação significativa entre LPB e doenças hepáticas, em particular com a infecção pelo Vírus da Hepatite C (VHC). **Objetivo:** Realizou-se um estudo clínico longitudinal envolvendo pacientes com LPB ou infecção por VHC com o objetivo de verificar uma possível relação entre essas doenças. Além disso, avaliou-se a influência da idade, sexo, doenças sistêmicas e fármacos utilizados pelos pacientes na presença do LPB ou VHC. **Materiais e Métodos:** Cinquenta e um pacientes - 33 infectados por VHC, diagnosticados por anti-VHC e VHC-RNA [Grupo VHC+] e 18 portadores de LPB confirmado histopatologicamente [Grupo LPB+] - foram clinicamente avaliados em três momentos (0, 6 e 12 meses). **Resultados:** Dentre os 33 pacientes VHC+, apenas um foi clínica e histopatologicamente positivo para LPB (Teste Qui-quadrado de Pearson – 46,852, $p = 7,65 \times 10^{-12}$). Os 18 pacientes pertencentes ao Grupo LPB+ apresentaram características clínicas e histopatológicas de LPB reticular/em placa. A idade, sexo, doenças sistêmicas e fármacos utilizados pelos pacientes não mostraram influência na ocorrência de LPB ou infecção por VHC ($p > 0,05$). **Conclusão:** Apesar de um paciente VHC+ ter apresentado LPB durante a observação realizada, mais estudos epidemiológicos com amostras e tempos de acompanhamento maiores, além de testes laboratoriais específicos devem ser realizados para esclarecer a real relação entre o LPB e a infecção por VHC. **Relevância Clínica:** Portadores de LPB podem ser avaliados para a presença de infecção por VHC.

Palavras-chave: Hepatite C; Líquen Plano; Mucosa Bucal; Fatores de Risco.

* Autor correspondente:

Paulo Henrique Couto Souza

Professor Titular do Curso de Odontologia da Escola de Saúde e Biociências da PUCPR.

Rua Imaculada Conceição, 1555, 80215-901 - Curitiba/PR, Brasil. Tel.: (5541) 3271 2565 / Fax: (5541) 3271 1405

E-mail: couto.s@pucpr.br

² Nas normas do Clinical Oral Investigations (ANEXO 1).

5.2. Introdução

A infecção pelo Vírus da Hepatite C (VHC) é considerada um problema de saúde pública que apresenta morbidade e mortalidade significativas [1]. Conseqüentemente, as manifestações extra-hepáticas da hepatite C, como o Líquen Plano Bucal (LPB), devem ser conhecidas pelos clínicos gerais, permitindo diagnóstico e tratamento precoces [2-5].

O primeiro estudo indicando associação entre doença hepática crônica e líquen plano foi publicado em 1978 [6]. Após isto, estudos tem reportado a coexistência de hepatite C crônica e líquen plano, particularmente LPB [1,4,5]. No entanto, diferenças em populações, delineamentos de estudos e distribuições de potenciais confundidores são vieses importantes que podem conduzir a conclusões errôneas [7].

Vários estudos clínicos tem mostrado uma associação entre infecção por VHC e ocorrência de LPB [1,4,5,8,9]. Contudo, tal associação ainda permanece controversa [3,7,10], uma vez que ambas as enfermidades podem ocorrer sem relação de causalidade em pacientes com 50 anos de idade ou mais [11]. A influência da localização geográfica deve ser também considerada, uma vez que a associação entre VHC e LPB parece ser mais prevalente no Japão, Estados Unidos da América e sul da Europa [12].

O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo clínico longitudinal observacional envolvendo portadores de LPB ou infectados por VHC a fim de verificar uma possível relação entre essas doenças. Além disso, averiguar o efeito da idade, sexo, doenças sistêmicas e fármacos utilizados por esses pacientes na ocorrência de LPB ou infecção por VHC.

5.3. Materiais e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo/RS, Brasil (protocolo nº 050/2009) e pelo Grupo de Pesquisa do Hospital São Vicente de Paulo de Passo Fundo/RS, Brasil (ANEXO 2). Todos os sujeitos que participaram do presente estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 3).

Foi desenvolvido um estudo clínico longitudinal observacional em dois grupos de pacientes pertencentes à macro-região da 6ª Coordenadoria Regional de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, localizada em Passo Fundo, região Sul do Brasil, composta por 58 municípios. Os grupos de estudo foram:

- Grupo VHC+ (1): pacientes tratados no Hospital São Vicente de Paulo de março de 2010 a junho de 2011, que foram submetidos a uma entrevista clínica e a três exames físicos intra/extrabucais periódicos semestrais (1ª, 2ª e 3ª consultas) (ANEXO 4). Se tais pacientes apresentassem lesões compatíveis com LPB em uma dessas consultas, uma biópsia intrabucal para diagnóstico histopatológico das lesões era realizada.

- Grupo LPB+ (2): pacientes tratados na Clínica de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo de março de 2010 a junho de 2011, os quais foram submetidos a uma entrevista clínica, exame sorológico anti-VHC e a três exames clínicos periódicos semestrais intra/extrabucais (1ª, 2ª e 3ª consultas). Tais pacientes foram submetidos a biópsias intrabucais para diagnóstico histopatológico do LPB.

Para todos os pacientes (Grupos 1 e 2), idade, sexo, doenças sistêmicas e fármacos utilizados foram registrados para posterior avaliação.

Os critérios de inclusão/exclusão dos dois grupos são descritos a seguir:

Para o Grupo VHC+: Inclusão - portadores de VHC confirmados por meio do método *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e VHC-RNA; pacientes que nunca haviam sido tratados com interferon e ribavirina (“virgens” de tratamento); pacientes com condições hematológicas (trombócitos acima de 50.000/mm³ de sangue).

Exclusão – pacientes com hepatite C confirmada apenas pelo método ELISA; pacientes que já haviam sido tratados com interferon e ribavirina; pacientes sem condições hematológicas (trombócitos abaixo de 50.000/mm³ de sangue).

Para o Grupo LPB+: Inclusão – pacientes com LPB reticular/em placa clínica e histopatologicamente confirmado.

Exclusão – pacientes com restaurações dentárias metálicas ou utilizando fármacos que pudessem desencadear lesões liquenóides.

Para realizar as análises clínicas e histopatológicas das lesões de LPB, os critérios propostos por Krutchkoff et al [13] e van der Meij e van der Waal [14] foram utilizados. Um microscópio de luz (Olympus® BX 50, Olympus Corporation of the Americas, Center Valley, PA, EUA) foi utilizado para analisar os espécimes teciduais, corados pelo método hematoxilina-eosina (H.E.).

Os dados obtidos foram analisados por estatística descritiva de frequência e teste Qui-quadrado de Pearson. O nível de significância foi de 95% ($p < 0,05$). Para tanto, foi utilizado o programa computacional SPSS® versão 13.0.

5.4. Resultados

Os resultados mais significativos são apresentados a seguir. A Tabela 1 mostra os dados epidemiológicos referentes aos dois grupos estudados.

Tabela 1 – Descrição dos dados epidemiológicos referentes aos dois grupos estudados

| | VHC+ (n = 33) | | LPB+ (n = 18) | | TOTAL (n = 51) | |
|------------------------|----------------|----|----------------|----|----------------|----|
| | F | M | F | M | F | M |
| SEXO | 21 | 12 | 12 | 06 | 33 | 18 |
| MÉDIA DE IDADE (±D.P.) | 52,21 (±13,48) | | 53,72 (±16,73) | | 52,97 (±14,56) | |

No Grupo LPB+ (2), todos os pacientes apresentaram lesões clínicas e histopatologicamente compatíveis com LPB reticular/em placa, enquanto no Grupo VHC+ (1), apenas uma paciente apresentou LPB. Mesmo assim, foi notada relação significativa entre a presença de infecção por VHC e a manifestação de LPB (Teste Qui-quadrado de Pearson – 46,852, $p = 7,65 \times 10^{-12}$).

Nenhum dos 33 pacientes pertencentes ao Grupo VHC+ (1), haviam se submetido ou estavam se submetendo a tratamento para a doença durante o período de doze meses em que o estudo foi realizado.

Durante o acompanhamento clínico não foi notada a presença de LPB no Grupo VHC+, com exceção da paciente que apresentava a enfermidade desde o exame inicial. Para o Grupo LPB+ (2), notou-se que 16 pacientes apresentaram a mesma situação clínica das lesões observadas no início do estudo e dois apresentaram remissão completa das lesões, uma seis e outra doze meses após o diagnóstico, embora não fossem usuários de fármacos para tratar o LPB.

Pacientes com idade entre 43 e 60 anos foram os mais acometidos pela infecção por VHC (Grupo VHC+ – D.P. ±4,99 anos) e pelo LPB (Grupo LPB+ - D.P. ±4,55 anos) (Fig. 1), no entanto não foi notada relação significativa entre idade e presença de infecção por VHC ou LPB (Teste Qui-quadrado de Pearson – 0,127 e 0,158, $p = 0,938$ e 0,924 para os Grupos 1 e 2, respectivamente). Também não foi notada relação

significativa entre sexo e presença de infecção por VHC ou LPB (Teste Qui-quadrado de Pearson – 0,047 e 0,183, $p = 0,829$ e $0,669$ para os Grupos 1 e 2, respectivamente).

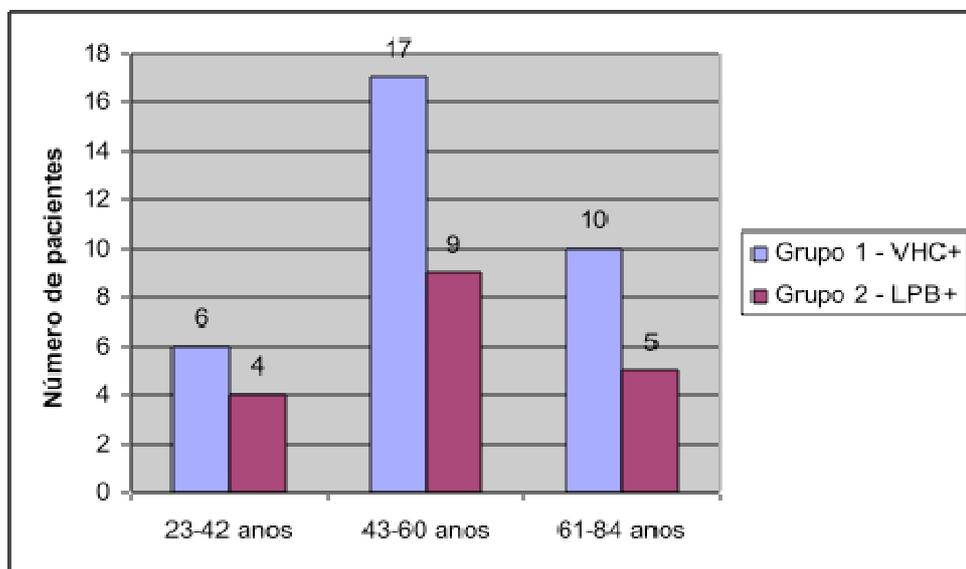


Figura 1 – Número de pacientes nos Grupos VHC+ (colunas azuis) e LPB+ (colunas vermelhas) por faixa etária

A Figura 2 mostra que a hipertensão e a diabetes foram as doenças sistêmicas mais frequentes nos pacientes dos Grupos VHC+ e LPB+. Foi notado que não houve relação significativa entre doenças sistêmicas e a presença de VHC ou LPB (Teste Qui-quadrado de Pearson – 6,250 e 6,975, $p = 0,856$ e $0,801$ para os Grupos 1 e 2, respectivamente).

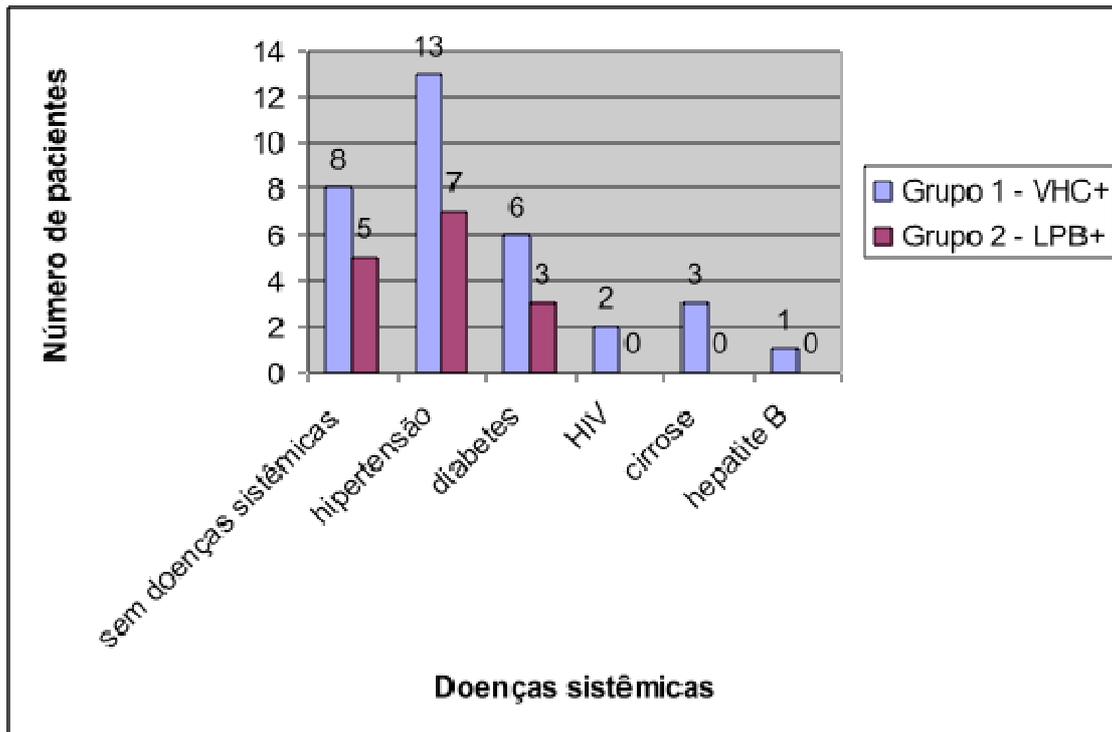


Figura 2 – Número de pacientes com doenças sistêmicas nos Grupos VHC+ (colunas azuis) e LPB+ (colunas vermelhas)

Dos 18 pacientes avaliados no Grupo LPB+, 10 (55,5%) reportaram estar "emocionalmente abalados", com ansiedade ou depressão. Da mesma forma, 17 (51,5%) dos 33 pacientes pertencentes ao Grupo VHC+, incluindo a única paciente que apresentava LPB, se consideravam pessoas "emocionalmente abaladas". No entanto, não foi notada associação significativa entre o relato de estresse/ansiedade pelos pacientes e a presença de VHC ou LPB (Teste Qui-quadrado de Pearson – 6,250 e 6,975, $p = 0,856$ e $0,801$ para os Grupos 1 e 2, respectivamente).

A Figura 3 mostra que os fármacos antihipertensivos foram os mais utilizados em ambos os grupos de pacientes. Contudo, não foi notada relação significativa entre o uso de fármacos e a presença de VHC ou LPB (Teste Qui-quadrado de Pearson – 14,145 e 13,772, $p = 0,225$ e $0,246$ para os Grupos 1 e 2, respectivamente).

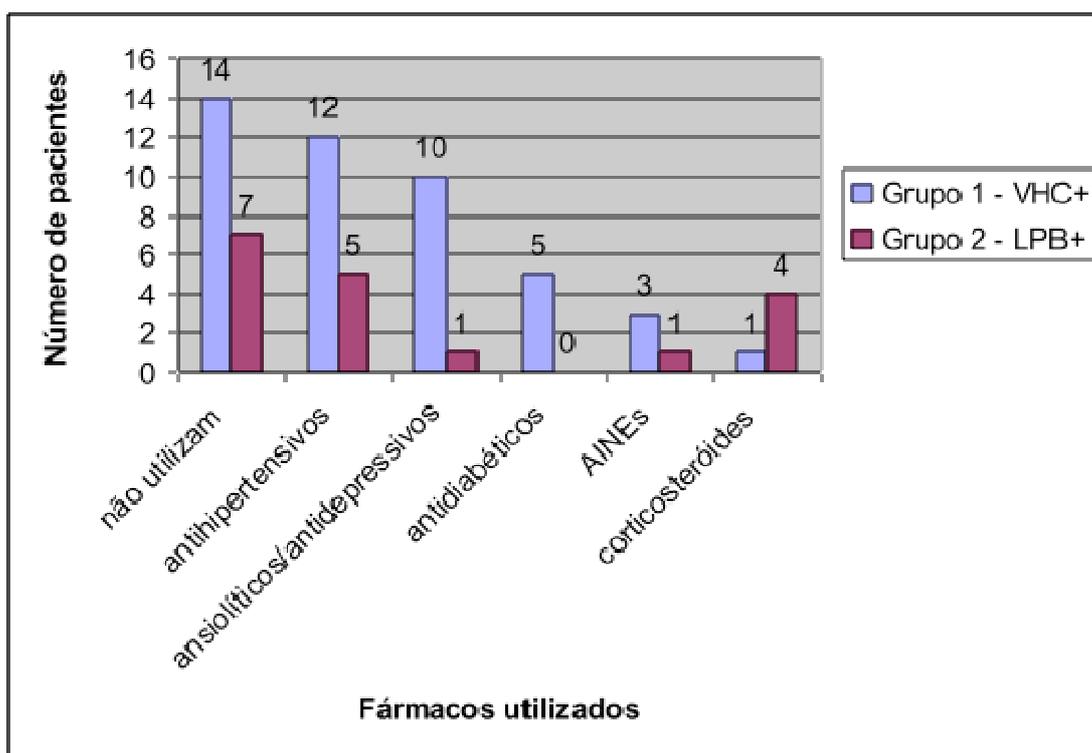


Figura 3 – Número de pacientes e os fármacos utilizados no Grupo VHC+ (colunas azuis) e Grupo LPB+ (colunas vermelhas)

5.5. Discussão

O presente estudo avaliou um grupo de 33 pacientes VHC+ “virgens” de tratamento com interferon e/ou ribavirina em três diferentes momentos ao longo de um ano. Considerando a amostra estudada e o tempo de acompanhamento clínico dos pacientes (12 meses), notou-se que na macro-região da 6ª Coordenadoria de Saúde do RS, sediada Passo Fundo, foi observada relação estatística entre a infecção por VHC e a ocorrência de LPB, embora apenas uma paciente do Grupo VHC+ (3,03%) tenha apresentado lesões bucais de líquen plano. Este índice sugere que a população VHC+ estudada neste trabalho apresenta uma prevalência maior de LPB do que os pacientes sem o vírus, a qual, de acordo com Grossmann et al [8] e Birkenfeld et al [4], varia de 0,1 a 2%.

Talvez os achados da presente pesquisa no sentido de ter mostrado uma associação significativa entre LPB e VHC teriam sido diferentes se o acompanhamento clínico dos pacientes fosse maior, o que se constitui em intenção dos pesquisadores em estudos futuros. Assim, clinicamente, os achados do presente estudo se comparam àqueles de Michele et al [15] e Grossmann et al [8], que concluíram que não existe relação clara entre LPB e infecção crônica por VHC.

Os achados de estudos epidemiológicos variam consideravelmente conforme a região geográfica. No Japão, Itália, Nigéria e Tailândia [11,16-18], a prevalência de infecção por VHC em portadores de LPB variou de 8,33% a 60%, estatisticamente maior do que os respectivos controles. Contudo, isto não foi confirmado na Holanda, Alemanha, Sérvia e Sudeste do Brasil [19-22] onde não foi notada diferença no índice de infecção por VHC entre os pacientes com LPB e a população em geral.

Carrozzo [10] reportou que os pacientes VHC+ desenvolvem lesões de LPB tardiamente, provavelmente devido a um processo patológico imunológico; contudo, isto ainda não está claramente definido. Uma das limitações do presente estudo é que foi impossível determinar o momento da infecção por VHC, uma vez que os participantes do estudo eram assintomáticos e descobriram serem portadores do VHC em exames de rotina.

No presente estudo foram incluídos apenas pacientes “virgens” de tratamento com interferon e ribavirina porque não foi possível, durante doze meses, interceptar pacientes que iniciaram tratamento antiviral. Assim, este estudo objetivou determinar se a infecção por VHC influencia na origem do LPB.

Carbone et al [23] afirmaram que o LPB apresenta um curso crônico, com uma porcentagem expressiva de pacientes mostrando cura completa e definitiva (2,5 a 17%). Tal afirmação parece explicar os achados do presente estudo, uma vez que nas consultas

de 6 e 12 meses, 2 de 18 pacientes com LPB pertencentes ao Grupo LPB+ apresentaram remissão completa das lesões. Por outro lado, 32 dos 33 pacientes pertencentes ao Grupo VHC+ não mostraram sinais clínicos de LPB durante o acompanhamento clínico.

Os resultados do presente estudo são similares àqueles de Bermejo-Fenoll et al [9], que encontraram uma média de idade de 56,35 anos para os portadores de LPB. Da mesma forma, em relação à infecção por VHC, o Ministério da Saúde do Brasil informa que em 2009, o diagnóstico foi mais frequente em pacientes de 50 a 59 anos [24]. Lodi et al [11] reportaram que muitos pacientes com LPB possuíam 50 anos ou mais e que a alta frequência de soropositividade para o VHC encontrada em grupos de pacientes com LPB foi apenas uma coincidência, uma vez que ambas as enfermidades afetam significativamente pacientes nessa faixa etária, sem relação causal.

Para Eisen [25], fatores predisponentes resultam em exacerbação do LPB. Tais fatores incluem estresse, alimentos condimentados, procedimentos odontológicos, doenças sistêmicas, fármacos e má higiene bucal. No presente estudo as doenças sistêmicas mais reportadas pelos pacientes de ambos os grupos foram hipertensão e diabetes. Mesmo assim, notou-se que não houve associação significativa entre doenças sistêmicas e presença de LPB ou infecção por VHC. Embora não tenha sido encontrada associação significativa, 6 pacientes do Grupo VHC+ e 3 do Grupo LPB+ sofriam de diabetes. Estudos prévios sugeriram que pacientes com líquen plano apresentam diabetes *melittus* mais frequentemente do que a população geral [26,27]. Contudo, Jing-Ling et al [28] não suportam tal achado.

Não houve relação significativa entre utilização de fármacos e presença de VHC ou LPB. Corroborando com isso, a única paciente que apresentava LPB no Grupo VHC+ não fazia uso de fármacos, descartando a hipótese de que a lesão tenha sido causada pelos mesmos. Mesmo assim, os antihipertensivos foram a classe de fármacos

mais utilizada em ambos os grupos estudados. De acordo com a literatura, existem alguns fármacos que são classicamente conhecidos por induzir LPB, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) [29]. Também existem evidências suficientes de que os β -bloqueadores e outros fármacos desempenhem um papel significativo na origem do LPB [12,30]. Para Salem et al [31], o exato mecanismo de patogênese do líquen plano induzido por fármacos é incerto. Um mecanismo sugerido é a teoria da formação antigênica: os fármacos podem induzir dano aos queratinócitos com exposição de zona da membrana basal previamente não exposta, levando à formação de anticorpos.

De acordo com estudos prévios, o estresse é reconhecido como um importante fator etiológico do LPB. Embora sinais de depressão e altos níveis de ansiedade sejam comumente encontrados em portadores de LPB [32,33], não foi ainda determinado se as variações psicológicas observadas são um fator etiológico direto ou apenas uma consequência do LPB, uma vez que a doença causa desconforto que pode afligir os pacientes, causando estresse. Apesar disso, no presente estudo, não foi utilizado um método validado para diagnóstico das distúrbios emocionais. Os pacientes responderam apenas negativamente ou afirmativamente se eram ansiosos, deprimidos e/ou estressados. Sugere-se que pesquisas posteriores utilizem métodos validados cientificamente para o diagnóstico de distúrbios emocionais. Ressalta-se ainda que a hepatite C, por si só, também pode se tornar um fator impactante e causador de distúrbios emocionais e desempenhar um papel de suporte na etiologia do LPB em tais pacientes.

5.6. Conclusão

A relação entre LPB e infecção por VHC, apesar de ter sido estatisticamente verificada na população da macro-região de Passo Fundo/RS, sul do Brasil, durante os 12 meses de acompanhamento clínico dos pacientes, ainda necessita de maiores evidências clínicas para sua real comprovação. A idade, sexo, doenças sistêmicas e fármacos utilizados pelos pacientes não mostraram relação significativa com a presença de LPB ou infecção por VHC.

5.7. Referências

1. Grossmann SMC, Teixeira R, Aguiar MCF, Moura MDG, Carmo MAV (2009) Oral mucosal conditions in chronic hepatitis C Brazilian patients: a cross-sectional study. *J Public Health Dentistry* 69(3):168-175
2. Nagao Y, Sata M (2004) Hepatitis C virus and lichen planus. *J Gastroenterol Hepatol* 19(10):1101–1113
3. Randazzo AR, Amormino SAF, Martins CR (2005) Lichen planus and hepatitis C: a literature review. *Rev Clín Pesq Odontol* 1(3):37-40
4. Birkenfeld S, Dreiherr J, Weitzman D, Cohen AD (2010) A study on the association with hepatitis B and hepatitis C in 1557 patients with lichen planus. *JEADV* 1-5. doi: 10.1111/j.1468-3083.2010.03809.x
5. Vachiramon V, Suchonwanit P, Thadanipon K (2010) Bilateral linear lichen planus pigmentosus associated with hepatitis C virus infection. *Case Rep Dermatol* 2(3):169-172
6. Rebora A, Patri P, Rampini E, Crovato F, Ciravegna G, Rebora A et al. (1978) Erosive lichen planus and cirrhotic hepatitis. *Italian General Rev Dermatol* 15(2):123–131
7. Chainani-Wu N, Lozada-Nur F, Terrault N (2004) Hepatitis C virus and lichen planus: A review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98(2):171-183
8. Grossmann SMC, Aguiar MCF, Teixeira R, Carmo MAV (2007) Oral lichen planus and chronic hepatitis C – a controversial association. *Am J Clin Pathol* 127(5):800-804

9. Bermejo-Fenoll A, Sánchez-Siles M, López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Salazar-Sánchez N (2010) A retrospective clinicopathological study of 550 patients with oral lichen planus in south-eastern Spain. *J Oral Pathol & Medicine* 39(6):491-496
10. Carrozzo M (2008) Oral diseases associated with hepatitis C virus infection. Part 2: lichen planus and other diseases. *Oral Dis* 14(3):217–228
11. Lodi G, Giuliani M, Majorana A, Sardella A, Bez C, Demarosi F et al. (2004) Lichen planus and hepatitis C virus: a multicentre study of patients with oral lesions and a systematic review. *Brit J Dermatol* 151(6):1172-1181
12. Carrozzo M, Thorpe R (2009) Oral lichen planus: a review. *Minerva Stomatol* 58(10):519-537
13. Krutchkoff D, Cutler L, Laskowski S (1978). Oral lichen planus: the evidence regarding potential malignant transformation. *J Oral Pathol Med* 7:1–7.
14. van der Meij EH, van der Waal I (2003). Lack of clinicopathological correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available criteria and suggestion for modification. *J Oral Pathol Med* 32: 507–512.
15. Michele G, Carlo L, Mario MC, Giovanni L, Pasquale M, Alessandra M (2007) Hepatitis C virus chronic infection and oral lichen planus: an Italian case-control study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 19(8):647-652
16. Nagao Y, Sata M, Tanikawa K, Itoh K, Kameyama T (1995) Lichen planus and hepatitis C virus in the northern Kyushu region of Japan. *Eur J Clin Invest* 25(12):910–914
17. Carrozzo M, Gandolfo S, Carbone M, Colombatto P, Broccoletti R, Garzino-Demo P (1996) Hepatitis C virus infection in Italian patients with oral lichen planus: a prospective case-control study. *J Oral Pathol Med* 25(10):527–533
18. Figueiredo LC, Carrilho FJ, de Andrade HF, Migliari DA (2002) Oral lichen planus and hepatitis C virus infection. *Oral Dis* 8(1):42–46
19. van der Meij EH, van der Waal I (2000) Hepatitis C virus infection and oral lichen planus: a report from the Netherlands. *J Oral Pathol Med* 29(6):255–258
20. Friedrich RE, Heiland M, El-Moawen A, Dogan A, von Schrenck T, Löning T (2003) Oral lichen planus in patients with chronic liver diseases. *Infection* 31(6):383–386
21. Bokor-Bratic M (2004) Lack of evidence of hepatic disease in patients with oral lichen planus in Serbia. *Oral Dis* 10(5):283–286
22. Cunha KS, Manso AC, Cardoso AS, Paixão JB, Coelho HS, Torres SR (2005) Prevalence of oral lichen planus in Brazilian patients with HCV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100(3):330–333

23. Carbone M, Arduino PG, Carrozzo M, Gandolfo S, Argiolas MR, Bertolusso G et al (2009) Course of oral lichen planus: a retrospective study of 808 northern Italian patients. *Oral Dis* 15(3):235-243
24. Brazil Ministry of Health (2010) Surveillance Secretariat of Health STD, AIDS and Viral Hepatitis. *Epidemiological Bulletin: viral hepatitis*. Ministry of Health, Brasília-DF
25. Eisen D (2002) The clinical features, malignant potential, and systemic association of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol* 46(2):207–214
26. Powell SM, Ellis JP, Ryan TJ, Vickers HR (1974) Glucose tolerance in lichen planus. *Br J Dermatol* 91(1):73-75
27. Lowe NJ, Cudworth AG, Clough SA, Bullen MF (1976) Carbohydrate metabolism in lichen planus. *Br J Dermatol* 95(1):9-12
28. Jing-Ling X, Ming-Wen F, Shuo-Zhi W, Xin Ming C, Yuan L (2005) A clinical study of 674 patients with oral lichen planus in China. *J Oral Pathol Med* 34(8):467–472
29. Potts AJ, Hamburger J, Scully C (1987) The medication of patients with oral lichen planus and the association of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with erosive lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 64(5):541-543
30. Thompson DF, Skaehill PA (1994) Drug-induced lichen planus. *Pharmacotherapy* 14(5):561-571
31. Salem CB, Chenguel L, Ghariani N, Denguezli M, Hmouda H, Bouraoui K (2008) Captopril-induced lichen planus pemphigoides. *Pharmacoepidemiol and drug safety* 17(7):722-724
32. Koray M, Dülger O, Ak G, Horasanli S, Uçok A, Tanyeri H et al (2003) The evaluation of anxiety and salivary cortisol levels in patients with oral lichen planus. *Oral Dis* 9(6):298-301
33. Ivanovski K, Nakova M, Warburton G, Pesevska S, Filipovska A, Nares S et al (2005) Psychological profile in oral lichen planus. *J Clin Periodontol* 32(10):1034-1040

6. ARTIGO III ³

João Paulo De Carli^a, Paulo Henrique Couto Souza^b

^a Faculdade de Odontologia, Universidade de Passo Fundo, 99052-900, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Escola de Saúde e Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil

Avaliação da atividade proliferativa celular em pacientes com Líquen Plano Bucal e Hepatite C por meio do método AgNOR

6.1. Resumo

Introdução: A detecção das Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) em lesões bucais sugere que este marcador pode refletir o índice de proliferação celular. O Líquen Plano Bucal (LPB) é uma doença crônica mucocutânea que frequentemente envolve a cavidade oral. Estudos recentes confirmaram uma associação entre LPB e infecção pelo Vírus da Hepatite C (VHC). **Objetivo:** O propósito deste estudo foi avaliar o potencial proliferativo celular das lesões de LPB de pacientes sem VHC por meio do método AgNOR, comparando-o ao potencial proliferativo celular da mucosa bucal normal de pacientes contaminados por VHC, tratados ou não com interferon e ribavirina. **Materiais e Métodos:** Um estudo transversal foi realizado para investigar a mucosa bucal de 4 grupos: 20 pacientes VHC+ sem sinais clínicos de LPB (10 pacientes que nunca foram tratados para infecção por VHC – GRUPO 1 – e 10 que estavam sob tratamento com interferon e ribavirina – GRUPO 2); 15 pacientes com LPB reticular histopatologicamente confirmado, sem VHC – GRUPO 3, e 15 doadores de sangue sem infecção por VHC e sem sinais clínicos de LPB (GRUPO 4 – Grupo de Controle). O material celular de todos os grupos foi coletado pela técnica da citologia em base líquida. Então, o material sedimentado de cada paciente foi depositado numa lâmina microscópica e impregnado pelo método de impregnação pela prata das regiões organizadoras nucleolares (AgNOR). A contagem das NORs foi realizada em 100 núcleos celulares epiteliais por paciente por meio do programa Image Tool[®]. **Resultados:** O teste Tukey HSD foi utilizado para comparar o valor médio de NORs entre os grupos e mostrou que a mucosa bucal dos pacientes VHC+ previamente tratados com fármacos anti-VHC (GRUPO 2) apresentou maior número médio de NORs por núcleo em relação aos outros ($p < 0,05$). **Conclusões e Relevância Clínica:** O tratamento anti-VHC pode estar relacionado ao aumento da atividade proliferativa celular da mucosa bucal, aventando uma possível relação entre LPB e pacientes VHC+ previamente tratados com interferon e ribavirina.

Palavras-chave: Hepatite C; Líquen Plano; Nucléolo Celular; Proliferação Celular.

* Autor correspondente:

Paulo Henrique Couto Souza

Professor Titular do Curso de Odontologia da Escola de Saúde e Biociências da PUCPR.

Rua Imaculada Conceição, 1555, 80215-901 - Curitiba/PR, Brasil. Tel.: (5541) 3271 2565 / Fax: (5541) 3271 1405

E-mail: couto.s@pucpr.br

³ Nas normas do Clinical Oral Investigations (ANEXO 1).

6.2. Introdução

O Líquen Plano é uma doença mucocutânea de etiologia incerta que acomete a mucosa bucal [1]. A relação entre o Líquen Plano Bucal (LPB) e a infecção pelo Vírus da Hepatite C (VHC) tem sido amplamente estudada [2]. Tal relação sugere que o VHC pode ser um fator etiológico do LPB [3]. Assim, a análise de pacientes com LPB e infectados por VHC seria útil para esclarecer a relação entre estas doenças.

As Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) são estruturas presentes dentro dos nucléolos de células em interfase e dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 nas células humanas em divisão [4]. Estudo prévio [5] aplicou o método AgNOR em material de pacientes com LPB, queratose bucal e mucosa bucal normal. Como resultado, os autores reportam que o número de NORs dos queratinócitos foi significativamente maior em pacientes com LPB quando comparados aos demais grupos.

Apesar de muitos estudos clínicos terem demonstrado uma associação entre a infecção por VHC e a presença de LPB [6-9], não foram encontrados trabalhos relacionando a condição nucleolar da mucosa bucal de pacientes com VHC e LPB.

Gandolfo et al [10] avaliaram 402 pacientes com LPB e encontraram que os infectados por VHC apresentaram uma chance três vezes maior de desenvolver câncer bucal quando comparados aos pacientes não infectados. Tais resultados não apenas reforçam as suspeitas acerca do potencial de transformação maligna do LPB, bem como chamam atenção para a participação do VHC no processo de cancerização.

Assim, o presente estudo objetivou avaliar o potencial proliferativo celular das lesões de LPB de pacientes sem VHC e o potencial proliferativo celular da mucosa bucal normal de pacientes com VHC, tratados ou não, por meio do método AgNOR.

6.3. Materiais e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo/RS/Brasil (protocolo nº 266/2011) e pelo Grupo de Pesquisa do Hospital São Vicente de Paulo de Passo Fundo/RS/Brasil (ANEXO 2). Todos os sujeitos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para participar do estudo (ANEXO 3).

Realizou-se um estudo histoquímico transversal observacional (método AgNOR) acerca da mucosa bucal de quatro grupos de pacientes, conforme descrito a seguir:

GRUPOS 1 e 2 – Vinte pacientes VHC+, confirmados por exame anti-VHC (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) e VHC-RNA, tratados no Hospital São Vicente de Paulo de Passo Fundo/RS/Brasil, sem sinais clínicos de LPB. Neste grupo, 10 pacientes nunca tinham sido tratados para a infecção por VHC e 10 estavam sob tratamento com interferon e ribavirina por um período mínimo de três meses;

GRUPO 3 – Quinze pacientes com LPB reticular, confirmado clínica e histopatologicamente, atendidos na Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo/RS/Brasil. Tais pacientes não eram infectados por VHC, o que foi verificado pelo exame anti-VHC;

GRUPO 4 – Quinze acadêmicos/professores da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo/RS/Brasil, doadores de sangue, sem infecção por VHC, confirmado pelo teste anti-VHC, e sem sinais clínicos de LPB (Grupo de Controle).

Os critérios de inclusão para o estudo foram: 1) pacientes com Hepatite C comprovada por meio dos testes ELISA e VHC-RNA (para os Grupos VHC+), 2)

pacientes com LPB clínica e histopatologicamente confirmado (para o Grupo LPB+), e 3) pacientes sem infecção por VHC ou LPB (para o Grupo de Controle).

Os critérios de exclusão foram: 1) pacientes com Hepatite C confirmada apenas por meio do teste ELISA (para os Grupos VHC+), 2) pacientes com restaurações dentárias metálicas ou utilizando fármacos que pudessem causar lesões liquenóides e 3) pacientes com condições hematológicas inadequadas (trombócitos abaixo de $50.000/\text{mm}^3$ de sangue) (para o Grupo LPB+), 4) pacientes com infecção por VHC ou LPB (para o Grupo de Controle).

Para realizar as análises clínicas e histopatológicas das lesões de LPB, os critérios propostos por Krutchkoff et al [11] e van der Meij e van der Waal [12] foram utilizados.

As amostras celulares a serem impregnadas pelo método AgNOR foram coletadas pela técnica de citologia esfoliativa em base líquida. Para tanto, todos os pacientes foram inicialmente instruídos a realizar um bochecho com água para remover possíveis resíduos alimentares.

A coleta das células foi realizada com o kit DNA-Citoliq[®] (Digene Corporation, Gaithersburg, EUA), contendo um meio de conservação celular denominado Universal Collection Medium (UCM). Tal kit é composto por um frasco contendo 1 mL de UCM e uma escova de cabo longo.

A coleta das células mucosas bucais foi realizada pela aplicação da escova e rotação da mesma no sentido horário (cinco voltas). Após, a escova foi colocada no frasco contendo UCM, permanecendo imersa no líquido até o processamento final. Depois da coleta, o frasco era agitado por 30 segundos para homogeneizar o material, o qual permanecia à temperatura ambiente (local seco, fresco e protegido da luz) por um período menor do que três semanas, seguindo as recomendações do fabricante.

O processamento do material consistiu em tripla centrifugação (1000 r.p.m.), sendo a primeira apenas com UCM e a segunda e terceira com o material sedimentado misturado com uma solução fixadora de ácido acético/metanol (3:1). Após, o material sedimentado de cada paciente era depositado numa lâmina microscópica e impregnado pelo método AgNOR.

A técnica AgNOR foi desenvolvida de acordo com Ploton et al [13] e Nunes et al [14], com algumas modificações, conforme segue:

1) Obtenção do material sedimentado por centrifugação e deposição numa lâmina microscópica; 2) Preparação das soluções de prata para a técnica AgNOR, que consistem em:

- solução A: 50 mL de água de Milli-Q, 0,5 mL de ácido fórmico e 1g de gelatina; esta solução foi deixada numa estufa à temperatura de 45°C por 1h antes da incubação;

- solução B: 10 mL de água destilada e 5g de nitrato de prata.

3) As soluções A e B foram misturadas e depositadas sobre o material celular que estava sobre a lâmina, permanecendo por 30 minutos numa temperatura de 45°C e posteriormente realizou-se o processo de secagem.

A contagem das NORs foi realizada em 100 núcleos celulares epiteliais por lesão. Dois observadores analisaram independentemente, de forma cega, as células impregnadas pela prata em microfotografias obtidas com uma câmera digital (Canon® Power Short A620, Canon do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) acoplada a um microscópio óptico (Olympus® BX 50, Olympus Corporation of the Americas, Center Valley, PA, EUA) com objetiva de imersão (1000×). Para obter as microfotografias, todas as lâminas referentes a cada paciente foram analisadas horizontalmente da esquerda para a direita e foram capturados os núcleos das primeiras 100 células nucleadas, bem fixadas

e não sobrepostas. A contagem das NORs foi realizada utilizando o programa Image Tool[®] versão 3.0 (Department of Dental Diagnostic Science at The University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA), no qual o núcleo de cada célula era “recortado” por meio da ferramenta "save selection as" sendo aumentado para melhor visualização (Fig. 1). As informações de cada caso foram relacionadas entre os grupos pelo teste Tukey HSD (nível de significância de 95% - $p < 0,05$). As concordâncias inter e intra-observador foram realizadas pelo erro de Dahlberg.

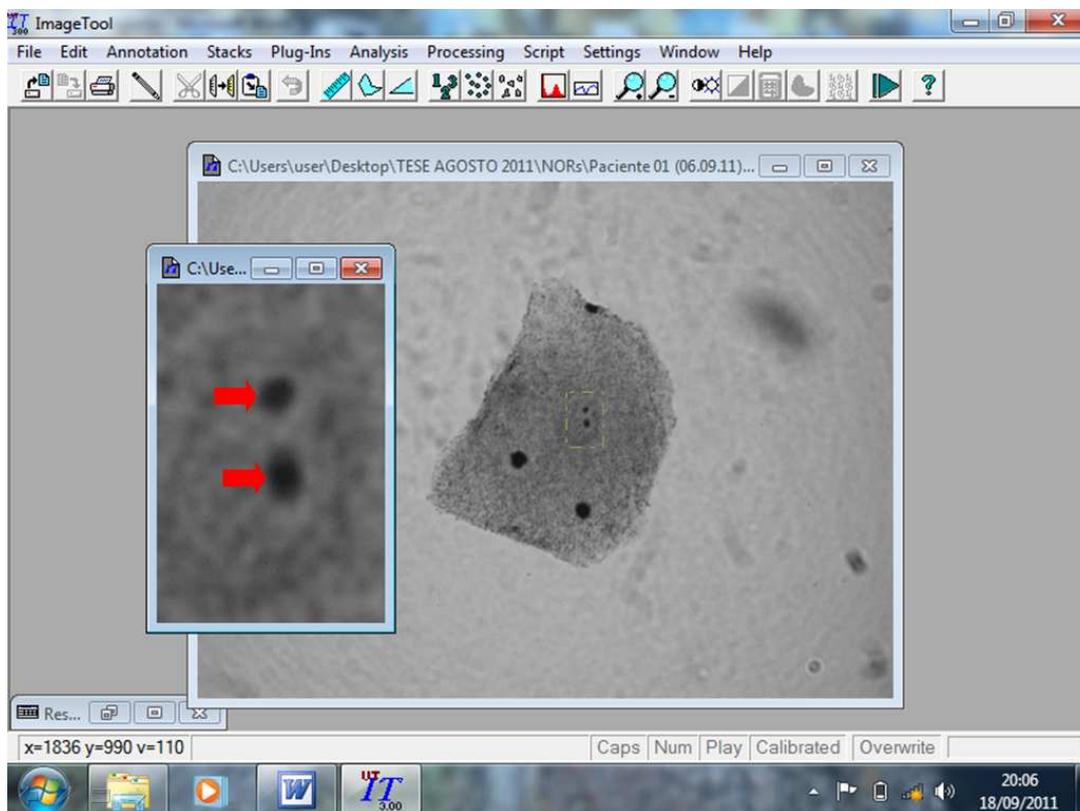


Figura 1 – Imagem do núcleo "recortada" e aumentada para contagem das NORs (setas) (AgNOR, 1000×, arquivo pessoal)

6.4. Resultados

As NORs de 50 pacientes foram contadas (100 núcleos de cada paciente), cujas características epidemiológicas são descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos dados epidemiológicos referentes a todos os grupos estudados e diferença estatística do número médio de NORs determinada pelo teste Tukey HSD

| Grupo | N | Média de NORs (em 100 núcleos celulares) (\pm D.P.) | Sexo | | Média de idade (\pm D.P.) |
|----------------------------|----|--|------|----|------------------------------|
| | | | F | M | |
| VHC+ não tratado (Grupo 1) | 10 | 3,19 ^a (\pm 0,46) | 8 | 2 | 49,30 (\pm 11,91) |
| VHC+ tratado (Grupo 2) | 10 | 4,08 ^b (\pm 0,59) | 4 | 6 | 53,10 (\pm 11,32) |
| LPB+ (Grupo 3) | 15 | 3,30 ^a (\pm 0,70) | 11 | 4 | 53,60 (\pm 18,43) |
| Controle (Grupo 4) | 15 | 3,12 ^a (\pm 0,44) | 11 | 4 | 23,53 (\pm 5,78) |
| TOTAL | 50 | 3,38 (\pm 0,65) | 34 | 16 | 44,88 (\pm 18,75) |

^{a,b} Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos

Em relação às avaliações inter e intra-examinadores, nota-se que o erro de Dahlberg não excedeu 0,03% para ambas as comparações, indicando que os avaliadores repetiram as contagens com elevada confiabilidade para a variável NORs em 100 núcleos celulares [15,16] (Tab. 2).

Tabela 2 – Variância total, variância de erro, erro de Dahlberg, coeficiente de confiabilidade de Pearson e coeficiente de correlação para a variável NORs em 100 núcleos celulares

| NORs em 100 núcleos | Variância total St^2 | Variância de erro Se^2 | Erro de Dahlberg (%) | Coeficiente de confiabilidade (%) | Coeficiente de correlação (%) |
|---------------------------------|------------------------|--------------------------|----------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| Concordância intra-examinador | 0,863859 | 0,000185 | 0,021416 | 99,978584 | 99,980355 |
| Concordância Inter-examinadores | 0,869192 | 0,000116 | 0,013346 | 99,986654 | 99,986396 |

Os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram aplicados ao número médio de NORs de 100 núcleos para os 50 pacientes e indicaram

distribuição normal dos dados, uma vez que os valores de p foram maiores do que 0,05. Além disso, o teste de Levene mostrou homogeneidade de variâncias entre os grupos (valor do teste de Levene = 1,3739; $p = 0,2626$).

Ao se aplicar o teste “*between-subjects effects*” (ANOVA) à média de NORs em 100 núcleos celulares obtida de cada paciente, observou-se um p -valor = 0,00084 ($F = 6,603$), o qual indicou que a variável NORs apresenta diferença entre os grupos (poder do teste de 96,08%). Após, o teste de comparações múltiplas Tukey HSD foi aplicado e mostrou que a média de NORs no Grupo de pacientes VHC+ previamente tratados foi significativamente maior do que os demais grupos. A Figura 2 mostra as médias de NORs em 100 núcleos celulares de cada caso dos grupos estudados, os intervalos de confiança de tais grupos e suas diferenças estatísticas verificadas pelo teste Tukey HSD.

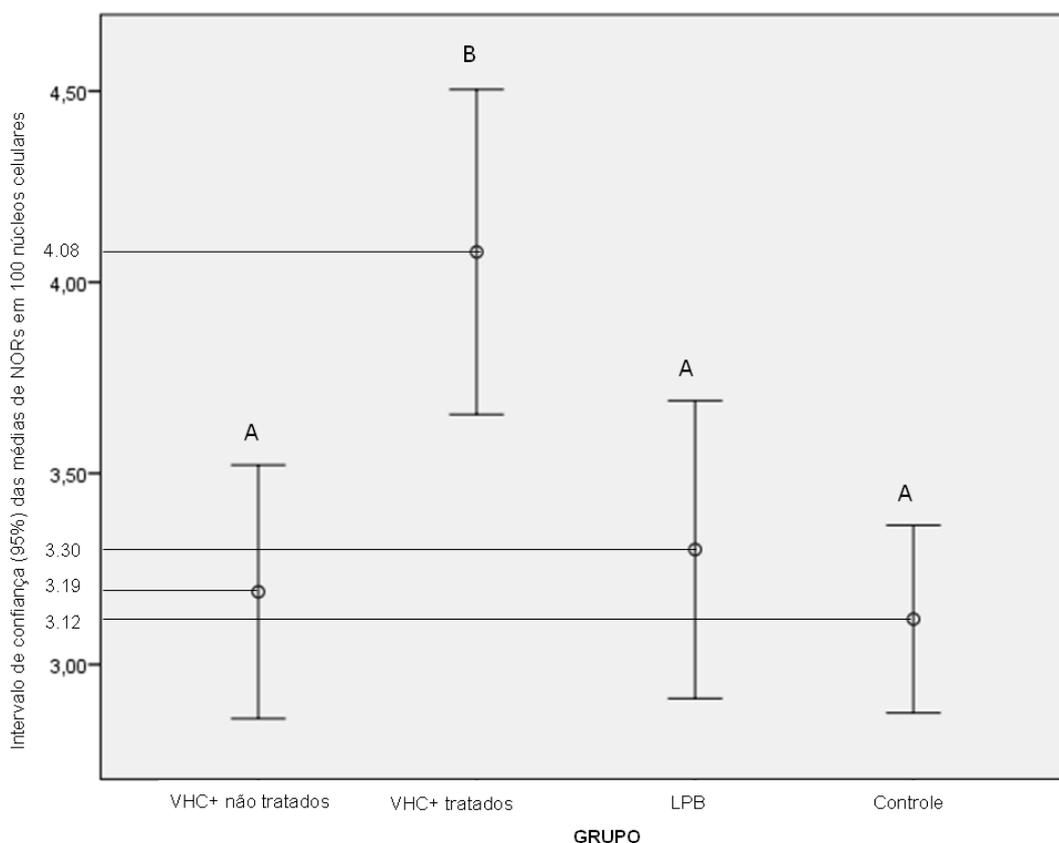


Figura 2 – Intervalos de confiança, médias e diferenças estatísticas dos grupos estudados relativos à média de NORs em 100 núcleos ao nível de 95% (letras diferentes indicam significância estatística distinta)

6.5. Discussão

Considerando os grupos estudados no presente trabalho, foi possível notar que os pacientes VHC+ previamente tratados apresentaram um maior número médio de NORs em relação aos demais grupos, indicando uma maior atividade proliferativa celular, provavelmente devido ao tratamento anti-VHC, o qual pode, segundo estudos clínicos anteriores [17-19], ocasionar manifestações bucais. Contudo, no presente estudo não foi possível determinar quando iniciou a infecção por VHC, uma vez que a hepatite C é frequentemente uma doença silenciosa, retardando seu diagnóstico. Além disso, não foi possível padronizar os pacientes no que diz respeito à duração do tratamento anti-VHC realizado. Assim, cabe ressaltar que tanto o tempo de diagnóstico do VHC quanto a duração do tratamento anti-VHC são fatores que podem ter influência no resultado do número de NORs.

Nossos resultados levam a pensar que a atividade proliferativa celular maior nos pacientes VHC+ previamente tratados pode indicar uma possível relação entre esta última condição e uma das manifestações histopatológicas do LPB, a própria atividade proliferativa celular. Nesse sentido, Schlesinger et al [17] descrevem um caso de LPB iniciado num paciente tratado com interferon alfa-2b e Griffiths et al [18] afirmam que o interferon pode induzir a expressão de antígenos de superfície nos queratinócitos, os quais podem desempenhar um importante papel na origem do líquen plano. Ainda, para Sookoian et al [19], a ribavirina aumenta o risco de reações cutâneas adversas, dentre elas o LPB [20-22].

Strumia et al [23] reportaram que o interferon pode induzir a migração de células T para a pele devido a sua habilidade em estimular os queratinócitos a produzirem interleucina-2. Complementando tal informação, Mourad et al [24]

afirmaram que tumores de medula óssea interleucina-2 positivos apresentaram uma média de NORs significativamente maior do que indivíduos saudáveis, e Simark-Mattsson et al [25] relataram que as células de LPB de todos os casos por eles estudados expressaram mRNA para interleucina-2. Os eventos celulares previamente descritos, somados aos resultados histoquímicos do presente estudo, sugerem que o interferon e/ou a ribavirina podem aumentar o número de NORs por núcleo em células da mucosa bucal, indicando uma possível relação entre tratamento anti-VHC e LPB, fato clínico previamente observado na literatura [17-19,22].

Contudo, tal aumento na atividade proliferativa celular de pacientes VHC+ previamente tratados pode estar também associado a outras doenças bucais, como a displasia ou o carcinoma bucal. Embasando clinicamente tal afirmação, Gandolfo et al [10] avaliaram pacientes com LPB e monitoraram periodicamente. Estes autores reportaram que os pacientes infectados por VHC tiveram uma chance três vezes maior de desenvolver câncer bucal do que os não infectados. Apesar destes resultados, o estudo de Gandolfo et al [10] não mencionou se os pacientes estavam ou não sob tratamento antiviral para VHC, diferentemente do presente estudo. Tais achados chamam atenção para o envolvimento do VHC no aumento da atividade proliferativa celular tecidual.

Nota-se ainda que os carcinomas bucais verrucoso e de células escamosas tem sido descritos em pacientes infectados por VHC, independentemente da presença de LPB [26,27]. Amostras positivas de VHC-RNA foram detectadas em tecidos de câncer bucal [28] e de LPB [29]. Algumas proteínas do VHC, denominadas “*the core*” e “*the non-structural 3 protein*”, podem acelerar o ciclo celular *in vitro* [30,31]. Tal afirmação pode explicar porque os pacientes VHC+ previamente tratados apresentaram uma maior atividade proliferativa celular quando comparados aos demais grupos.

Michele et al [32] avaliaram 165 pacientes afetados por infecção crônica por VHC, acompanhando-os por três anos. Considerando o tipo de terapia antiviral utilizada para curar a hepatite crônica, 36 dos pacientes eram “virgens” de tratamento, e os 129 restantes estavam sob tratamento ou já tinham finalizado o tratamento sem resultado efetivo contra o vírus. Os únicos dois pacientes que apresentaram lesões de LPB estavam realizando tratamento com interferon e ribavirina durante o exame. Os autores afirmaram que os possíveis fatores de risco associados com a presença de LPB indicaram que apenas a infecção crônica por VHC foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Baseados nos resultados do estudo clínico de Michele et al [32] e nos resultados histoquímicos de nosso estudo, pode-se sugerir que é possível que exista uma possível relação entre o tratamento anti-VHC e o LPB.

No presente estudo, o número médio de NORs no grupo de pacientes com LPB (3,30) foi estatisticamente equivalente àquele dos pacientes do Grupo de Controle (3,12) e de pacientes VHC+ sem tratamento prévio (3,19), e menor do que aquele do grupo de pacientes VHC+ previamente tratados (4,08). Este resultado é diferente do obtido por Silva Fonseca e Carmo [5], que afirmaram que o número médio de NORs foi estatisticamente maior em casos de LPB do que em pacientes com mucosa bucal normal. No entanto, estes autores realizaram a impregnação pela prata em tecido fixado em formol, estocado em blocos de parafina, e não em material proveniente de citologia como feito no presente estudo, o que pode ter influenciado a diferença nos resultados.

6.6. Conclusão

O tratamento anti-VHC pode desempenhar um papel na atividade proliferativa celular, justificando-se estudos longitudinais para confirmar uma possível maior prevalência do LPB nos pacientes VHC+ sob tratamento. Entretanto, outras doenças bucais, neoplásicas por exemplo, também podem estar relacionadas com a maior atividade proliferativa celular verificada no presente estudo em pacientes VHC+ sob tratamento antiviral, o que deve ser criteriosamente pesquisado frente à possível relação entre LPB e VHC.

6.7. Referências

1. Grossmann SMC, Aguiar MCF, Teixeira R, Carmo MAV (2007) Oral lichen planus and chronic hepatitis C – a controversial association. *Am J Clin Pathol* 127(5):800-804
2. Randazzo AR, Amormino SAF, Martins CR (2005) Oral lichen planus and hepatitis C: a literature review. *Rev Clín Pesq Odontol* 1(3):37-40
3. Carrozzo M, Thorpe R (2009) Oral lichen planus: a review. *Minerva Stomatol* 58(10):519-37
4. Anastassova-Kristeva M (1977) The nucleolar cycle in man. *J Cell Sci* 25:103-110
5. Silva Fonseca LM, Carmo MAV (2001) Identification of the AgNORs, PCNA and ck16 proteins in oral lichen planus lesions. *Oral Diseases* 7(6):344–348
6. Grossmann SMC, Teixeira R, Aguiar MCF, Moura MDG, Carmo MAV (2009) Oral mucosal conditions in chronic hepatitis C Brazilian patients: a cross-sectional study. *J Public Health Dentistry* 69(3):168-175
7. Bermejo-Fenoll A, Sánchez-Siles M, López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Salazar-Sánchez N (2010) A retrospective clinicopathological study of 550 patients with oral lichen planus in south-eastern Spain. *J Oral Pathol & Medicine* 39(6):491-496
8. Birkenfeld S, Dreiherr J, Weitzman D, Cohen AD (2010) A study on the association with hepatitis B and hepatitis C in 1557 patients with lichen planus. *JEADV* 1-5. doi: 10.1111/j.1468-3083.2010.03809.x

9. Vachiramon V, Suchonwanit P, Thadanipon K (2010) Bilateral linear lichen planus pigmentosus associated with hepatitis C virus infection. *Case Rep Dermatol* 2:169-172
10. Gandolfo S, Richiardi L, Carrozzo M, Brocolletti R, Carbone M, Pagano M et al (2004) Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncology* 40(1):77-83
11. Krutchkoff D, Cutler L, Laskowski S (1978). Oral lichen planus: the evidence regarding potential malignant transformation. *J Oral Pathol Med* 7:1-7.
12. van der Meij EH, van der Waal I (2003). Lack of clinicopathological correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available criteria and suggestion for modification. *J Oral Pathol Med* 32: 507-512.
13. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himer G, Pigeon F, Adnet JJ (1986) Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region of the optical level. *Histochem J* 8(1):5-14
14. Nunes FD, Pinto Jr, DS, Araujo NS et al (1991) Morphological study and optimization of the AgNOR technique. In: Meeting of the Brazilian Society for Dental Research. Proceedings of SBPqO, São Paulo
15. Midtgard J, Björk G, Linder-Aronson S (1974) Reproducibility of cephalometric landmarks and errors of measurements of cephalometric cranial distances. *Angle Orthod* 4(1):56-62
16. Houston WJB (1983) The analysis of error in orthodontic measurements. *Am J Orthod* 83(2):382-390
17. Schlesinger TE, Camisa C, Gay JD, Bergfeld WF (1997) Oral erosive lichen planus with epidermolytic hyperkeratosis during interferon alfa-2b therapy for chronic hepatitis C virus infection. *J Am Acad Dermatol* 36(6):1023-1025
18. Griffiths CE, Voorhees JJ, Nickoloff BJ (1989) Characterization of intracellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. *J Am Acad Dermatol* 20(4):617-629
19. Sookoian S, Neglia V, Castano V, Frider B, Kien MC, Chohela E (1999) High prevalence of cutaneous reactions to interferon alfa plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C virus. *Arch Dermatol* 135(8):1000-1001
20. Manjon-Haces JA, Vazquez-Lopez F, Gomez-Diez S, Hidalgo-García A, Pérez-Alvarez R, Soler-Sánchez T et al (2001) Adverse cutaneous reactions to interferon Alfa-2b plus ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus (letter). *Acta Derm Venereol* 81(3):223

21. Harden D, Skelton H, Smith KJ (2003) Lichen planus associated with hepatitis C virus: no viral transcripts are found in the lichen planus, and effective therapy for hepatitis C virus does not clear lichen planus. *J Am Acad Dermatol* 49(5):847–852
22. Nagao Y, Kawaguchi T, Ide T, Kumashiro R, Sata M (2005) Exacerbation of oral erosive lichen planus by combination of interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Int J Mol Med* 15(2):237–241
23. Strumia R, Venturini D, Boccia S, Gamberini S, Gullini S (1993) UVA and interferon-alfa therapy in a patient with lichen planus and chronic hepatitis C [letter]. *J Dermatol* 32(5):386
24. Mourad WA, Pugh WC, Huh YO, Keating MJ (1994) Cell kinetic analysis of interleukin-2 receptor-tested chronic lymphocytic leukemia using the AgNOR silver stain. *Am J Clin Pathol* 101(3):300-304
25. Simark-Mattsson C, Bergenholtz G, Jontell M, Eklund C, Seymour GJ, Sugarman PB (1999) Distribution of interleukin-2, -4, -10, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta mRNAs in oral lichen planus. *Arch Oral Biol* 44(6):499-507
26. Carrozzo M, Gandolfo S, Carbone M, Colombatto P, Olivieri F (1997) An atypical verrucous carcinoma of the tongue arising in a patient with oral lichen planus and hepatitis C virus infection. *Oral Oncol* 33(3):220-225
27. Nagao Y, Sata M, Tanikawa K, Itoh K, Kameyama T (1995) Lichen planus and hepatitis C virus in the northern Kyushu region of Japan. *Eur J Clin Invest* 25(12):910–914
28. Nagao Y, Sata M, Noguchi S, Seno'o T, Kinoshita M, Kameyama T et al (2000) Detection of hepatitis C virus RNA in oral lichen planus and oral cancer tissues. *J Oral Pathol Med* 29(6):259-266
29. Arrieta JJ, Rodriguez-Iñigo E, Casqueiro M, Bartolomé J, Manzarbeitia F, Herrero M et al (2000) Detection of hepatitis C virus replication by in situ hybridization in epithelial cells of anti-hepatitis C virus-positive patients with and without oral lichen planus. *Hepatology* 32(1):97-103
30. Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T (1995) Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 69(6):3893-3896
31. Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R (1996) Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 70(7):4438-4443
32. Michele G, Carlo L, Mario MC, Giovanni L, Pasquale M, Alessandra M (2007) Hepatitis C virus chronic infection and oral lichen planus: an Italian case-control study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 19(8):647-652

7. DISCUSSÃO

O presente estudo se dividiu em três momentos. No primeiro, buscou-se realizar uma revisão de literatura enfocando a relação entre o LPB e o VHC. No segundo, procurou-se, através da avaliação clínica longitudinal de pacientes com LPB e portadores de VHC, estabelecer uma possível relação entre as enfermidades. Finalmente, no terceiro momento, avaliou-se por meio do método AgNOR a atividade proliferativa celular das lesões de LPB de pacientes sem VHC e da mucosa bucal normal de portadores de VHC, tratados ou não por interferon e ribavirina.

Como pôde ser notado a partir do levantamento bibliográfico realizado, numerosos estudos clínicos tem demonstrado uma associação entre a presença de LPB e a infecção por VHC (GROSSMANN *et al.*, 2007; GROSSMAN *et al.*, 2009; BERMEJO-FENOLL *et al.*, 2010; BIRKENFELD *et al.*, 2010; VACHIRAMON *et al.*, 2010). No entanto, para outros autores, tal relação ainda se mostra questionável (CHAINANI-WU *et al.*, 2004; RANDAZZO *et al.*, 2005; CARROZZO, 2008). Tais diferenças nos resultados dos trabalhos provavelmente se dêem, segundo Chainani-Wu *et al.* (2004), devido às diferentes populações estudadas, *design* dos estudos e distribuição dos possíveis agentes confundidores (como faixa etária dos pacientes e região geográfica estudada), resultando em importantes vieses, os quais podem conduzir a conclusões errôneas.

Com relação ao estudo clínico longitudinal realizado, avaliou-se um grupo de 33 pacientes VHC+ e outro grupo de 18 portadores de LPB. Como resultado, obteve-se que uma paciente VHC+ (3,03%) apresentou lesões de LPB e nenhum paciente do grupo dos portadores de LPB apresentou infecção por VHC, indicando relação estatisticamente significativa entre a ocorrência das duas enfermidades. Tal resultado

sugere que a população VHC+ estudada teve uma prevalência de LPB maior do que a população sem o vírus, que segundo Grossmann *et al.* (2007) e Birkenfeld *et al.* (2010) varia de 0,1% a 2%. Talvez o fato do presente estudo ter apresentado relação significativa entre o LPB e a infecção por VHC seria diferente se o período de acompanhamento clínico dos pacientes fosse maior do que 12 meses, o que é intenção dos pesquisadores em estudos futuros. Assim, clinicamente, os resultados do presente estudo vem ao encontro dos de Michele *et al.* (2007) e Grossmann *et al.* (2007), que concluíram que não há relação clínica clara entre o LPB e a infecção crônica por VHC.

No momento do delineamento da parte clínica do presente estudo, a intenção era acompanhar um grupo de pacientes VHC+ “virgens” de tratamento antiviral ao longo do tratamento com interferon e ribavirina, reexaminando-os em dois intervalos de seis meses, uma vez que nenhum trabalho com tal design foi encontrado na literatura. No entanto, no decorrer do estudo, notou-se que 6 e 12 meses após o exame inicial dos 33 pacientes “virgens” de tratamento antiviral, os mesmos não iniciaram o tratamento com interferon e ribavirina, uma vez que, para ser iniciado, tal tratamento deve considerar o risco de progressão da doença, a probabilidade de resposta terapêutica, os efeitos adversos do tratamento e a presença de comorbidades (BRASIL, 2011). Além de não ter sido possível o acompanhamento do início do tratamento antiviral nos pacientes VHC+, notou-se que aqueles que já haviam iniciado tal terapêutica não tinham uma padronização de tempo de recebimento do medicamento. Sendo assim, na parte clínica do presente estudo foram incluídos apenas pacientes “virgens” de tratamento com interferon e ribavirina, com o objetivo de verificar se a infecção por VHC, por si só, está relacionada à manifestação clínica de LPB.

Além disso, se tornou impossível determinar há quanto tempo os pacientes VHC+ eram portadores do vírus, uma vez que os mesmos procuravam atendimento

médico apenas quando do aparecimento dos sintomas da Hepatite C, fato este que varia de paciente para paciente, segundo Guerreiro *et al.* (2005).

Lodi *et al.* (2004) afirmam que a maior parte dos pacientes com LPB possuem 50 anos ou mais. Assim, para tais autores, a grande frequência de VHC+ encontrada em grupos de portadores de LPB é apenas uma coincidência, uma vez que as duas enfermidades acometem pacientes nessa faixa etária, sem relação causal. No presente estudo, apesar de a faixa etária não estar estatisticamente associada à presença de LPB ou VHC, a maior parte dos VHC+ e dos portadores de LPB estava entre os 43 e os 60 anos de idade, o que vem ao encontro de estudo anterior (BERMEJO-FENOLL *et al.*, 2010).

Tendo em vista que, clinicamente, o presente estudo encontrou relação estatística entre LPB e infecção pelo VHC e levando-se em consideração que o método AgNOR poderia ser útil na comparação da atividade proliferativa celular de lesões de LPB e da mucosa bucal normal de portadores de VHC (SILVA FONSECA e CARMO, 2001), optou-se por acrescentar à pesquisa uma análise histoquímica pelo AgNOR em material oriundo de citologia esfoliativa da mucosa bucal. Ao se analisar os resultados do estudo histoquímico, nota-se que o grupo de pacientes VHC+ previamente tratados com interferon e ribavirina mostrou um número de NORs por núcleo estatisticamente maior do que os demais grupos, evidenciando maior atividade proliferativa celular, o que indica uma possível relação entre o tratamento anti-VHC e o LPB, fato este já relatado clinicamente na literatura (GRIFFITHS *et al.*, 1989; SCHLESINGER *et al.*, 1997; SOOKOIAN *et al.*, 1999; NAGAO *et al.*, 2005; GROSSMANN *et al.*, 2008).

Embora não tenha sido objeto da presente pesquisa, sabe-se que carcinomas bucais tem sido reportados em pacientes VHC+ independentemente da presença de LPB (NAGAO *et al.*, 1995; CARROZZO *et al.*, 1997). Este fato pode explicar porque os

pacientes VHC+ previamente tratados apresentaram uma atividade proliferativa maior quando comparados aos demais grupos. Assim sendo, pode-se inferir também que tal atividade proliferativa celular possa estar relacionada à presença de lesões displásicas bucais.

Cabe ainda ressaltar que, seguindo a tendência de estudos prévios (AHMED e BABIKER, 2009; SOUSA *et al.*, 2009), notou-se no presente trabalho que a impregnação pela prata do material coletado por meio de citologia esfoliativa foi efetiva, uma vez que não foram encontradas dificuldades técnicas. Além do aspecto técnico, o método aplicado possibilitou a detecção de diferenças na atividade proliferativa celular entre os grupos estudados. O método também se mostrou reprodutível e confiável, uma vez que as avaliações inter e intra-examinadores foram estatisticamente satisfatórias.

8. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos na revisão de literatura, estudo clínico longitudinal e estudo histoquímico transversal, o presente trabalho permite chegar às seguintes conclusões:

- A literatura se mostra dividida em relação ao papel do LPB como marcador precoce de infecção pelo VHC. Assim, são aventadas diversas hipóteses acerca da relação de tais enfermidades, mas ainda não se pode chegar a uma conclusão definitiva;

- A associação estatística entre LPB e infecção por VHC foi verificada na população da macro-região de Passo Fundo/RS/Brasil, até o momento em que os pacientes foram avaliados. Porém, maiores evidências clínicas são necessárias para real comprovação da relação entre LPB e VHC;

- O estudo histoquímico transversal por meio do método AgNOR sugere que a mucosa bucal de pacientes VHC+ previamente tratados por interferon e ribavirina apresentam uma maior atividade proliferativa celular que os demais grupos estudados. Estes dados ainda não são suficientes para comprovar a relação de causa e efeito entre LPB e VHC, visto que outras doenças bucais também podem apresentar maior atividade proliferativa celular.

9. REFERÊNCIAS

AHMED, H.G.; BABIKER, A.E.A. Assessment of cytological atypia, AgNOR and nuclear area in epithelial cells of normal oral mucosa exposed to toombak and smoking. *Rare Tumors*, v. 1, n. e18, p. 50-52, 2009.

ANASTASSOVA-KRISTEVA, M. The nucleolar cycle in man. *J Cell Sci*, v. 25, p. 103-110, 1977.

BERMEJO-FENOLL, A.; SÁNCHEZ-SILES, M.; LÓPEZ-JORNET, P.; CAMACHO-ALONSO, F.; SALAZAR-SÁNCHEZ, N. A retrospective clinicopathological study of 550 patients with oral lichen planus in south-eastern Spain. *J Oral Pathol & Medicine*, v. 39, n. 6, p. 491-496, 2010.

BIRKENFELD, S.; DREIHER, J.; WEITZMAN, D.; COHEN, A.D. A study on the association with hepatitis B and hepatitis C in 1557 patients with lichen planus. *JEADV* 2010; DOI: 10.1111/j.1468-3083.2010.03809.x, p. 1-5.

BRASIL. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções. Brasília-DF; 2011. 100 p.

CARROZZO, M.; GANDOLFO, S.; CARBONE, M.; COLOMBATTO, P.; OLIVIERI, F. An atypical verrucous carcinoma of the tongue arising in a patient with oral lichen planus and hepatitis C virus infection. *Oral Oncol*, v. 33, n. 3, p. 220-225, 1997.

CARROZZO, M. Oral diseases associated with hepatitis C virus infection. Part 2: lichen planus and other diseases. *Oral Dis*, v. 14, n. 3, p. 217–228, 2008.

CARROZZO, M.; THORPE, R. Oral lichen planus: a review. *Minerva Stomatol*, v. 58, n. 10, p. 519-537, 2009.

CHAINANI-WU, N.; LOZADA-NUR, F.; TERRAULT, N. Hepatitis C virus and lichen planus: A review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 98, n. 2, p. 171-183, 2004.

DE CARLI, J.P.; MORAES, N.P.; CRIVELINI, M.M.; SILVA, S.O.; LINDEN, M.S.S.; TRENTIN, M.S. Avaliação da agressividade da lesão de células gigantes periférica da cavidade bucal através de estudo histoquímico-imunohistoquímico. *Rev Odonto Ciência*, v. 23, n. 16, p. 291-296, 2008.

GRIFFITHS, C.E.; VOORHEES, J.J.; NICKOLOFF, B.J. Characterization of intracellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. *J Am Acad Dermatol*, v. 20, n. 4, p. 617-629, 1989.

GROSSMANN, S.M.C.; AGUIAR, M.C.F.; TEIXEIRA, R.; CARMO, M.A.V. Oral lichen planus and chronic hepatitis C – a controversial association. *Am J Clin Pathol*, v. 127, n. 5, p. 800-804, 2007.

GROSSMANN, S.M.; TEIXEIRA, R.; DE AGUIAR, M.C.; DO CARMO, M.A. Exacerbation of oral lichen planus lesions during treatment of chronic hepatitis C with pegylated interferon and ribavirin. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v. 20, n. 7, p. 702-706, 2008.

GROSSMANN, S.M.C.; TEIXEIRA, R.; AGUIAR, M.C.F.; MOURA, M.D.G.; CARMO, M.A.V. Oral mucosal conditions in chronic hepatitis C Brazilian patients: a cross-sectional study. *J Public Health Dentistry*, v. 69, n. 3, p. 168-175, 2009.

GUERREIRO, T.D.T.; MACHADO, M.M.; FREITAS, T.H.P. Associação entre líquen plano e infecção pelo vírus da hepatite C: um estudo prospectivo envolvendo 66 pacientes da clínica de dermatologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. *An Bras Dermatol*, v. 80, n. 5, p. 475-480, 2005.

LODI, G.; GIULIANI, M.; MAJORANA, A.; SARDELLA, A.; BEZ, C.; DEMAROSI, F. et al. Lichen planus and hepatitis C vírus: a multicentre study of patients with oral lesions and a systematic review. *Brit J Dermatol*, v. 151, n. 6, p. 1172-1181, 2004.

MICHELE, G.; CARLO, L.; MARIO, M.C.; GIOVANNI, L.; PASQUALE, M.; ALESSANDRA, M. Hepatitis C virus chronic infection and oral lichen planus: an Italian case-control study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v. 19, n. 8, p. 647-652, 2007.

NAGAO, Y.; KAWAGUCHI, T.; IDE, T.; KUMASHIRO, R.; SATA, M. Exacerbation of oral erosive lichen planus by combination of interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Int J Mol Med*, v. 15, n. 2, p. 237-241, 2005.

NAGAO, Y.; SATA, M.; TANIKAWA, K.; ITOH, K.; KAMEYAMA, T. Lichen planus and hepatitis C virus in the northern Kyushu region of Japan. *Eur J Clin Invest*, v. 25, n. 12, p. 910-914, 1995.

PILLI, M.; PENNA, A.; ZERBINI, A.; VESCOVI, P.; MANFREDI, M.; NEGRO, F. et al. Oral lichen planus pathogenesis: a role for the HCV-specific cellular immune response. *Hepatology*, v. 36, n. 6, p. 1446-1452, 2002.

RANDAZZO, A.R.; AMORMINO, S.A.F.; MARTINS, C.R. Líquen plano bucal e hepatite C: revisão da literatura. *Rev Clín Pesq Odontol*, v. 1, n. 3, p. 37-40, 2005.

REBORA A, PATRI P, RAMPINI E, et al. Erosive lichen planus and cirrhotic hepatitis. *Italian General Rev Dermatol*, v. 15, n. 2, p. 123-131, 1978.

SANO, K. Prognostic implication of silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, v. 20, n. 2, p. 53-56, 1991.

SCHLESINGER, T.E.; CAMISA, C.; GAY, J.D.; BERGFELD, W.F. Oral erosive lichen planus with epidermolytic hyperkeratosis during interferon alfa-2b therapy for chronic hepatitis C virus infection. *J Am Acad Dermatol*, v. 36, n. 6, p. 1023-1025, 1997.

SILVA, S.O.; GATTO, K.P.; CARLI, J.P.; SOUZA, P.H.C.; BUSIN, C.S. Evaluation of proliferative activity in oral squamous cell carcinoma by the AgNOR staining method. *Odonto (UMESP)*, v. 19, p. 115-121, 2011.

SILVA FONSECA, L.M.; CARMO, M.A.V. Identification of the AgNORs, PCNA and ck16 proteins in oral lichen planus lesions. *Oral Diseases*, v. 7, n. 6, p. 344–348, 2001.

SOOKOIAN, S.; NEGLIA, V.; CASTANO, V.; FRIDER, B.; KIEN, M.C.; CHOHELA, E. High prevalence of cutaneous reactions to interferon alfa plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C virus. *Arch Dermatol*, v. 135, n. 8, p. 1000–1001, 1999.

SOUSA, F.A.C.G.; PARADELLA, T.C.; CARVALHO, Y.R.; ROSA, L.E.B. Comparative analysis of cell proliferation ratio in oral lichen planus, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 14, n. 11, p. e563-7, 2009.

STRUMIA, R.; VENTURINI, D.; BOCCIA, S. et al. UVA and interferon-alfa therapy in a patient with lichen planus and chronic hepatitis C [letter]. *Hat. J Dermatol*, v. 32, n. 5, p. 386, 1993.

VACHIRAMON, V.; SUCHONWANIT, P.; THADANIPON, K. Bilateral linear lichen planus pigmentosus associated with hepatitis C virus infection. *Case Rep Dermatol*, v. 2, p. 169-172, 2010.

XIE, X. Diagnostic and a prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*, v. 79, n. 11, p. 2200-2208, 1997.

WARMAKULASURIYA, K.A.A.S.; JOHNSON, N.W. Nucleolar organizer region (NOR) distribution as a diagnostic marker in oral Keratosis, dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oral Pathol Med*, v. 22, n. 2, p. 77-81, 1993.

10. ANEXOS

ANEXO 1 – Normas de publicação do “*Clinical Oral Investigations*”

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Further Useful Information

The Springer Author Academy is a set of comprehensive online training pages mainly geared towards first-time authors. At this point, more than 50 pages offer advice to authors on how to write and publish a journal article.

Title Page

The title page should include: The name(s) of the author(s), A concise and informative title, The affiliation(s) and address(es) of the author(s), The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

Objectives (stating the main purposes and research question)

Materials and Methods

Results

Conclusions

Clinical Relevance

These headings must appear in the abstract.

Key words

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting - Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions). Word template (zip, 154 kB)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

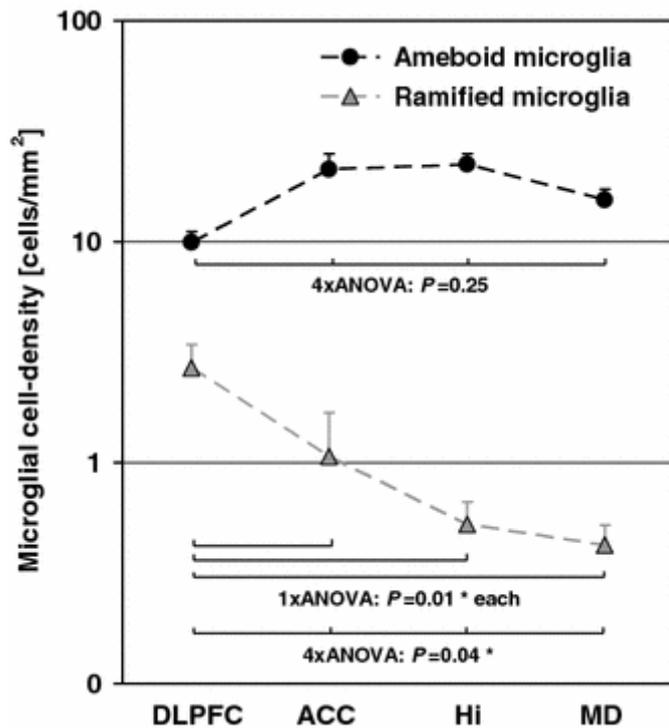
Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



Definition: Black and white graphic with no shading.

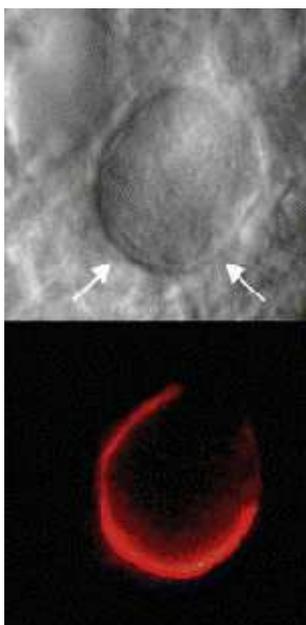
Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

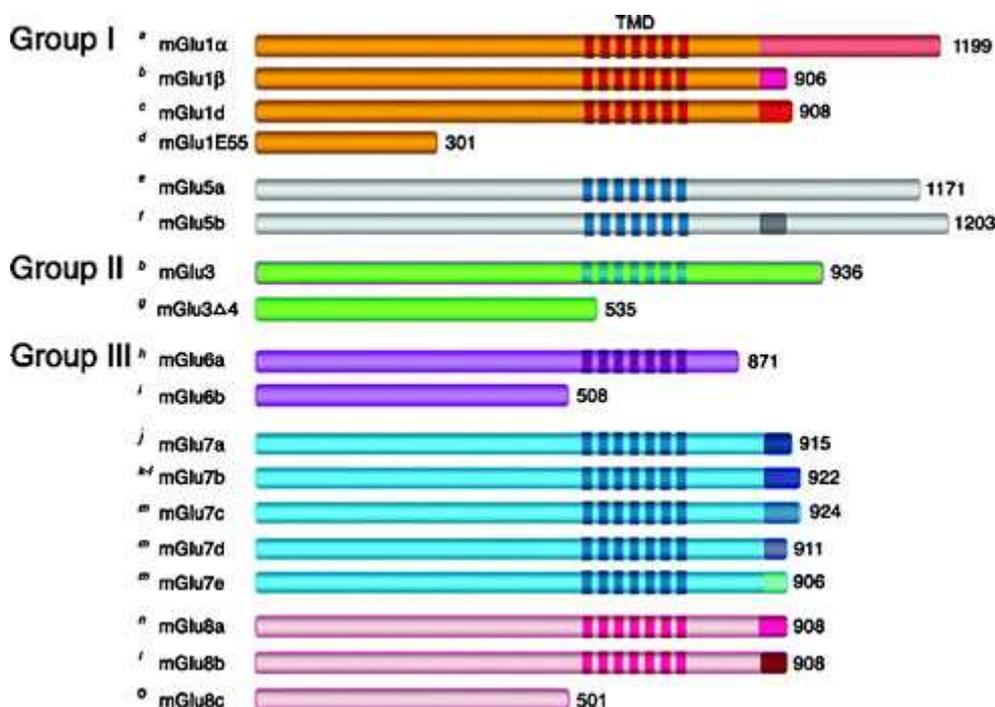
Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
 If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
 Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
 Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.
 If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
 If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
 Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
 Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
 Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
 Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
 Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

ANEXO 2 – Aprovações do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Vicente de Paulo e da Universidade de Passo Fundo

Universidade de Passo Fundo

Faculdade de Odontologia

À Administração do Hospital São Vicente de Paulo de Passo Fundo

TERMO DE CONCORDÂNCIA

Pelo presente instrumento, declaro que esta instituição foi informada de forma clara e detalhada sobre os objetivos e justificativa do projeto de pesquisa “Relação entre líquen plano bucal e contaminação pelo vírus da hepatite C” e concorda com a realização do mesmo junto aos pacientes internados no HSVP e identificados através das notificações realizadas pelo Núcleo de Vigilância Epidemiológica da mesma instituição.

Assoc. Hosp. Benef. São Vicente de Paulo

Ilário Jander Da Silva
Administrador

Administração do Hospital São Vicente de Paulo

Passo Fundo, 12/06/2009



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa – UPF, em reunião no dia 05/05/09, analisou o projeto de pesquisa **“Relação entre líquen plano bucal e contaminação pelo vírus da hepatite C”**, registro no CEP 050/2009, CAAE nº 0029.0.398.000-09, de responsabilidade da pesquisadora **Soliete Oliveira da Silva**.

O projeto tem como objetivo identificar a relação existente entre Líquen Plano Bucal (LPB) e hepatite C correlacionando a evolução desses pacientes perante o tratamento antiviral com a presença de Líquen Plano Bucal. Para isto a pesquisadora fará um estudo epidemiológico, longitudinal observacional e analítico envolvendo todos os indivíduos portadores de hepatite C internados ou em tratamento no Hospital São Vicente de Paulo no município de Passo Fundo-RS, no período de janeiro de 2009 a setembro de 2010, os quais serão submetidos a exame clínico (anamnésico + físico) para averiguação da presença de lesões de LPB (Grupo 1) e todos os indivíduos portadores de LPB atendidos na Clínica de Diagnóstico Oral II da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo no período de março de 2003 a setembro de 2010, os quais serão submetidos a exame sorológico anti-HCV e exame clínico (anamnésico + físico). Seis meses e um ano após o início da terapia antiviral, os participantes serão reavaliados quanto à carga viral de HCV e quanto à presença de lesões de LPB, a fim de verificar sua regressão. Os pacientes receberão orientações sobre a doença bucal e/ou sistêmica (quando identificada) e sobre a maneira de conviver com a mesma. Os participantes cujo teste anti-HCV for positivo serão encaminhados ao serviço especializado de tratamento da hepatite C no Hospital São Vicente de Paulo

Após a análise o Comitê considerou o projeto relevante e de valor científico. Foram apontadas pendências no protocolo, as quais foram devidamente atendidas pela pesquisadora. Os direitos fundamentais dos participantes foram garantidos no projeto e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apresentado. O protocolo foi instruído e apresentado de maneira completa e adequada. Os compromissos da pesquisadora e das instituições envolvidas estavam presentes.

Diante do exposto, este Comitê, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

A pesquisadora deverá apresentar relatório a este CEP ao final do estudo.

Situação: PROTOCOLO APROVADO

Passo Fundo, 23 de junho de 2009.



PARECER N. 266/2011

O Comitê de Ética em Pesquisa – UPF, em reunião no dia 29/06/2011, analisou o projeto de pesquisa “**Avaliação da atividade proliferativa celular de pacientes com líquen plano ou hepatite C por meio do método Ag-NOR**”, CAAE nº 0091.0.398.000-11, de responsabilidade da(o) pesquisador(a) **João Paulo de Carli**.

O projeto tem como objetivo (s): Avaliar histoquimicamente o potencial proliferativo de casos de LPB e da mucosa bucal de portadores de VHC diagnosticados na região de Passo Fundo – RS, por meio de marcador de proliferação celular (Ag-NOR); avaliar a idade, sexo, raça de pacientes acometidos por LPB e VHC e verificar se a LPB pode ser ocasionada pelo VHC.

Trata-se de uma pesquisa transversal, quantitativa, com cerca de 45 pacientes, divididos em três grupos: a) 15 pacientes com VHC; b) 15 com LPV e c) 15 acadêmicos do curso de Odontologia da UPF, doadores de sangue, com ausência de HCV e LPV, por meio de uma ficha de dados clínicos e pela coleta das células da mucosa, por meio de uma escova pequena com cerdas de náilon, que será aplicada de forma suave e em movimentos giratórios na bochecha. Algum desconforto poderá ocorrer ao abrir a boca e tracionar a bochecha para manter as cerdas da escova em contato com a mucosa. O benefício da pesquisa para o paciente estará relacionado ao resultado do exame, que mostrará se as lesões de líquen plano têm ou não alterações nas células epiteliais da mucosa bucal relacionadas à hepatite C, após a avaliação em microscópio de luz.

Os direitos fundamentais dos participantes foram garantidos no projeto e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O protocolo foi instruído e apresentado de maneira completa e adequada. Os compromissos da pesquisadora e das instituições envolvidas estavam presentes. O projeto foi considerado claro em seus aspectos científicos, metodológicos e éticos.

Diante do exposto, este Comitê, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

O pesquisador deverá apresentar relatório a este CEP no final do estudo.

Situação: PROTOCOLO APROVADO

Nadir Antonio Pichler

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Passo Fundo, 02 de julho de 2011

ANEXO 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos sujeitos da pesquisa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, ...(*nome do sujeito da pesquisa, nacionalidade, idade, estado civil, profissão, endereço, RG*), estou sendo convidado a participar de um estudo denominado **RELAÇÃO ENTRE LÍQUEN PLANO BUCAL E CONTAMINAÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C – PREVALÊNCIA DE CASOS E COMPORTAMENTO DAS LESÕES BUCAIS FRENTE A DIFERENTES TERAPÊUTICAS ANTIVIRAIS**, cujos objetivos e justificativas são:

- 1) Verificar se a presença da doença líquen plano bucal está relacionada com a contaminação pelo vírus da hepatite C;
- 2) Avaliar a presença de líquen plano bucal em pacientes que respondem e que não respondem ao tratamento para hepatite C.

A minha participação no referido estudo será no sentido de responder a um questionário sobre minha saúde bucal e geral, ser submetido a um exame de boca e, se eu tiver lesões em boca e concordar, também será realizada uma biópsia bucal (remoção de um pequeno fragmento da mucosa da boca para exame microscópico).

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como: surgimento de novas técnicas de descoberta das doenças bucais ou gerais que possuo (diagnóstico) e de tratamento para as mesmas, beneficiando a mim mesmo e a população que delas necessitar. Relativamente aos pacientes que possuem hepatite C (Grupo Caso) e lesões bucais de líquen plano, os benefícios serão no sentido de instituir uma possível correlação entre a presença das lesões bucais e a carga viral de HCV, facilitando assim a observação da efetividade do tratamento antiviral da hepatite. Quanto aos pacientes do Grupo Controle (portadores de líquen plano bucal atendidos nas faculdades de Odontologia), os mesmos terão benefício quanto a um possível diagnóstico de hepatite C por meio da identificação de lesões bucais de líquen plano.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Assim, estou ciente de que posso sentir um pequeno desconforto decorrente da biópsia de boca, a qual poderá sangrar e doer um pouco.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo. Foi-me esclarecido, igualmente, que eu posso optar por métodos alternativos, que são: continuar a ser tratado nesta instituição sem a participação na pesquisa.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são o **Dr. João Paulo De Carli** e o **Dr. Paulo Henrique Couto Souza** e com eles poderei manter contato pelo telefone (54) 9112-3079.

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma seguinte: devolução do montante em dinheiro. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

Curitiba/Passo Fundo, ... de ... de 2009.

Nome e assinatura do sujeito da pesquisa

Nome(s) e assinatura(s) do(s) pesquisador(es) responsável(responsáveis)

**ANEXO 4 – Questionário e ficha de exame dos pacientes do estudo clínico
(portadores de LPB e VHC)**

Ficha a ser utilizada no exame clínico dos pacientes VHC+ e LPB+:

QUESTIONÁRIO E FICHA DE EXAME DOS PACIENTES N° _____

GRUPO: _____

NOME DO PACIENTE:.....

IDADE:..... SEXO: () F () M

Esquema terapêutico antiviral a ser iniciado (se for o caso).....

História Familiar: Líquen Plano () Sim () Não Hepatite C () Sim () Não

Idade em que começaram a surgir as primeiras lesões de LPB:

Duração das lesões de LPB:.....

Uso prévio de medicamentos: () Sim () Não

() AINE () Corticóide sistêmico () Corticóide tópico () Dapsona

() Ciclosporina () Metotrexate () Interferon () Talidomida () Ribavirina

() Outro(s) Qual(is):.....

Fumo () Álcool () Exposição ao frio ()

Doenças Sistêmicas: Hipertensão () Sim () Não Diabete () Sim () Não

Depressão () Sim () Não Ansiedade () Sim () Não

Estresse () Sim () Não

Outra, qual:.....

Exame Físico:

Extrabucal: () normal () alterações

() Face () Tronco () Abdomem () Braços () Pernas

Líquen Plano: () Placa () Reticular () Bolhoso () Erosivo

Sintomatologia: () Prurido () Dor () Ausente () Outro

Intrabucal: () normal () alterações

() Lábio inferior () Lábio superior () Comissuras

() Bochecha () direita () esquerda

() Palato duro () Palato Mole () Gengiva superior () Gengiva inferior

Língua: () Normal () Alterada

() Dorso () Margens () Região anterior () Região posterior () Ventre

() Assoalho bucal () Área retromolar

Volume de saliva: () normal () aumentado () diminuído

Qualidade de saliva: () viscosa () fluida

Ardência bucal: () Sim () Não

Alteração no paladar: () Sim () Não

Úlceras bucais: () traumáticas () aftas

Líquen plano reticular (linhas brancas ceratóticas que se entrelaçam aparecendo bilateralmente, principalmente na região posterior da mucosa jugal, palato e margens ou dorso linguais): () Sim () Não

Líquen plano erosivo (regiões mucosas erodadas atróficas, eritematosas, com centro ulcerado em graus variados, potencialmente bilaterais e doloridas, principalmente na região posterior da mucosa jugal, margens linguais ou em toda a extensão da mucosa gengival – gengivite descamativa): () Sim () Não

Líquen plano bolhoso (bolhas e/ou ulcerações potencialmente bilaterais, de tamanho variável, doloridas principalmente na região posterior da mucosa jugal, margens linguais e mucosa labial, clinicamente mais grave que a forma erosiva) () Sim () Não

Líquen plano em placa (placas brancas ceratóticas potencialmente bilaterais, assintomáticas, principalmente na região do dorso lingual ou mucosa jugal)
() Sim () Não

Língua geográfica: () Sim () Não

Língua Fissurada: () Sim () Não

Queilite angular: () Sim () Não

Estomatite Geográfica: () Sim () Não

Grau de higiene bucal: () boa () regular () ruim

Gengivite: () Sim () Não

Periodontite: () Sim () Não

Uso de próteses: () Sim () Não () parcial () total

ANEXO 5. ARTICLE II (VERSÃO EM INGLÊS) ⁴

João Paulo De Carli^a, Paulo Henrique Couto Souza^b

^a Faculdade de Odontologia, Universidade de Passo Fundo, 99052-900, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Escola de Saúde e Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil

A longitudinal clinical study to evaluate the relation between oral lichen planus and hepatitis C

5.1. Abstract

Introduction: Oral lichen planus (OLP) is a chronic inflammatory mucocutaneous disease that frequently involves the oral mucosa. Recent studies have confirmed a significant association between OLP and liver diseases, in particular with hepatitis C virus (HCV) infection. **Objective:** To carry out a longitudinal clinical study of patients with OLP or HCV infection in order to evaluate a possible correlation between these diseases. In addition, the influence of patients' age, sex, major systemic diseases and drugs on that relation were also evaluated. **Materials and Methods:** Fifty-one patients - 33 with HCV infection diagnosed by anti-HCV and HCV-RNA [HCV+ Group] and 18 with OLP confirmed histopathologically [OLP+ Group] - were clinically evaluated in three moments (0, 6 and 12 months). **Results:** From those 33 HCV+ patients, only one was clinically and histologically positive for OLP (Pearson Chi-Square Test – 46.852, $p = 7.65 \times 10^{-12}$). The 18 patients of OLP+ Group showed typical clinical and histopathological features of reticular/plaque OLP. Patients' age, sex, major systemic diseases and medications did not show influence on the occurrence of OLP or HCV ($p > 0.05$). **Conclusions:** Despite one patient VHC+ developed OLP during the course of such study, more active epidemiological studies on larger data samples/follow-ups and specific laboratory tests should be carried out to clarify the real relationship between OLP and HCV. **Clinical Relevance:** Patients with OLP can be screened for the presence of HCV infection.

Key words: Hepatitis C; Lichen Planus; Mouth Mucosa; Risk Factors.

* Corresponding author:

Paulo Henrique Couto Souza

Professor Titular do Curso de Odontologia da Escola de Saúde e Biociências da PUCPR.

Rua Imaculada Conceição, 1555, 80215-901 - Curitiba/PR, Brasil. Tel.: (5541) 3271 2565 / Fax: (5541) 3271 1405

E-mail: couto.s@pucpr.br

⁴ To be published in Clinical Oral Investigations (ANNEX 1).

5.2. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is considered a public health problem, with significant morbidity and mortality [1]. Consequently, the extrahepatic manifestations of hepatitis C, such as oral lichen planus (OLP), must be known by general clinicians allowing earlier diagnosis and treatment [2-5].

The first study indicating association between chronic liver disease and lichen planus was published in 1978 [6]. After, studies have reported the coexistence of chronic hepatitis C and lichen planus, particularly OLP [1,4,5]. However, differences in populations, study designs and distributions of potential confounders are important biases which may conduct to erroneous conclusions [7].

Several clinical studies have shown an association between HCV infection and OLP [1,4,5,8,9]. However, this relationship still remains a subject of controversy [3,7,10] once both diseases would occur independently in patients aging 50 years or older [11]. The influence of geographic locations should be also considered, since the association between HCV and OLP seems to be most prevalent in Japan, United States of America and southern Europe [12].

The objective of this study was to carry out a observational longitudinal clinical study enrolling patients with OLP or HCV infection in order to verify a possible relationship between these diseases. Furthermore, to assess the effect of age, sex, systemic diseases and drugs used by these patients in the occurrence of OLP or HCV infection.

5.3. Materials and Methods

The study was approved by Ethics Committee of Universidade de Passo Fundo, Brazil (protocol No. 050/2009) and by the Research Group of Hospital São Vicente de Paulo de Passo Fundo/RS, Brazil (ANNEX 2). All subjects participating in the present study gave a written informed consent (ANNEX 3).

Was performed a longitudinal observational clinical study in two groups of patients belonging to the macro-region of 6th Health Coordinator of the State of Rio Grande do Sul, located in Passo Fundo, South of Brazil, composed of 58 municipalities. The study groups were:

- HCV+ Group (1): patients treated at the Hospital São Vicente de Paulo from March 2010 to June 2011, who were submitted for a clinical interview and three six-monthly periodical extra/intraoral examinations (1st, 2nd and 3rd times) (ANNEX 4). If they had lesions compatible with OLP in one of these periods, an intraoral biopsy for histopathological diagnosis of the lesions was performed.

- LPB+ Group (2): patients treated at the Clinic of Stomatology, Faculdade de Odontologia, Universidade de Passo Fundo from March 2010 to June 2011, were submitted to a clinical interview, determination of serum anti-HCV antibodies and three six-monthly periodical clinical extra/intraoral examinations (1st, 2nd and 3rd meetings). These patients underwent intraoral biopsies for histopathological diagnosis of OLP.

For all patients (Groups 1 and 2), age, sex, systemic diseases and drugs utilized where registered for further evaluation.

The inclusion/exclusion criteria of two groups are described now:

For HCV+ Group: Inclusion - patients with hepatitis C confirmed by means of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and HCV-RNA; patients who have

never been treated with interferon and ribavirin (“virgins” of treatment); patients with hematological conditions (thrombocytes above 50.000/mm³ blood).

Exclusion - patients with hepatitis C confirmed only by means of ELISA; patients who have already been treated with interferon and ribavirin; patients without hematological conditions (thrombocytes below 50.000/mm³ blood).

For OLP+ Group: Inclusion - patients with reticular/plaque OLP clinically and histopathologically confirmed.

Exclusion - patients with metallic dental restorations or using drugs that could cause lichenoid lesions.

To perform the clinical and histopathological analyses of OLP lesions, the criteria proposed by Krutchkoff et al [13] and van der Meij and van der Waal [14] were used. A light microscope (Olympus™ BX 50, Olympus Corporation of the Americas, Center Valley, PA, USA) was used to analyze tissue specimens on hematoxylin-eosin staining (H.E.).

Considering the results, all data were analyzed by descriptive statistics of frequency and Pearson Chi-Square test. The significance level was 95% ($p < 0.05$). For this purpose, was used SPSS™ software version 13.0.

5.4. Results

The most significant results are presented below. Table 1 shows the epidemiological data from two studied groups.

Table 1 – Description of the epidemiological data from two studied groups

| | HCV+ (n = 33) | | OLP+ (n = 18) | | TOTAL (n = 51) | |
|------------------------|----------------------|----|----------------------|----|----------------------|----|
| | F | M | F | M | F | M |
| SEX | 21 | 12 | 12 | 06 | 33 | 18 |
| AGE MEAN (\pm S.D.) | 52.21 (\pm 13.48) | | 53.72 (\pm 16.73) | | 52.97 (\pm 14.56) | |

In OLP+ Group (2), all patients had clinical and histopathological lesions consistent with reticular/plaque OLP, whereas in HCV+ Group (1), only one patient had OLP. Nevertheless, it was noticed that there was statistical significance between the presence of HCV and OLP (Pearson Chi-Square Test – 46.852, $p = 7.65 \times 10^{-12}$).

None of 33 patients in HCV+ Group (1), underwent treatment for the disease during the period of twelve months.

During the clinical follow-up there was no presence of OLP lesions in HCV+ Group, except the patient who presented OLP since the initial examination. For OLP+ Group (2), it was noticed that 16 patients had the same clinical situation of OLP lesions observed at baseline and two patients developed complete remission of lesions, one at 6 months and another at 12 months after diagnosis, although they were not using drugs to treat OLP.

Patients aged between 43 and 60 years were the most affected by HCV infection (HCV+ Group – S.D. \pm 4.99 years) and OLP (OLP+ Group - \pm 4.55 years) (Fig. 1), but it was noticed that there was no significant relationship between age and presence of HCV or OLP (Pearson Chi-Square Test – 0.127 and 0.158, $p = 0.938$ and 0.924 for Groups 1 and 2, respectively). There was also no statistical relationship between sex and presence of HCV or OLP (Pearson Chi-Square Test – 0.047 and 0.183, $p = 0.829$ and 0.669 for Groups 1 and 2, respectively).

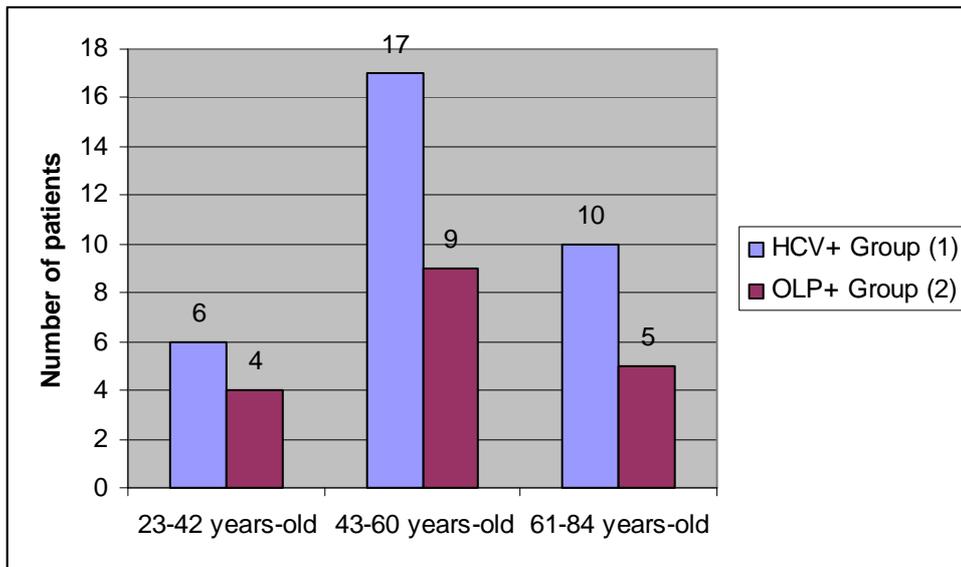


Figure 1 - Number of patients in HCV+ Group (blue columns) and OLP+ Group (red columns) by age

Figure 2 shows that hypertension and diabetes were the most frequent systemic diseases in patients from the HCV+ and OLP+ Groups. It was noticed that there was no significant relationships between systemic diseases and the presence of HCV or OLP (Pearson Chi-Square Test – 6.250 and 6.975, $p = 0.856$ and 0.801 for Groups 1 and 2, respectively).

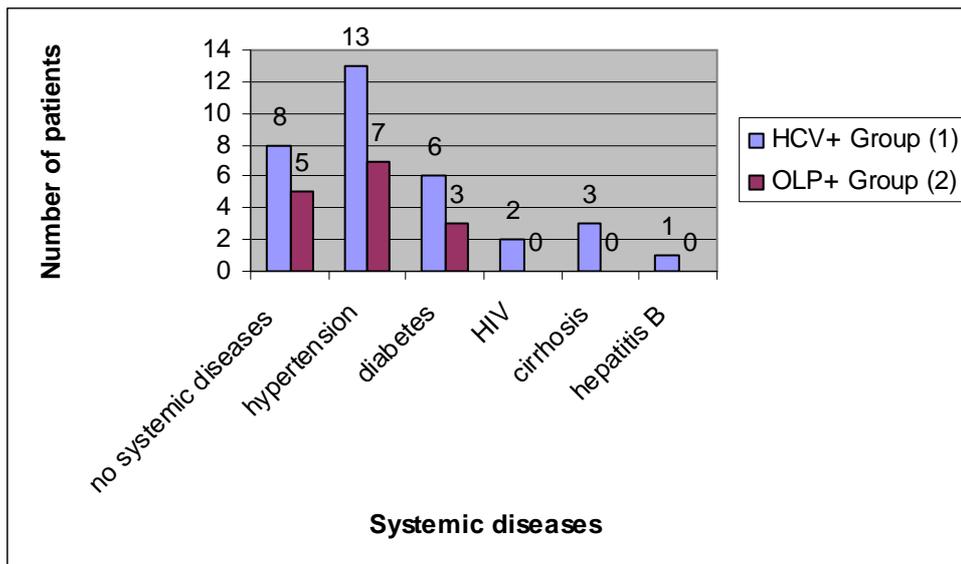


Figure 2 - Number of patients with systemic diseases in HCV+ (blue bars) and OLP+ (red bars) Groups

From 18 patients evaluated in OLP+ Group, 10 (55.5%) reported being "emotionally shaken", with anxiety or depression. Likewise, 17 (51.5%) out of 33 patients in the HCV+ Group, including the only patient who had OLP, were considered nervous people. Nevertheless, there was no significant relationship between relate of stress/anxiety by patients and presence of HCV or OLP (Pearson Chi-Square Test – 6.250 and 6.975, $p = 0.856$ and 0.801 for Groups 1 and 2, respectively).

Figure 3 shows that antihypertensive drugs were the most used in both groups of patients. However, there was no significant relationship between the use of drugs and the presence of HCV or OLP (Pearson Chi-Square Test – 14.145 and 13.772, $p = 0.225$ and 0.246 for Groups 1 and 2, respectively).

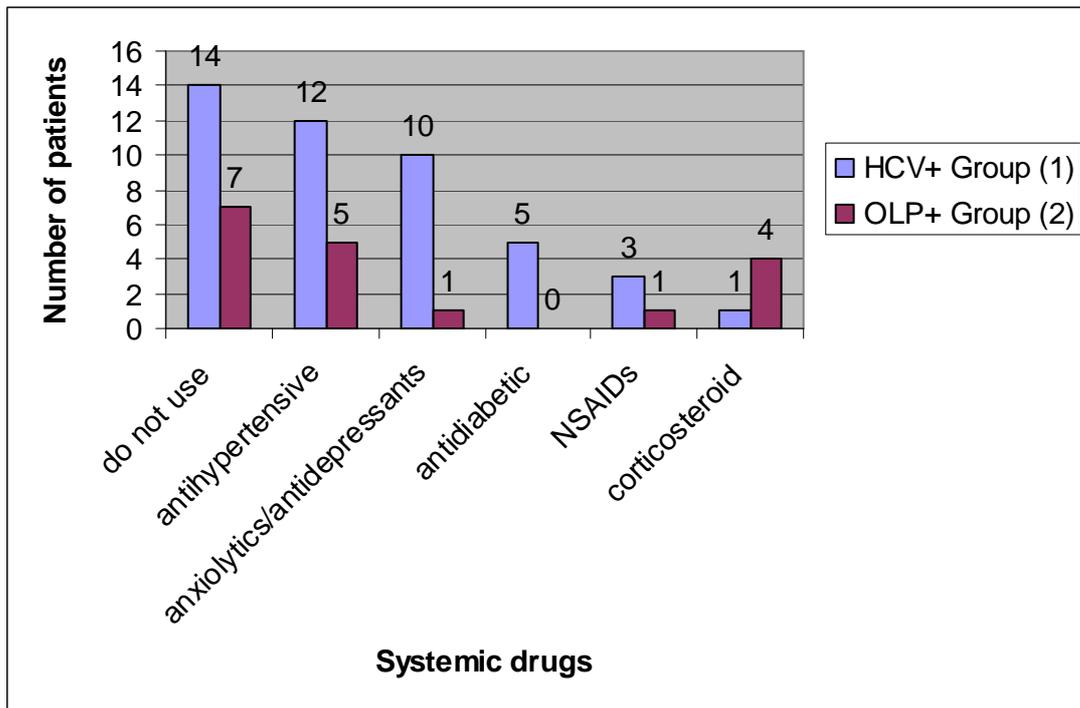


Figure 3 - Number of patients and the medications they use in the HCV+ Group (blue bars) and OLP+ Group (red bars)

5.5. Discussion

Our study evaluated a group of 33 HCV+ patients “virgins” of treatment with interferon and/or ribavirin at three different times over one year of follow-up. Considering the investigated sample and the time of clinical follow-up of patients (twelve months), it may be noticed that in the macro-region of 6th Regional Health Coordinator Rio Grande do Sul, headquartered in Passo Fundo, South of Brazil, there was statistical relationship between HCV infection and the occurrence of OLP, although only one patient in HCV+ Group (3.03%) presented oral lesions of lichen planus. This index suggests that the population HCV+ studied here has a higher prevalence of OLP than patients without the virus, which, according to Grossmann et al [8] and Birkenfeld et al [4], ranges from 0.1 to 2%.

Perhaps our study's outcome of significant relationship between OLP and HCV would be different if the follow-up of patients was increased, what is intention of the researchers in future studies. Thus, clinically, the findings of our study compare with those of Michele et al [15] and Grossmann et al [8], that concluded there is no clear relationship between OLP and chronic HCV infection.

The outcome of epidemic investigations varies considerably in different geographic regions. In Japan, Italy, Nigeria and Thailand [11,16-18], the prevalence of HCV infection in OLP patients ranged from 8.33% to 60%, statistically higher than respective controls. However, this could not be confirmed in Netherlands, Germany, Serbia and southeast of Brazil [19-22] there was no difference in the HCV infection rate between the patients with OLP and the general population.

Carrozzo [10] reported that HCV+ patients develop lesions of OLP later, probably through an immune pathology process; however, this is not clearly defined yet. One of drawbacks in the present study is that it was impossible to determine the time of the HCV infection, since the patients included in this study were asymptomatic and found to be carriers of HCV in routine examinations.

In the present study were included only patients "virgins" of treatment with interferon and ribavirin because it was not possible, within twelve months, intercept patients who started antiviral treatment. Thus, this study aimed to determine if HCV infection influences the origin of the OLP.

Carbone et al [23] affirmed that OLP has a chronic course, with a trivial percentage of patients showing complete and definitive healing (2.5 to 17%). Such statement seems to explain the findings of our study, since at 6 and 12 months follow-up visits, 2 out of 18 patients with OLP from OLP+ Group had complete remission of

lesions. On the other hand, 32 out of 33 patients from HCV+ Group did not show clinical signs of OLP at follow-ups.

Our results are similar to those of Bermejo-Fenoll et al [9], who found a mean age of 56.35 years-old for OLP patients. Likewise, in relation to infection by HCV, the Brazilian Ministry of Health states that in 2009, diagnosis was more frequent in patients 50 to 59 years old [24]. Lodi et al [11] reported in their study that several patients with OLP were 50 years or over and the high frequency of HCV seropositivity found in groups of patients with OLP was just a coincidence, since both conditions affect significantly patients in this age group, without causal relationship.

For Eisen [25], predisposing factors result in exacerbation of OLP. Factors include stress, spicy foods, dental procedures, systemic illness, drugs and poor oral hygiene. In the present study the main systemic diseases reported by patients from both groups were hypertension and diabetes. Nevertheless, it was noticed that there was no significant relationships between systemic diseases and the presence of HCV or OLP. Although we have not achieved a significant association, 6 patients in HCV+ Group and 3 in OLP+ Group had diabetes. Previous studies have suggested that patients with lichen planus have associated diabetes mellitus more often than general population [26,27]. However, Jing-Ling et al [28] did not support this observation.

There was no significant relationship between medicine intake and presence of HCV or OLP. Corroborating to this, the only patient who had OLP in HCV+ Group was not taking any drugs, discarding the hypothesis that the lesion was caused by them. Nevertheless, the antihypertensive was the drug most used in both groups studied. According to literature, there are some drugs that are classically known to induce OLP, such as NSAIDs and inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) [29]. There is also sufficient evidence that β -blockers and other drugs play a significant role in the

origin of OLP [12,30]. For Salem et al [31], the exact mechanism of pathogenesis of drug-induced lichen planus is unclear. One suggested mechanism is the epitope spreading theory: drugs can induce keratinocyte damage with exposure of previously unexposed basement membrane zone antigens, leading to autoantibody formation.

According to previous studies, stress is recognized as an important etiological factor for OLP. Although signs of depression and high levels of anxiety are commonly found in OLP patients [32,33], it is not yet determined whether the observed physiological changes are a direct etiologic factor or only a consequence of OLP, since the disease causes a discomfort that can afflict patients, causing stress. However, in this study we did not use a validated method for emotional disorders diagnosis. Patients answered only affirmatively or negatively, if they had anxiety, depression and/or stress. It is suggested that further research using scientifically validated methods for diagnosis of emotional disorders should be carried out. Hepatitis C itself can become a factor causing emotional disturbance and playing a supporting role in the etiology of OLP in these patients.

5.6. Conclusion

The relationship between OLP and HCV infection, although it has been statistically verified in the population of the macro-region of Passo Fundo/RS, southern of Brazil, during the 12 months of clinical follow-up of patients, requires further clinical evidence for real proof. The age, sex, systemic diseases and drugs used by patients showed no significant relationship with the presence of OLP or HCV infection.

5.7. References

1. Grossmann SMC, Teixeira R, Aguiar MCF, Moura MDG, Carmo MAV (2009) Oral mucosal conditions in chronic hepatitis C Brazilian patients: a cross-sectional study. *J Public Health Dentistry* 69(3):168-175
2. Nagao Y, Sata M (2004) Hepatitis C virus and lichen planus. *J Gastroenterol Hepatol* 19(10):1101–1113
3. Randazzo AR, Amormino SAF, Martins CR (2005) Lichen planus and hepatitis C: a literature review. *Rev Clín Pesq Odontol* 1(3):37-40
4. Birkenfeld S, Dreiherr J, Weitzman D, Cohen AD (2010) A study on the association with hepatitis B and hepatitis C in 1557 patients with lichen planus. *JEADV* 1-5. doi: 10.1111/j.1468-3083.2010.03809.x
5. Vachiramon V, Suchonwanit P, Thadanipon K (2010) Bilateral linear lichen planus pigmentosus associated with hepatitis C virus infection. *Case Rep Dermatol* 2(3):169-172
6. Rebera A, Patri P, Rampini E, Crovato F, Ciravegna G, Rebera A et al. (1978) Erosive lichen planus and cirrhotic hepatitis. *Italian General Rev Dermatol* 15(2):123–131
7. Chainani-Wu N, Lozada-Nur F, Terrault N (2004) Hepatitis C virus and lichen planus: A review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98(2):171-183
8. Grossmann SMC, Aguiar MCF, Teixeira R, Carmo MAV (2007) Oral lichen planus and chronic hepatitis C – a controversial association. *Am J Clin Pathol* 127(5):800-804
9. Bermejo-Fenoll A, Sánchez-Siles M, López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Salazar-Sánchez N (2010) A retrospective clinicopathological study of 550 patients with oral lichen planus in south-eastern Spain. *J Oral Pathol & Medicine* 39(6):491-496
10. Carrozzo M (2008) Oral diseases associated with hepatitis C virus infection. Part 2: lichen planus and other diseases. *Oral Dis* 14(3):217–228
11. Lodi G, Giuliani M, Majorana A, Sardella A, Bez C, Demarosi F et al. (2004) Lichen planus and hepatitis C virus: a multicentre study of patients with oral lesions and a systematic review. *Brit J Dermatol* 151(6):1172-1181
12. Carrozzo M, Thorpe R (2009) Oral lichen planus: a review. *Minerva Stomatol* 58(10):519-537
13. Krutchkoff D, Cutler L, Laskowski S (1978). Oral lichen planus: the evidence regarding potential malignant transformation. *J Oral Pathol Med* 7:1–7.

14. van der Meij EH, van der Waal I (2003). Lack of clinicopathological correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available criteria and suggestion for modification. *J Oral Pathol Med* 32: 507–512.
15. Michele G, Carlo L, Mario MC, Giovanni L, Pasquale M, Alessandra M (2007) Hepatitis C virus chronic infection and oral lichen planus: an Italian case-control study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 19(8):647-652
16. Nagao Y, Sata M, Tanikawa K, Itoh K, Kameyama T (1995) Lichen planus and hepatitis C virus in the northern Kyushu region of Japan. *Eur J Clin Invest* 25(12):910–914
17. Carrozzo M, Gandolfo S, Carbone M, Colombatto P, Broccoletti R, Garzino-Demo P (1996) Hepatitis C virus infection in Italian patients with oral lichen planus: a prospective case-control study. *J Oral Pathol Med* 25(10):527–533
18. Figueiredo LC, Carrilho FJ, de Andrade HF, Migliari DA (2002) Oral lichen planus and hepatitis C virus infection. *Oral Dis* 8(1):42–46
19. van der Meij EH, van der Waal I (2000) Hepatitis C virus infection and oral lichen planus: a report from the Netherlands. *J Oral Pathol Med* 29(6):255–258
20. Friedrich RE, Heiland M, El-Moawen A, Dogan A, von Schrenck T, Löning T (2003) Oral lichen planus in patients with chronic liver diseases. *Infection* 31(6):383–386
21. Bokor-Bratic M (2004) Lack of evidence of hepatic disease in patients with oral lichen planus in Serbia. *Oral Dis* 10(5):283–286
22. Cunha KS, Manso AC, Cardoso AS, Paixão JB, Coelho HS, Torres SR (2005) Prevalence of oral lichen planus in Brazilian patients with HCV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100(3):330–333
23. Carbone M, Arduino PG, Carrozzo M, Gandolfo S, Argiolas MR, Bertolusso G et al (2009) Course of oral lichen planus: a retrospective study of 808 northern Italian patients. *Oral Dis* 15(3):235-243
24. Brazil Ministry of Health (2010) Surveillance Secretariat of Health STD, AIDS and Viral Hepatitis. *Epidemiological Bulletin: viral hepatitis*. Ministry of Health, Brasília-DF
25. Eisen D (2002) The clinical features, malignant potential, and systemic association of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol* 46(2):207–214
26. Powell SM, Ellis JP, Ryan TJ, Vickers HR (1974) Glucose tolerance in lichen planus. *Br J Dermatol* 91(1):73-75
27. Lowe NJ, Cudworth AG, Clough SA, Bullen MF (1976) Carbohydrate metabolism in lichen planus. *Br J Dermatol* 95(1):9-12

28. Jing-Ling X, Ming-Wen F, Shuo-Zhi W, Xin Ming C, Yuan L (2005) A clinical study of 674 patients with oral lichen planus in China. *J Oral Pathol Med* 34(8):467–472
29. Potts AJ, Hamburger J, Scully C (1987) The medication of patients with oral lichen planus and the association of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with erosive lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 64(5):541-543
30. Thompson DF, Skaehill PA (1994) Drug-induced lichen planus. *Pharmacotherapy* 14(5):561-571
31. Salem CB, Chenguel L, Ghariani N, Denguezli M, Hmouda H, Bouraoui K (2008) Captopril-induced lichen planus pemphigoides. *Pharmacoepidemiol and drug safety* 17(7):722-724
32. Koray M, Dülger O, Ak G, Horasanli S, Uçok A, Tanyeri H et al (2003) The evaluation of anxiety and salivary cortisol levels in patients with oral lichen planus. *Oral Dis* 9(6):298-301
33. Ivanovski K, Nakova M, Warburton G, Pesevska S, Filipovska A, Nares S et al (2005) Psychological profile in oral lichen planus. *J Clin Periodontol* 32(10):1034-1040

6. ARTICLE III (VERSÃO EM INGLÊS) ⁵

João Paulo De Carli^a, Paulo Henrique Couto Souza^b

^a Faculdade de Odontologia, Universidade de Passo Fundo, 99052-900, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Escola de Saúde e Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil

Evaluation of cellular proliferative activity in patients with oral lichen planus and hepatitis C through AgNOR method

6.1. Abstract

Introduction: The detection of Nucleolar Organizer Regions (NORs) in oral lesions suggests that this marker can reflect the cellular proliferation index. Oral Lichen Planus (OLP) is a chronic mucocutaneous disease that frequently involves the mouth. Recent studies have confirmed an association between OLP and Hepatitis C Virus (HCV) infection. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the cellular proliferative potential of OLP lesions from patients without HCV by means of AgNOR method, as well as, the cellular proliferative potential of the normal oral mucosa from patients with HCV, treated or untreated by interferon and ribavirin. **Materials and Methods:** A cross sectional study was developed to investigate the oral mucosa of four groups: 20 patients HCV+ without clinical signs of OLP (10 patients that had never been treated for HCV infection – GROUP 1 - and 10 that were under interferon and ribavirin treatment – GROUP 2); 15 patients with reticular OLP lesions histopathologically confirmed, without HCV – GROUP 3, and 15 blood donors without HCV infection and no clinical signs of OLP (GROUP 4 - Control Group). The cytological material of all groups was collected by the technique of liquid-based cytology. Then, the sedimented material from each patient was dripped on a microscope slide and filled with the Nucleolar Organizer Regions impregnation by silver method (AgNOR). The count of NORs was performed on 100 epithelial cell nuclei per patient using the software Image Tool™. **Results:** The Tukey HSD test was used to compare the median value of NORs among the groups and showed that the oral mucosa of HCV+ patients previously treated with anti-HCV drugs (GROUP 2), presented with a higher average number of NORs in relation to others ($p < 0.05$). **Conclusions and Clinical Relevance:** The anti-HCV treatment may be related to increased cell proliferation of oral mucosa, indicating a possible relationship between OLP and HCV+ patients previously treated with interferon and ribavirin.

Key words: Hepatitis C; Lichen Planus; Cell Nucleolus; Cell Proliferation.

* Corresponding author:

Paulo Henrique Couto Souza

Professor Titular do Curso de Odontologia da Escola de Saúde e Biociências da PUCPR.

Rua Imaculada Conceição, 1555, 80215-901 - Curitiba/PR, Brasil. Tel.: (5541) 3271 2565 / Fax: (5541) 3271 1405

E-mail: couto.s@pucpr.br

⁵ To be published in Clinical Oral Investigations (ANNEX 1).

6.2. Introduction

Lichen Planus is a mucocutaneous disease of uncertain etiology which affects the oral mucosa [1]. The relationship between Oral Lichen Planus (OLP) and the Hepatitis C Virus (HCV) infection has been widely studied [2]. This relation suggests that HCV may be an etiological factor of OLP [3]. Thus, the analysis of patients with OLP and HCV-infected would be useful to clarify the relation between these diseases.

The Nucleolar Organizer Regions (NORs) are structures present within the nucleolus of interphase cells and pairs of acrocentric chromosomes 13, 14, 15, 21 and 22 in human cells in division [4]. Previous study [5] applied the AgNOR method on material of patients with OLP, oral keratosis and normal oral mucosa. As result, the authors report that the number of NORs of keratinocytes was significantly higher in patients with OLP when compared to other groups.

Despite several clinical studies have demonstrated an association between HCV infection and the presence of OLP [6-9], there are no studies to date linking the nucleolar condition of oral mucosa of patients with HCV and OLP.

Gandolfo et al [10] evaluated 402 patients with OLP and found that patients infected with HCV had a three times higher chance of developing oral cancer compared to non-infected. These results not only reinforce suspicions about the potential for malignant transformation of OLP, as they call attention to the participation of HCV in the canceration process.

Therefore, this study aimed to evaluate the cellular proliferative potential of OLP lesions from patients without HCV and the cellular proliferative potential of normal oral mucosa from patients with HCV, treated or untreated, by means of AgNOR method.

6.3. Materials and Methods

The study was approved by Ethics Committee of the University of Passo Fundo/Brazil (protocol No. 266/2011) and by the Group for Research of the Hospital São Vicente de Paulo de Passo Fundo/RS/Brazil (ANNEX 2). All subjects gave informed consent to participate (ANNEX 3).

A cross sectional observational histochemical study (AgNOR method) using the oral mucosa of four groups of patients was conducted as described below:

GROUPS 1 and 2 – Twenty HCV+ patients, confirmed by examining anti-HCV (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA) and HCV-RNA, treated at the Hospital São Vicente de Paulo de Passo Fundo/RS/Brazil, without clinical signs of OLP. In this group 10 patients had never been treated for HCV infection and 10 were under interferon and ribavirin treatment for a minimum period of three months;

GROUP 3 – Fifteen patients with reticular OLP, confirmed by histopathology, from the Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo/RS/Brazil. These patients did not have HCV infection, confirmed by anti-HCV exam;

GROUP 4 – Fifteen graduate students/professors from Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo/RS/Brazil, blood donors, without HCV infection, confirmed by anti-HCV test, and without clinical signs of OLP (Control Group).

Inclusion criteria for the study were: 1) patients with hepatitis C proven by means of ELISA and HCV-RNA (for HCV+ Groups), 2) patients with OLP clinically and histopathologically confirmed (for OLP+ Group), and 3) patients without HCV infection or OLP (for Control Group).

Exclusion criteria were: 1) patients with hepatitis C confirmed only by means of ELISA (for HCV+ Groups), 2) patients with metallic dental restorations or using drugs that could cause lichenoid lesions and 3) patients without hematological conditions (thrombocytes below $50.000/\text{mm}^3$ blood) (for OLP+ Group), 4) patients with HCV infection or OLP (for Control Group).

To perform the clinical and histopathological analyses of OLP lesions, the criteria proposed by Krutchkoff et al [11] and van der Meij and van der Waal [12] were used.

The mucosal samples to submit to the AgNOR method was collected by the technique of liquid-based cytology. For this, all patients were initially instructed to perform a mouth rinse with water to remove any food debris.

The collection of cells was performed with a kit system DNA-Citoliq[™] (Digene Corporation, Gaithersburg, USA), containing a liquid called Universal Collection Medium (UCM). This kit includes a vial containing 1 mL of UCM and a brush with a long handle.

The collection of oral mucosa cells was obtained by applying the brush and gently rotating clockwise movements (five laps). Then, the brush was dipped in the bottle containing UCM, remaining immersed in the liquid until the final processing. After collection, the bottle was shaken for 30 seconds to homogenize the material, which remained at room temperature (dry, fresh and protected from light) for a period shorter than three weeks, according to manufacturer's recommendations.

The processing of material consisted of his triple spin (1000 r.p.m.), the first only with UCM and the second and third ones with the sedimented material mixed with a fixative solution of acetic acid/methanol (3:1). Then, the sedimented material from each patient was dripped on a microscope slide and filled with the AgNOR method.

The use of AgNOR technique was carried out according to Ploton et al [13] and Nunes et al [14] studies with some modifications, as reported:

1) Obtaining the material sedimented by centrifugation and dripping on a microscope slide; 2) Preparation of solutions of silver for AgNOR, consisting of:

- solution A: 50 mL of Milli-Q water, 0.5 mL of formic acid and 1g of gelatin; this solution was kept in an incubator at 45 °C for 1h before incubation;

- solution B: 10 mL of distilled water and 5g of silver nitrate.

3) The solutions A and B were mixed and dripped onto the cellular material that was on the blade, staying for 30 minutes in an oven at 45 °C and further dried.

Count of NORs was performed on 100 epithelial cell nuclei per lesion. Two blind observers analyzed independently the silver-stained cells on microphotographs obtained with a digital camera (Canon™ Power Short A620, Canon of Brazil, São Paulo, SP, Brazil) fixed to a light microscope (Olympus™ BX 50, Olympus Corporation of the Americas, Center Valley, PA, USA) with immersion objective (1000×). To obtain the microphotographs, all the slides referent to each patient were analyzed horizontally from left to right and the nuclei of the first 100 non-overlapping, well-fixed nucleated cells were captured. The count of NORs was performed using the software Image Tool™ version 3.0 (Department of Dental Diagnostic Science at The University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA), in which the nucleus of each cell was "cut" through the tool "save selection as" having enlarged for better viewing (Fig. 1). Data for each case were related between the groups by Tukey HSD test (significance level of 95% - $p < 0.05$). Inter and intra-observer agreement were done by Dahlberg error.

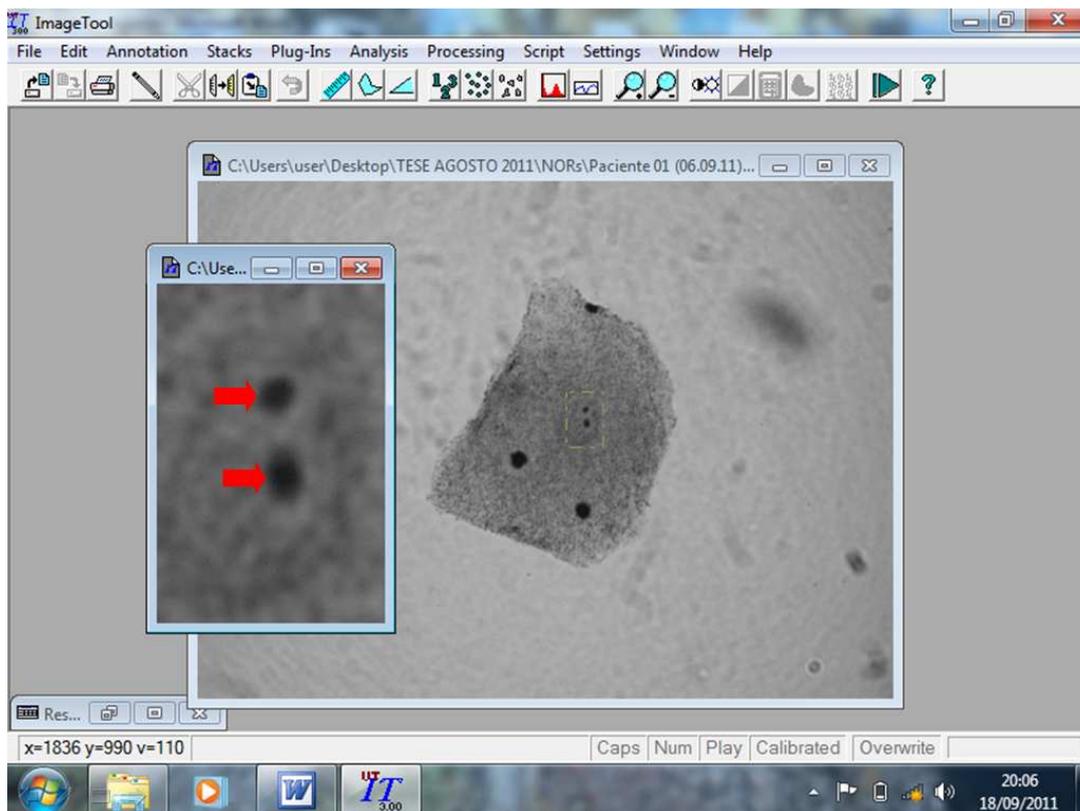


Figure 1 – Nucleus image "cut" and enlarged for counting of NORs (arrows) (AgNOR, 1000×, personal file)

6.4. Results

The NORs of 50 patients were recorded (100 nucleus from each patient), whose epidemiological characteristics are described in Table 1.

Table 1 – Description of the epidemiological data from all groups studied and statistical difference of mean number of NORs determined by Tukey HSD

| Group | n | Mean of NORs (in 100 cell nuclei) (\pm S.D.) | Sex | | Age mean (\pm S.D.) |
|--------------------------|----|---|-----|----|---------------------------|
| | | | F | M | |
| HCV+ untreated (Group 1) | 10 | 3.19 ^a (\pm 0.46) | 8 | 2 | 49.30 (\pm 11.91) |
| HCV+ treated (Group 2) | 10 | 4.08 ^b (\pm 0.59) | 4 | 6 | 53.10 (\pm 11.32) |
| OLP (Group 3) | 15 | 3.30 ^a (\pm 0.70) | 11 | 4 | 53.60 (\pm 18.43) |
| Control (Group 4) | 15 | 3.12 ^a (\pm 0.44) | 11 | 4 | 23.53 (\pm 5.78) |
| TOTAL | 50 | 3.38 (\pm 0.65) | 34 | 16 | 44.88 (\pm 18.75) |

^{a,b} Different letters indicate statistical difference between groups

Regarding the evaluations inter and intra-examiners, we note that Dahlberg error did not exceed 0.03% for both comparisons, indicating that the evaluators repeated the measurement with high reliability for the variable NORs in 100 nuclei [15,16] (Table 2).

Table 2 - Total variance, variance of error, Dalberg error, reliability coefficient of Pearson and correlation coefficient for variable NORs in 100 nuclei

| NORs in 100 nuclei | Total variance St^2 | Variance of error Se^2 | Dalberg error (%) | Reliability coefficient (%) | Correlation coefficient (%) |
|-------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Intraobserver Agreement | 0.863859 | 0.000185 | 0.021416 | 99.978584 | 99.980355 |
| Interobserver Agreement | 0.869192 | 0.000116 | 0.013346 | 99.986654 | 99.986396 |

Source: data search

Normality tests of Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk were applied to the average number of NORs of 100 nuclei for the 50 patients and indicated normal distribution of data, since p values was higher than 0.05. Furthermore, Levene's test showed homogeneity of variance among groups (Levene's test value = 1.3739; p = 0.2626).

When applying tests of “between-subjects effects” (ANOVA) to mean NORs in 100 cell nuclei obtained from each patient, it was observed a p -value = 0.00084 (F = 6.603), which indicated that the variable NORs shows some difference in values indices between the groups (test power of 96.08%). Then, the Tukey HSD multiple comparisons test was applied and showed that the mean of NORs in the group of HCV+ patients previously treated was significantly higher than others. Figure 2 shows the means of NORs in 100 nuclei of each case of studied groups, the confidence intervals of such groups and their statistical differences verified by Tukey HSD test.

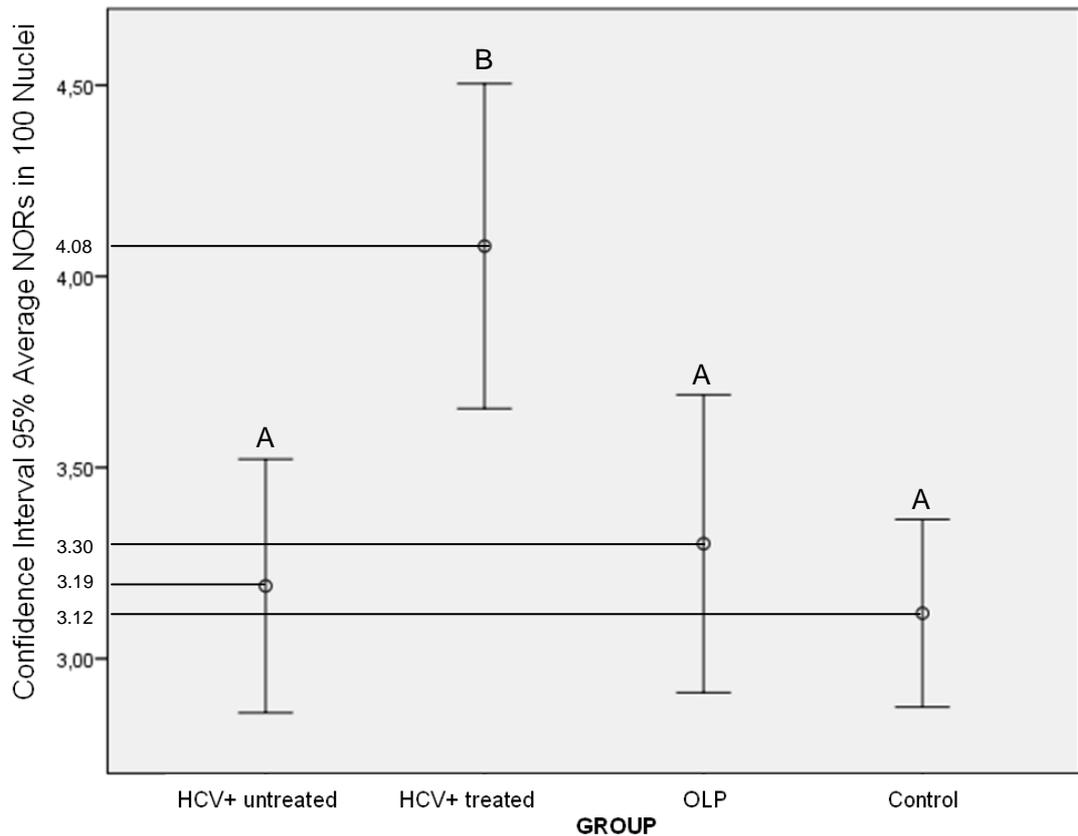


Figure 2 – Confidence intervals, means and statistical differences of the studied groups relative to mean of NORs in 100 nuclei at level of 95% (different letters indicate distinct statistical significance)

6.5. Discussion

Considering the studied groups in this work, it was possible to infer that HCV+ patients previously treated had a higher average number of NORs in relation to others, indicating a higher proliferative activity of tissue, probably due to the effect of anti-HCV treatment, which may, according to previous clinical studies [17-19], cause oral manifestations. However, in the current study we could not determine when the HCV infection has initiated, since hepatitis C is often a silent disease, delaying its diagnosis. Furthermore, it was not possible to standardize the patients as regards the duration of anti-HCV treatment performed. Thus, it is noteworthy that both the time of diagnosis of

HCV as the duration of anti-HCV treatment are factors that may influence the result of the number of NORs.

Our results suggest that the cellular proliferative activity higher in HCV+ patients previously treated may indicate a possible relationship between the latter condition and one of histopathological manifestations of OLP, the cell proliferative activity. In this sense, Schlesinger et al [17] described a case of LPB that started in a patient treated with interferon alfa-2b and Griffiths et al [18] stated that interferon can induce the expression of surface antigens on keratinocytes, which may play an important role in the origin of lichen planus. Still, for Sookoian et al [19], ribavirin increases the risk of adverse skin reactions, among them the LPB [20-22].

Strumia et al [23] reported that interferon may induce the migration of T cells to the skin due to their ability to stimulate keratinocytes to produce interleukin-2. Complementing this information, Mourad et al [24] affirmed that tumors of bone marrow interleukin-2 positive presented a significant major mean of NORs than healthy individuals, and Simark-Mattsson et al [25] stated that the OLP cells of all cases studied by them expressed mRNA for interleukin-2. The cellular events previously described, added to the histochemical results of this study suggest that interferon and/or ribavirin may increase the number of NORs per nucleus in oral mucosa cells, suggesting a possible relationship between anti-HCV treatment and LPB, clinical manifestation previously reported in the literature [17-19,22].

However, this increase in cell proliferative activity of HCV+ patients previously treated may also be associated with other oral diseases, such as oral dysplasia or carcinoma. Clinically basing this statement, Gandolfo et al [10] evaluated patients with OLP and monitored periodically. These authors reported that patients infected with HCV had a three times greater chance of developing oral cancer than those not infected.

Despite these results, the study of Gandolfo et al [10] did not mention whether or not the patients were under antiviral treatment for HCV, unlike the present study. These findings draw attention to the involvement of HCV in increased cell proliferation tissue.

We note also that the oral verrucous carcinoma and the squamous cell carcinoma have been described in patients infected with HCV, regardless of the presence of LPB [26,27]. Samples positive for HCV-RNA were detected in tissues of oral cancer [28] and OLP [29]. Some of HCV proteins, called "the core" and "the non-structural 3 protein", can accelerate the cell cycle *in vitro* [30,31]. Such statement may explain why patients HCV+ previously treated had a higher cell proliferative activity when compared to other groups.

Michele et al [32] evaluated 165 patients affected by chronic HCV infection and followed up by three years. Considering the type of antiviral therapy used to cure the chronic hepatitis, 36 of the patients were "virgins" of treatment, and the remaining 129 were under treatment or had already finished treatment without clearance of the virus. The only two patients that presented lesions of OLP were conducting treatment with interferon and ribavirin during the exam. The authors affirmed that the possible risk factors associated with the presence of OLP indicated that only HCV chronic infection was statistically significant ($p < 0.05$). Based on the results of the clinical study of Michele et al [32] and on histochemical results of our study, it can be suggested that there might be a possible link between anti-HCV treatment and OLP.

In this study, the average number of NORs in the group of patients with OLP (3.30) was statistically equivalent to that of control patients (3.12) and HCV+ patients with no previous treatment (3.19), and below to the group of HCV+ patients previously treated (4.08). This result is different from that obtained by Silva Fonseca and Carmo [5], who affirmed that the average number of NORs was statistically higher in cases of

OLP than in patients with normal oral mucosa. However, these authors conducted the silver impregnation on tissue preserved in formaldehyde, stored in paraffin, and not on material from cytology as in the present study, which may have influenced the difference in results.

6.6. Conclusion

The anti-HCV treatment might play a role on oral cell proliferative activity, justifying further longitudinal studies to confirm a possible higher prevalence of OLP in HCV+ patients under treatment. However, other oral diseases, neoplastic for example, may also be related to increased cell proliferation observed in the present study in HCV+ patients under antiviral treatment, which must be carefully researched ahead of the possible relationship between OLP and HCV.

6.7. References

1. Grossmann SMC, Aguiar MCF, Teixeira R, Carmo MAV (2007) Oral lichen planus and chronic hepatitis C – a controversial association. *Am J Clin Pathol* 127(5):800-804
2. Randazzo AR, Amormino SAF, Martins CR (2005) Oral lichen planus and hepatitis C: a literature review. *Rev Clín Pesq Odontol* 1(3):37-40
3. Carrozzo M, Thorpe R (2009) Oral lichen planus: a review. *Minerva Stomatol* 58(10):519-37
4. Anastassova-Kristeva M (1977) The nucleolar cycle in man. *J Cell Sci* 25:103-110
5. Silva Fonseca LM, Carmo MAV (2001) Identification of the AgNORs, PCNA and ck16 proteins in oral lichen planus lesions. *Oral Diseases* 7(6):344–348
6. Grossmann SMC, Teixeira R, Aguiar MCF, Moura MDG, Carmo MAV (2009) Oral mucosal conditions in chronic hepatitis C Brazilian patients: a cross-sectional study. *J Public Health Dentistry* 69(3):168-175

7. Bermejo-Fenoll A, Sánchez-Siles M, López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Salazar-Sánchez N (2010) A retrospective clinicopathological study of 550 patients with oral lichen planus in south-eastern Spain. *J Oral Pathol & Medicine* 39(6):491-496
8. Birkenfeld S, Dreiherr J, Weitzman D, Cohen AD (2010) A study on the association with hepatitis B and hepatitis C in 1557 patients with lichen planus. *JEADV* 1-5. doi: 10.1111/j.1468-3083.2010.03809.x
9. Vachiramon V, Suchonwanit P, Thadanipon K (2010) Bilateral linear lichen planus pigmentosus associated with hepatitis C virus infection. *Case Rep Dermatol* 2:169-172
10. Gandolfo S, Richiardi L, Carrozzo M, Brocchetti R, Carbone M, Pagano M et al (2004) Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncology* 40(1):77-83
11. Krutchkoff D, Cutler L, Laskowski S (1978). Oral lichen planus: the evidence regarding potential malignant transformation. *J Oral Pathol Med* 7:1-7.
12. van der Meij EH, van der Waal I (2003). Lack of clinicopathological correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available criteria and suggestion for modification. *J Oral Pathol Med* 32: 507-512.
13. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ (1986) Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region of the optical level. *Histochem J* 8(1):5-14
14. Nunes FD, Pinto Jr, DS, Araujo NS et al (1991) Morphological study and optimization of the AgNOR technique. In: Meeting of the Brazilian Society for Dental Research. Proceedings of SBPqO, São Paulo
15. Midtgard J, Björk G, Linder-Aronson S (1974) Reproducibility of cephalometric landmarks and errors of measurements of cephalometric cranial distances. *Angle Orthod* 4(1):56-62
16. Houston WJB (1983) The analysis of error in orthodontic measurements. *Am J Orthod* 83(2):382-390
17. Schlesinger TE, Camisa C, Gay JD, Bergfeld WF (1997) Oral erosive lichen planus with epidermolytic hyperkeratosis during interferon alfa-2b therapy for chronic hepatitis C virus infection. *J Am Acad Dermatol* 36(6):1023-1025
18. Griffiths CE, Voorhees JJ, Nickoloff BJ (1989) Characterization of intracellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. *J Am Acad Dermatol* 20(4):617-629

19. Sookoian S, Neglia V, Castano V, Frider B, Kien MC, Chohela E (1999) High prevalence of cutaneous reactions to interferon alfa plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C virus. *Arch Dermatol* 135(8):1000–1001
20. Manjon-Haces JA, Vazquez-Lopez F, Gomez-Diez S, Hidalgo-García A, Pérez-Alvarez R, Soler-Sánchez T et al (2001) Adverse cutaneous reactions to interferon Alfa-2b plus ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus (letter). *Acta Derm Venereol* 81(3):223
21. Harden D, Skelton H, Smith KJ (2003) Lichen planus associated with hepatitis C virus: no viral transcripts are found in the lichen planus, and effective therapy for hepatitis C virus does not clear lichen planus. *J Am Acad Dermatol* 49(5):847–852
22. Nagao Y, Kawaguchi T, Ide T, Kumashiro R, Sata M (2005) Exacerbation of oral erosive lichen planus by combination of interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Int J Mol Med* 15(2):237–241
23. Strumia R, Venturini D, Boccia S, Gamberini S, Gullini S (1993) UVA and interferon-alfa therapy in a patient with lichen planus and chronic hepatitis C [letter]. *J Dermatol* 32(5):386
24. Mourad WA, Pugh WC, Huh YO, Keating MJ (1994) Cell kinetic analysis of interleukin-2 receptor-tested chronic lymphocytic leukemia using the AgNOR silver stain. *Am J Clin Pathol* 101(3):300-304
25. Simark-Mattsson C, Bergenholtz G, Jontell M, Eklund C, Seymour GJ, Sugerman PB (1999) Distribution of interleukin-2, -4, -10, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta mRNAs in oral lichen planus. *Arch Oral Biol* 44(6):499-507
26. Carrozzo M, Gandolfo S, Carbone M, Colombatto P, Olivieri F (1997) An atypical verrucous carcinoma of the tongue arising in a patient with oral lichen planus and hepatitis C virus infection. *Oral Oncol* 33(3):220-225
27. Nagao Y, Sata M, Tanikawa K, Itoh K, Kameyama T (1995) Lichen planus and hepatitis C virus in the northern Kyushu region of Japan. *Eur J Clin Invest* 25(12):910–914
28. Nagao Y, Sata M, Noguchi S, Seno'o T, Kinoshita M, Kameyama T et al (2000) Detection of hepatitis C virus RNA in oral lichen planus and oral cancer tissues. *J Oral Pathol Med* 29(6):259-266
29. Arrieta JJ, Rodriguez-Iñigo E, Casqueiro M, Bartolomé J, Manzarbeitia F, Herrero M et al (2000) Detection of hepatitis C virus replication by in situ hybridization in epithelial cells of anti-hepatitis C virus-positive patients with and without oral lichen planus. *Hepatology* 32(1):97-103

30. Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T (1995) Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 69(6):3893-3896
31. Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R (1996) Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 70(7):4438-4443
32. Michele G, Carlo L, Mario MC, Giovanni L, Pasquale M, Alessandra M (2007) Hepatitis C virus chronic infection and oral lichen planus: an Italian case-control study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 19(8):647-652