UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

JULIE ANE MARIA GONÇALVES

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TECIDUAL DOS LIGANTES DE MORTE PROGRAMADA-1 e -2, DO RECEPTOR PD-1 E DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CITOTÓXICA NO LÍQUEN PLANO ORAL

Goiânia
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DETESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG),regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a titulo de divulgação da produção cientifica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromissode que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. **Identificação do material bibliográfico**

[x] Dissertação [ ] Tese

2. Nome completo do autor Julie Ane Maria Gonçalves

3. Título do trabalho

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TECIDUAL DOS LIGANTES DE MORTE PROGRAMADA-1 e -2, DO RECEPTOR PD-1 E DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CITOTÓXICA NO LÍQUEN PLANO ORAL

4. **Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)**

Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [ ] NÃO[1]

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período,a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista cientifica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **Nádia Do Lago Costa**, **Professora do Magistério Superior**, em 06/08/2022, às 10:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **JULIE ANE MARIA GONÇALVES**, **Discente**, em 08/08/2022,às 16:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº

10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1820205** eo código CRC **2FACF08C**.

Referência: Processo nº 23070.020085/2020-76

SEI nº 1820205

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

JULIE ANE MARIA GONÇALVES

Avaliação da expressão tecidual dos ligantes de morte programada-1 e -2, do receptor PD-1 e da resposta imunológica citotóxica no líquen plano oral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica.

Linha de Pesquisa: Alterações do Sistema Estomatognático

Orientadora: Profa. Dra. Aline Carvalho Batista

Co-orientadora: Profa. Dra. Nádia do Lago Costa

Goiânia

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Gonçalves, Julie Ane Maria
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TECIDUAL DOS LIGANTES DE MORTE PROGRAMADA-1 e -2, DO RECEPTOR PD-1 E DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CITOTÓXICA NO LÍQUEN PLANO ORAL
[manuscrito] / Julie Ane Maria Gonçalves. - 2023.
LII, 52 f.: il.

Orientador: Prof. Aline Carvalho Batista; co-orientador Nadia do Lago Costa.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Odontologia (FO), Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Goiânia, 2023.
Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **228** da sessão de Defesa de Dissertação de **Julie Ane Maria Gonçalves**, que confere o título de Mestre em **Odontologia**, na área de concentração em **Clínica Odontológica**.

Aos **vinte e nove dias do mês de maio de 2020**, a partir das **14:30**, por meio de **videoconferência (https://meet.google.com/evw-cgpw-bdo),** realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **"AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TECIDUAL DOS LIGANTES DE MORTE PROGRAMADA-1 e -2, DO RECEPTOR PD-1 E DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CITOTÓXICA NO LÍQUEN PLANO ORAL"**. Os trabalhos foram instalados pela Coorientadora, Professora Doutora **Nádia do Lago Costa (PPGO/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor **Elismauro Francisco de Mendonça (PPGO/UFG)**, membro titular interno; Professora Doutora **Éricka Janine Dantas da Silveira (PPGO/UFRN)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendosido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora **Nádia do Lago Costa**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se apresente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **vinte e nove dias do mês de maiode 2020**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Documento assinado eletronicamente por **ERICKA JANINE DANTAS DA SILVEIRA**, **Usuário Externo**,em 27/10/2022, às 04:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Nádia Do Lago Costa**, **Professora do Magistério Superior**,em 27/10/2022, às 06:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4 º doDecreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Elismauro Francisco De Mendonça**, **Professor doMagistério Superior**, em 31/10/2022, às 17:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamentono § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site: https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3292944** eo código CRC **E6CC9396**.**Referência:**

Processo nº 23070.020085/2020-76 SEI nº 3292944

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

Aluna: Julie Ane Maria Gonçalves
Orientadora: Profª. Drª. Aline Carvalho Batista
Coorientadora: Profª. Drª. Nádia do Lago Costa

MEMBROS:
Profª. Drª. Nádia do Lago Costa (Coorientadora)
Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça
Profª. Drª. Éricka Janine Dantas da Silveira

MEMBROS SUPLENTES:
Prof. Dr. Brunno Santos de Freitas Silva
Profª. Drª. Fernanda Paula Yamamoto Silva

Data: 29/05/2020

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG), na pessoa da diretora **Profa. Dra. Enilza Maria Mendonça de Paiva**.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FO/UFG, na pessoa da coordenadora **Profa. Dra. Nádia do Lago Costa**.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq), à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES), à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás** pelo financiamento do estudo.

Ao Centro Goiano de Doenças da Boca (CGDB), na pessoa do **Prof. Dr. Elismauro Francisco Mendonça**.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe **Nailta Maria Gonçalves** (*in memorian)*, ao meu avô **Livertino Domingos Gonçalves** (*in memorian)* e à minha avó **Ana Maria Gonçalves**, por todo esforço e sacrifício pra que eu pudesse chegar até aqui. Saibam que todas as minhas conquistas são suas também. Que o tempo possa me permitir retribuir a vocês tudo o que fizeram e fazem por mim até hoje. Amo vocês.

À **Profa. Dra. Aline Carvalho Batista** *(in memorian)*, pela oportunidade e confiança e por ter sido uma orientadora tão disponível e disposta a contribuir com o meu crescimento intelectual e acadêmico. Tenho um enorme carinho, respeito e admiração pela professora, pesquisadora e pessoa que a senhora foi. Mesmo vivendo o pior que uma pessoa pôde viver, a senhora sempre se manteve dedicada e entusiasmada com a pesquisa e seus alunos. Sempre me lembrarei da senhora como um exemplo de força e perseverança. Apesar de todas as dificuldades, os momentos sob sua orientação foram sempre muito inspiradores e insubstituíveis. Muito obrigada!

À **Profa. Dra. Nádia do Lago Costa**, pela paciência, compreensão, generosidade e por ser apoio em todos os momentos difíceis que passamos ao longo desses anos.

À **Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves**, por todo o carinho, segurança, confiança, motivação e reconhecimento. Um dos maiores prazeres durante minha trajetória na Pós-Graduação foi conhecer e trabalhar ao lado de uma mulher como a senhora. Meu exemplo de profissionalismo, competência, humanidade e respeito. Obrigada por tudo!

Aos professores **Dra. Mayara Barbosa Viandelli Mundim-Picoli e Me. Fernando Fortes Picoli**, por toda contribuição e incentivo desde a época da graduação. Obrigada por acreditarem em mim. Vocês sempre serão muito queridos e lembrados com muito carinho e gratidão.

Ao **Prof. Dr. Wilson Martinez Junior**, por me ajudar a decidir quem eu queria me tornar. É com muito carinho e emoção que me lembro de uma conversa que lançou luz no meu caminho através da sua experiência e sensibilidade, me fazendo optar pelos caminhos da patologia e da docência. Serei eternamente grata.

Ao **Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça**, pela colaboração, incentivo e convívio. O senhor é uma pessoa muito gentil e sempre foi muito agradável estar perto do senhor.

Aos meus amigos **Sara Lia Gonçalves de Lima, Eduardo Antônio Rosa, Carla Mosconi** e **Sebastião Silvério de Sousa Neto** por terem sido uma valiosa rede de apoio a todos os meus momentos de dificuldades e incertezas. Obrigada pela amizade, pelos conselhos, desabafos e palavras positivas. Se eu não desisti foi graças a vocês.

Aos funcionários da Universidade Federal de Goiás **Gláucia Terra e Silva, Cláudia Duarte Silva, Erildo Ribeiro da Silva e Mariana Batista Rodrigues Faleiro** pela gentileza e disponibilidade em me ajudar todas as vezes que precisei.

RESUMO

Introdução/Justificativa*:** Líquen plano oral (LPO) é uma doença crônica, mediada por linfócitos T (LT) e caracterizada pela apoptose dos queratinócitos basais/suprabasais. Apesar de sua etiopatogenia não estar completamente elucidada, dados recentes revelam que o bloqueio de moléculas imunoregulatórias tais como ligantes de morte programada (PD-Ls) e/ou do receptor PD-1, pode contribuir com o desenvolvimento de lesões semelhantes ao LPO. Está classicamente estabelecido que essa via PD-Ls/PD-1 contribui para a evasão de células neoplásicas; todavia, pode ser também importante na regulação de LT helper e citotóxicos ($CD8^+$) em doenças autoimunes. ***Objetivo: Investigar a expressão tecidual das moléculas PD-L1 e PD-L2, bem como das populações de células $PD\text{-}1^+$, $CD8^+$ e granzima B^+ (GrB) em LPOs e a relação dessas proteínas imunoinibitórias/populações celulares com a severidade do LPO. ***Material e métodos:*** Pacientes com LPO (n=23) foram incluídos no estudo e classificados de acordo com os critérios clínicos e histopatológicos da Associação Americana de Patologia Oral e Maxilofacial (AAOMP/2016). Posteriormente, espécimes teciduais das lesões foram submetidas à técnica de imunoistoquímica. Análise semi-quantitativa ($PD\text{-}L1^+$ e $PD\text{-}L2^+$) e quantitativa (células $PD\text{-}1^+$, $CD8^+$ e GrB^+) foram executadas. A severidade do LPO foi avaliada pelo subtipo clínico, sintomatologia e resposta à corticoterapia. ***Resultados***: A maioria das amostras de LPO foram consideradas negativas para PD-L1 (n=14/22; 63,7%), entretanto elevada expressão de PD-L2 (n=19/22; 86,3%), tanto pelos queratinócitos quanto pelas células imuneinflamatórias, foi demonstrada. Em adição, a densidade de células $PD\text{-}1^+/mm^2$ (subepitelial: 70,2 e intraepitelial: 7,4) foi reduzida se comparada a de LT $CD8^+/mm^2$ (subepitelial: 1047,4 e intraepitelial: 197,7) ($p < 0,01$). Baixa resposta imunológica citotóxica (relação CD8/GrB por mm^2) foi evidenciada nas amostras de LPO (subepitelial: 1047,4/140,6 e intraepitelial: 197,7/41,6) ($p < 0,05$). Houve um número significativamente menor de células GrB^+ na região intraepitelial no LPO reticular se comparado ao LPO erosivo/bolhoso (p= 0,03). ***Conclusões:*** Os achados revelam que a via PD-L1/PD-1 parece estar comprometida no LPO devido à baixa expressão de PD-L1 e a escassez de células $PD\text{-}1^+$ na maioria das amostras. Por outro lado, a superexpressão de PD-L2 somada a uma possível regulação da resposta imunológica citotóxica sugere uma tolerância imunológica que pode contribuir com o perfil crônico do LPO.

Palavras-chave: líquen plano oral, linfócitos T citotóxicos, granzima B, tolerância imunológica, receptor de morte programada-1, ligante de morte programada-1, ligante de morte programada-2.

ABSTRACT

Introduction/Justification: Oral lichen planus (OLP) is a chronic autoimmune disease, mediated by T lymphocytes (TL) and characterized by apoptosis of basal/suprabasal keratinocytes. Although its etiopathogenesis is not completely elucidated, recent data reveal that blocking immunoregulatory molecules such as programmed death ligands (PD-Ls) and/or PD-1 receptor may promote the appearance of oral lichen planus-like lesions. It is classically established that this PD-Ls/PD-1 pathway contributes to evasion of neoplastic cells; however, it may be important in the regulation of helper and cytotoxic ($CD8^+$) TL in autoimmune diseases. **Objective:** To investigate the tissue expression of PD-L1 and PD-L2 molecules, as well as $PD\text{-}1^+$, $CD8^+$ and granzyme B^+ (GrB) cell populations in OLPs and whether there is a relationship between these immunoinhibitory proteins/cell populations and the severity of OLP. **Material and methods:** Samples of OLP patients (n = 23) were classified according to the histopathological criteria of the American Association of Oral and Maxillofacial Pathology (AAOMP/2016) and submitted to immunohistochemistry. Semi-quantitative ($PD\text{-}L1^+$ and $PD\text{-}L2^+$) and quantitative analysis ($PD\text{-}1^+$, $CD8^+$ and GrB^+ cells) were performed. The severity of OLP was assessed by clinical subtype, symptomatology and response to corticosteroid therapy. **Results:** Most OLP samples were considered negative for PD-L1 (n = 14/22; 63.7%), however high PD-L2 expression (n = 19/22; 86.3%) by both keratinocytes and immunoinflammatory cells has been demonstrated. Low cytotoxic immune response (CD8/GrB ratio per mm^2) was evidenced in OLP samples (subepithelial: 1047.4/140.6 and intraepithelial: 197.7/41.6). In addition, $PD\text{-}1^+/mm^2$ (subepithelial: 70.2 and intraepithelial: 7.4) cell density was reduced compared to $CD8^+/mm^2$ LT (subepithelial: 1047.4 and intraepithelial: 197.7) ($p < 0.01$). There was a significantly lower number of GrB^+ cells in the intraepithelial region in reticular OLP compared to erosive / bullous OLP ($p = 0.03$). **Conclusions:** The findings show that the PD-L1 / PD-1 pathway seems to be compromised in OLP due to low PD-L1 expression and PD-1 + cell scarcity in most samples. On the other hand, PD-L2 overexpression added to a possible regulation of cytotoxic immune response suggests an immune tolerance that may contribute to the chronic profile of OLP.

Keywords: oral lichen planus, cytotoxic T lymphocytes, granzyme B, immunological tolerance, programmed-death receptor-1, programmed-death ligand-1, programmed-death ligand-2.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOMP	American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology (Academia Americana de Patologia Oral e Maxilofacial)
APC	Antigen-presenting cell (Células apresentadoras de antígenos)
BCR	B-cell receptor (Receptor de célula B)
CD 4	Cluster of differentiation 4 (Cluster de diferenciação 4)
CD 8	Cluster of differentiation 8 (Cluster de diferenciação 8)
CGDB	Centro Goiano de Doenças da Boca
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico)
CD	Dendritic cells (Células dendríticas)
FO/UFG	Faculdade de Odontologia/Universidade Federal de Goiás
GrB	Granzyme B (Granzima B)
HE	Hematoxilina e Eosina
IFN-α	Interferon alfa
IFN-γ	Interferon Gama
IL-2	Interleukin-2 (Interleucina-2)
IL-4	Interleukin-4 (Interleucina-4)
IL-7	Interleukin-7 (Interleucina-7)
IL-8	Interleukin-8 (Interleucina-8)
IL-10	Interleukin-10 (Interleucina 10)
IL-12	Interleukin-12 (Interleucina-12)
IL-15	Interleukin-15 (Interleucina-15)
IL-18	Interleukin-18 (Interleucina-18)
IL-21	Interleukin-21 (Interleucina-21)
LPO	Líquen Plano Oral
LT	Linfócito T
LTC	Linfócitos T citotóxico
NK	Natural Killers
PD-1	Programmed cell death protein-1 (Proteína de morte celular programada 1)

PD-L1	Programmed cell death ligand-1
	(Ligante de morte celular programada 1)
PD-L2	Programmed cell death ligand-2
	(Ligante de morte celular programada 2)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase (Fosfatidilinositol 3-Quinase)
TCR	Receptor de célula T
TLR9	Toll-like receptor 9 (Proteínas receptoras Toll-like 9)
Treg	Regulatory T cell (Célula T regulatória)
TGF-β	Transforming growth factor beta
	(Fator de transformação do crescimento beta)
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha (Fator de necrose tumoral alfa)
ZAP-70	Zeta-chain-associated protein kinase 70
	(Proteína 70 associada à cadeia zeta)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
2 REFERENCIAL TEÓRICO 21
2.1. Líquen Plano Oral: epidemiologia e características clínicopatológicas 21
2.2. Etiopatogenia e tratamento do Líquen Plano Oral 23
2.3. Tolerância imunológica 26
2.4. PD-1 / PD-Ls: expressão e mecanismos de regulação 27
2.5. Vias PD-L1/PD-L2-PD-1 e o LPO 29
3 OBJETIVOS 31
3.1. Objetivo Geral 31
3.2. Objetivos Específicos 31
4 METODOLOGIA 32
4.1. Tipo de Estudo, Local do Estudo e Aspectos Éticos 32
4.2. Obtenção, seleção e caracterização da amostra 32
4.3. Técnicas Empregadas 33
4.3.1. Hematoxilina e Eosina 33
4.3.2. Técnica da Imunoistoquímica 33
4.4. Análise dos dados 33
5 ARTIGO 35
REFERÊNCIAS (Dissertação) 52
ANEXOS 58
ANEXO A - Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa 58
ANEXO B – Normas da Revista Oral Diseases 64
APÊNDICES 67

1 INTRODUÇÃO

O Líquen Plano Oral (LPO) é uma doença crônica, imunomediada, de etiologia ainda incerta, caracterizada pela destruição dos queratinócitos da camada basal/suprabasal (PAYERAS et. al., 2013; KURAGO, 2016). Clinicamente o LPO pode se apresentar, principalmente, em sua forma reticular ou erosiva (SANKETH; PATIL; SWETHA, 2016; CHENG et. al., 2016; KURAGO, 2016). O LPO reticular é geralmente assintomático, mas as formas atróficas e erosivas podem apresentar sintomatologia de queimação e dor persistente, associadas a períodos de remissão e exacerbação, comprometendo negativamente a qualidade de vida dos pacientes (CHENG et. al., 2016; KURAGO, 2016).

Apesar de a etiologia não estar totalmente elucidada, a patogênese parece se desenvolver como uma resposta a autoantígenos, envolvendo a participação de citocinas características da resposta imune tipo 1 [interferons (IFN), IL-12, TNF-α, entre outras] que ativam os linfócitos T citotóxicos $CD8^+$ (LTC) e determinam a apoptose dos queratinócitos basais pela liberação de perforinas e granzimas (PAYERAS et. al., 2013; KURAGO, 2016; CHENG et. al., 2016; CHIANG et. al., 2018).

O LTC possui receptores coestimulatórios e coinibitórios, ambos da família CD28, fundamentais para a regulação da resposta imunológica. Esses receptores ou checkpoints imunológicos incluem o antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) e o receptor de morte programada 1 (PD-1) que, juntamente com os seus ligantes PD-L1 ou PD-L2, promovem a inibição dos LTCs (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2015; WAKADE et. al., 2016). Desta forma, as vias PD-1/PD-L1 ou PD-1/PD-L2, através da inibição de linfócitos T autorreativos, constituem um importante mecanismo de resistência à autoimunidade (OKASAKI; HONJO, 2007; FRANCISCO et. al., 2010). Além disso, essas vias imunomodulatórias também promovem o desenvolvimento, manutenção e melhoria da função de células T regulatórias ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) que participam da manutenção da auto tolerância imunológica e controle das respostas autoimunes (FRANCISCO et. al., 2010).

A expressão dessas moléculas inibitórias foi identificada em mucosas saudáveis, indicando o possível papel na vigilância imunológica e controle de doenças autoimunes (RITPRAJAK; AZUMA, 2015). Ritprajak e Azuma (2015) também relataram que, sob condições inflamatórias, várias citocinas (especialmente a IFN-γ) são capazes de aumentar a expressão de PD-L1 tanto em células normais quanto em células tumorais. Desta forma, moléculas imunoinibitórias como o PDL-1 e PDL-2 apresentam funções dicotômicas, pois

podem contribuir tanto no controle de respostas autoimunes quanto na evasão de células mutadas (OKASAKI; HONJO, 2007; FRANCISCO et. al., 2010).

Alguns estudos realizados com LPO a partir de modelos experimentais *in vitro* demonstraram o papel da via PD-1/PD-L1 na manutenção da tolerância periférica por participar da regulação negativa da produção de citocinas e proliferação de LT e que o bloqueio dessa via aumenta a produção e secreção de IFN-γ e IL-2 (YOUNGNAK–PIBOONRATANAKIT et. al., 2004; ZHOU et. al., 2012). Pesquisas recentes também demonstraram que o bloqueio das vias PD-1/PDL1 por imunoterápicos para tratamento de neoplasias malignas induziram efeitos adversos característicos de doenças autoimunes, incluindo lesões liquenóides em pele e mucosas, indicando mais uma vez que um possível comprometimento dessa via pode impactar a regulação do sistema imunológico (HOFMANN et. al., 2016; SCHABERG et. al., 2016; WAKADE et. al., 2016).

Considerando estes dados e a elevada atividade citotóxica do LPO (TRAPANI et. al., 2000; COSTA et. al., 2011; JAVVADI et. al., 2016), a hipótese do presente estudo é de que uma redução da expressão de PD-L1 e PD-L2 associada à elevada resposta imunológica citotóxica, sobretudo nos LPOs clinicamente mais severos, ocorrerá nesta patologia. Assim, objetivamos neste estudo investigar o potencial imunoinibitório do LPO e se há relação dessas moléculas com o perfil da resposta imunológica citotóxica e severidade da doença.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Líquen Plano Oral: epidemiologia e características clínicopatológicas

O Líquen Plano Oral (LPO) é uma doença imunomediada que afeta 0,22% a 5% da população, com maior prevalência em indivíduos do sexo feminino e faixa etária de trinta a oitenta anos de idade (CHENG et. al., 2016; CHIANG et. al., 2018). Abordando especificamente a prevalência global de LPO, uma recente revisão sistemática com meta-analise observou que após os 40 anos o risco de desenvolvimento do LPO é 3,43 vezes maior que em paciente com menos de 40 anos e que a prevalência de LPO aumenta significativa e progressivamente com o avanço da idade (GONZALEZ-MOLES et. al., 2020)

Apesar de ser considerada pela OMS como uma desordem potencialmente maligna a malignização do LPO ocorre em 0,8% a 12,5% dos pacientes e esta relacionada principalmente às lesões erosivas. Além disso, na maioria dos casos o diagnóstico do LPO é majoritariamente clinico e a deficiência em estudos abordando a malignização desta patologia com casos de LPO confirmados por analise anatomopatológica aumenta o risco de imprecisão diagnóstica e confusão com outras patologias também potencialmente malignizáveis (AU, PATEL, CAMPBELL, 20,13; CHENG et. al., 2016; CHIANG et. al., 2018; GOROUHI et. al., 2014).

O LPO pode apresentar manifestação clinica variada reconhecida em seis padrões clínicos que podem manifestar-se isolada ou concomitantemente: reticular, erosivo, atrófico, tipo placa, papular e bolhoso. A forma reticular é a mais comum e é caracterizada clinicamente por estrias brancas bilaterais localizadas principalmente na mucosa jugal, língua e lábios (DILLENBURG et. al., 2015; CHENG et. al., 2016; CHIANG et. al., 2018). Lesões esbranquiçadas e homogêneas localizadas na superfície dorsal da língua com manifestação clínica concomitante ou da forma reticular ou erosiva na mucosa jugal sugerem o diagnóstico clínico de LPO tipo placa. A forma reticular pode ainda ser acompanhada de pápulas localizadas na mucosa jugal e este tipo é denominado LPO papular (PAYERAS et. al., 2013; CHIANG et. al., 2018).

Já as lesões erosivas, classificadas clinicamente como LPO erosivo ou LPO atrófico, apresentam sintomas que podem variar desde um pequeno desconforto a episódios de dor intensa (PAYERAS et. al., 2013; DILLENBURG et. al., 2015). Dependendo da gravidade, o padrão erosivo ou atrófico pode apresentar microscopicamente uma grande área de separação entre o epitélio e o tecido conjuntivo subjacente, manifestando-se clinicamente como lesões

vesiculo-bolhosas que podem se romper espontaneamente e causar ulcerações extremamente dolorosas. Este tipo clínico é denominado LPO bolhoso. As lesões de LPO quando afetam a gengiva podem estar associadas à gengivite descamativa, o que dificulta o diagnóstico de LPO uma vez que outras doenças também podem apresentar esta condição (CHENG et. al., 2016; CHIANG et. al., 2018).

Aproximadamente dois terços dos pacientes apresentam-se sintomáticos, sendo que os sintomas descritos podem aparecer espontaneamente ou após o contato com temperos e alimentos ácidos. Estes sintomas variam desde sensação de rugosidade na mucosa, redução da flexibilidade com limitação da abertura bucal, ardência, queimação e episódios de dor intensa. Em geral, estes sintomas tendem a desaparecer de forma espontânea em até duas semanas. Quando há ausência de sintomatologia, o tratamento não é necessário (CHENG et. al., 2016; CHIANG et. al., 2018).

Em relação às características histológicas do LPO, estas incluem a presença de hiperqueratose, liquefação da camada basal, presença de corpos de *Civatte* e infiltrado predominantemente linfocitário em banda subjacente a lâmina própria. Entretanto, este padrão inflamatório também é encontrado na microscopia de doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso, e em outras condições orais com características liquenóides. Outros achados microscópicos do LPO incluem alterações na conformação das cristas epiteliais (cristas em "dentes de serra"), ulceração, atrofia ou acantose e depósito eosinofílico homogêneo na junção epitélio-conjuntivo (CHENG et. al., 2016; CHIANG et. al., 2018).

Devido às características microscópicas serem bastante variáveis no LPO, a Academia Americana de Patologia Oral e Maxilofacial (AAOMP) propôs em 2016 os seguintes critérios morfológicos a serem considerados para o diagnóstico histológico: destruição dos queratinócitos da camada basal, infiltrado predominantemente linfocitário em banda localizado em lâmina própria, exocitose de linfócitos e ausência de displasia epitelial. Em adição a esses critérios e com o objetivo de padronizar e orientar o diagnóstico clínico do LPO a AAOMP/2016 também propôs os seguintes critérios clínicos: distribuição multifocal e simétrica das lesões (estas devem ser compatíveis com pelo menos um dos seis tipos clínicos do LPO), as lesões não devem estar em contato com restaurações e o aparecimento destas não pode estar relacionado ao uso de medicamentos, tabaco ou canela. Segundo a AAOMP/2016, ambos estes critérios devem ser considerados e correlacionados para a conclusão do diagnóstico do LPO (CHENG et. al., 2016; CHIANG et. al., 2018).

Por apresentar características clínicas variadas de paciente para paciente, subtipos clínicos também variados com possibilidade de manifestação simultânea, além de períodos de remissão e exacerbação, o manejo clínico dos pacientes portadores de LPO constitui um desafio para o clínico e esse fato está associado ao mecanismo de desenvolvimento desta condição (OBERTI et. al., 2019).

2.2. Etiopatogenia e tratamento do Líquen Plano Oral

Sabe-se que LPO é composto por um infiltrado inflamatório mononuclear, predominantemente linfocitário, sendo esta uma das principais características microscópicas dessa patologia. Encontra-se bem estabelecido na literatura que os T CD8+ (LTCs) constituem o principal tipo de células inflamatórias encontradas em lesões de LPO, juntamente com os linfócitos T $CD4^+$. Os linfócitos T $CD4^+$ são capazes de diferenciar-se em diversos subgrupos celulares, como T helper 1 e T regulatórias (Tregs), as quais produzem citocinas específicas capazes de promover tanto a ativação dos LTCs quanto a regulação destes a partir de efeitos imunossupressores, garantindo a manutenção da tolerância periférica e homeostasia do sistema imune de forma geral (NICO et. al., 2011; PAYERAS et. al., 2013; CHENG et. al., 2016).

Estudos sugerem que a patogênese do LPO parece desenvolver-se como uma resposta antígeno-específica a partir da expressão de um ou mais antígenos por queratinócitos basais às células dendríticas (CD) ou células apresentadoras de antígenos (APCs). As CD desempenham um importante papel no sistema imune, pois, além de agir nos mecanismos de tolerância e regulação da imunidade pela ativação das Tregs, são capazes de promover a resposta imunológica em um contexto de inflamação, infecção ou tumor. As células dendriticas plasmocitóides, uma das principais linhagens de CD, são responsáveis pela apresentação de antígenos e ativação dos LTCs $CD8^+$ e $CD4^+$ mediante a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-18 e IFN-α, quimiocinas e moléculas coestimulatórias. Após a ativação, os LTCs são capazes de acionar mecanismos ativadores da cascata de caspases para garantir a apoptose dos queratinócitos basais. Dentre os mecanismos de apoptose propostos estão a secreção do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e a ação de perforinas e granzimas (TRAPANI et. al., 2000; SURGERMAN et. al., 2002; KURAGO, 2016; CHIANG et. al., 2018). Dentre as granzimas, a granzima B é a única considerada essencial para a citotoxidade de LTCs *in vivo*, pois possui o efeito pró-apoptótico mais potente (ABBAS; LITCHMAN;

PILLAI, 2015; VOSKOBOINIK et. al., 2015). A perforina é uma proteína formadora de poros encontrada nos grânulos citoplasmáticos de LTCs e NKs e é necessária para a granzima B penetrar no citosol da célula-alvo, fragmentando o DNA e causando lise celular. Já a granzima B, da família de serina-proteases, induz a morte celular por meio de duas vias, sendo uma dependente e uma independente da cascata de caspases. Além disso, queratinócitos apoptóticos podem não realizar corretamente a manutenção da membrana basal, gerando falha na prevenção da apoptose de mais células (Fig.1). Esses processos resultariam, então, na degeneração hidrópica, tipicamente visualizada na microscopia de lesões de LPO, além de explicar a natureza crônico-inflamatória dessa patologia (SURGERMAN et. al., 2002; KURAGO, 2016; CHIANG et. al., 2018) (Figura 1).

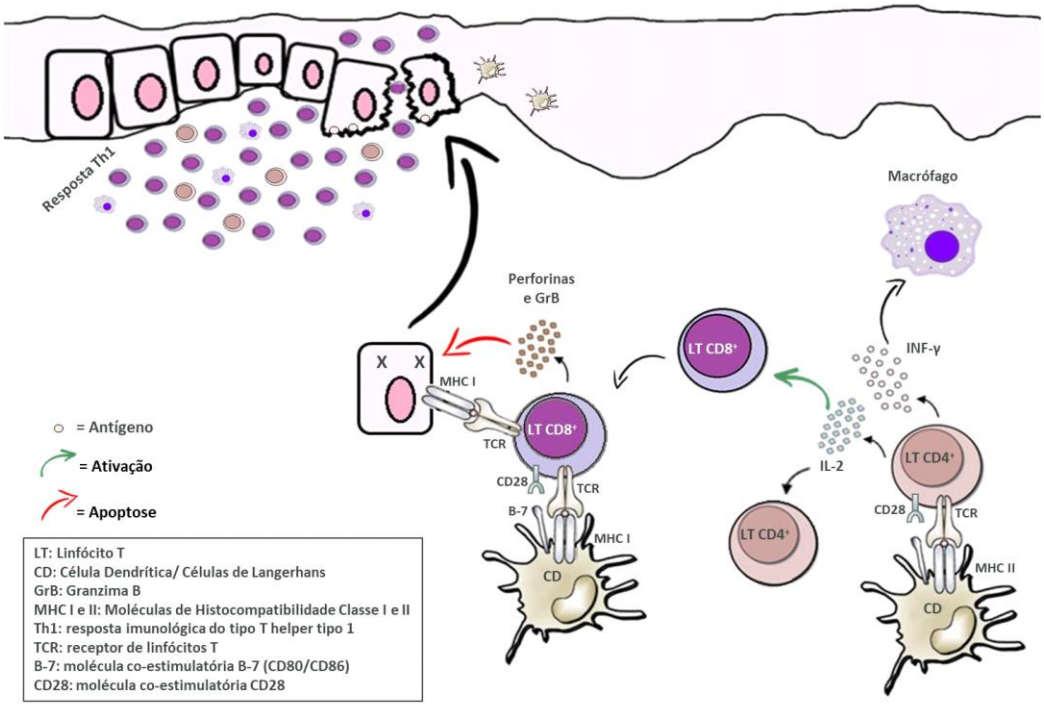


Figura 1 – Esquema etiopatogênese do Líquen Plano Oral (LPO). A etiopatogenia do LPO está associada ao perfil de resposta imune Th1, desencadeada pela apresentação de um ou mais auto-antígenos pelos queratinócitos basais. Os queratinócitos sensibilizam células dendríticas (CD) da região próxima ao epitélio, que adquirem motilidade e migram para os linfonodos sentinelas da região (CHIANG et. al., 2018). No linfonodo sentinela ocorre a maturação e ativação de células TCD4+ por apresentação via MHC-II/TCR pelas CD, e co-estimulação por interação CD28/B7. Os Linfocitos TCD4+, agora perfil Th1, produzem e secretam IL-2 e INF- γ, que contribuem para a proliferação de LT, além de estimular a proliferação, ativação e citotoxidade dos linfócitos TCD8+ ou T citotoxicos (LTC). A ativação dos LTC também é exercida pelas citocinas IL-12, IL-18 e IFN-α, quimiocinas e moléculas coestimulatórias, produzidas pelas CD plasmocitoides. Após ativados, os LTC reconhecem os queratinócitos via ligação MHC-I/TCR para o antígeno específico para o qual foram maturados e dão início aos eventos que culminam na morte celular

programada (apoptose) a partir do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e pela ação de perforinas/granzimas.

Para Cheng et. al. (2016), a exacerbação da resposta imune citotóxica está relacionada com a sintomatologia e aspecto clínico das lesões. Logo, o manejo dos pacientes sintomáticos deve ser realizado de forma individualizada, levando-se em conta a intensidade dos sintomas, bem como a extensão e severidade das lesões. Devido à característica crônico-inflamatória do LPO, e por frequentemente apresentar recorrência, o tratamento de escolha é realizado com o uso de corticoides, podendo ser realizado tanto a terapia tópica quanto sistêmica ou a associação de ambas as formas para os casos mais severos, tendo sempre em vista a melhora da qualidade de vida destes pacientes. Existe ainda a possibilidade do tratamento intralesional através da injeção submucosa de acetato de triancinolona ou clobetasol, que resulta em melhora significativa das lesões (CHENG et. al., 2016; OBERTI et. al.; 2019).

Apesar de ser o tratamento de primeira escolha, o uso prolongado de corticosteroides pode resultar no aparecimento de efeitos adversos como irritação da mucosa, candidíase oral, hiperglicemia e doença de Cushing, porém esses efeitos não contraindicam sua utilização (CHIANG et. al., 2018; OBERTI et. al., 2019). Por isso, outras modalidades de tratamento como a terapia fotodinâmica ou a utilização de laser de baixa potência (LLLT) também foram sugeridas como alternativas à corticoterapia, sendo considerados procedimentos seguros pois não induzem sangramento ou formação de cicatrizes e os únicos efeitos colaterais relatados são queimação e edema local. Entretanto, a utilização da terapia fotodinâmica é considerada como coadjuvante ou uma alternativa àqueles pacientes que não toleram ou não respondem efetivou apresentam uma resposta pobre ou nenhuma resposta a corticoterapia (MIRZA et. al., 2018; OBERTI et. al. 2019).

Em seu estudo, Dillenburg et. al. (2015) avaliou quarenta e dois pacientes com LPO erosivo ou atrófico que foram submetidos à terapia tópica com corticoide (propionato de clobetasol 0,05%) ou fotobiomodulação (diodo laser InGaAlP [660 nm]). Os pacientes foram divididos em três grupos, de acordo com a resposta a intervenção, independente do tratamento realizado, uma vez que não foi observada diferença estatisticamente significante entre as duas abordagens terapêuticas, em Tipo I – responsivos, pacientes que apresentaram completa resolução dos sintomas e lesões sem recorrência (n = 21); Tipo II – parcialmente responsivos, pacientes com resolução parcial dos sintomas e lesões associada à recorrência (n = 13); e Tipo III – não responsivos, pacientes que não apresentaram resposta ao tratamento ou relataram piora dos sintomas (n = 8). Dessa forma, questões acerca do tratamento do LPO e resposta dos

pacientes à intervenção permanecem variáveis até que sua etiopatogênese esteja completamente elucidada.

2.3. Tolerância imunológica

Começar com a definição do conceito geral do Abbas 2019. A tolerância imunológica constitui-se de diversos mecanismos que atuam para a prevenção da autoimunidade por evitar a formação de células T autorreativas e opera a partir de duas fases: tolerância central e tolerância periférica. A tolerância central incluiu todos os mecanismos que acontecem no timo antes da maturação e circulação dos LT. Esse processo tem início com a formação e expressão do receptor de células T (TCR) na superfície de timócitos, células progenitoras de LT derivadas da medula óssea e abrigadas no timo. Os TCRs possuem afinidade para o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) auto-peptídico (ALEXANDER; WAHL, 2011; XING; HOGQUIST, 2012; SCHIETINGER; GREENBERG, 2014). Dessa forma, os timócitos cujo TCRs não se ligam ao MHC próprios morrem por negligencia e aqueles com TCRs de alta afinidade, por representarem uma ameaça à saúde imunológica, sofrem apoptose ou tornam-se irresponsivos ao contato com antígenos (anergia). Os timócitos com baixa afinidade ao MHC próprios sofrem seleção positiva e seguem o processo de maturação pela diferenciação em linfócitos T CD4 ou T CD8 (XING; HOGQUIST, 2012; SCHIETINGER; GREENBERG, 2014).

Embora os mecanismos de tolerância central sejam eficientes, eles só eliminam os linfócitos reativos a auto-antígenos expressos no timo. Logo, mecanismos de tolerância adicionais são necessários para restringir a população ou função de LTs que encontrarão seus auto-antígenos fora do timo, evitando que essas células favoreçam o surgimento de uma resposta autoimune. Estes mecanismos adicionais agem em células T maduras circulantes e denominam-se tolerância periférica (XING; HOGQUIST, 2012; SCHIETINGER; GREENBERG, 2014).

As Tregs adquirem seu fenótipo regulatório no timo e estão envolvidas na regulação do sistema imune principalmente através da supressão de células T efetoras para atenuar a resposta imunológica. A atividade supressora das Tregs ocorre mediante o contato celular direto tanto em células T CD4, T CD8 e T natural killer quanto em células B e CDs. Porém, a supressão pode iniciar-se de forma indireta por meio da secreção de citocinas

imunossupressoras, como a interleucina-10 (IL-10) ou por meio do fator de transformação do crescimento beta (TGF-β). As células suprimidas, então, podem sofrer alterações funcionais ou até mesmo sofrerem apoptose (XING; HOGQUIST, 2012; YUAN; CHENG; MALEK, 2014).

2.4. PD-1 / PD-Ls: expressão e mecanismos de regulação

Dentre as vias responsáveis por inibir a resposta das células T destacam-se o receptor de morte programada 1 (PD-1 ou CD279) e seus ligantes PD-L1 e PD-L2. O PD-1 é uma molécula inibitória pertencente à superfamília B7-CD28 que é encontrada na superfície de vários tipos celulares, como células T ativadas, células NK e em timócitos CD4 e CD8 quando estes passam do estágio duplo negativo para o duplo positivo. Os mecanismos de regulação da expressão do PD-1 diferem de acordo com os tipos celulares. Em células T, a expressão de PD-1 pode ser induzida pelas citocinas da cadeia γ comum, como IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21. A regulação positiva do PD-1 nessas células também acontece mediante sinalização de TCR, receptor de células B (BCR) e TNF. Por meio do recrutamento do fator nuclear de células T ativadas c1 (NFATc1) ocorre a regulação do gene PD-1 no lócus pdcd1 após ativação de células T. Caso haja a inibição de NFATc1 a expressão de PD-1 é fortemente reduzida e mutações nessa molécula levam a perda total da expressão em LT. Em macrófagos a expressão de PD-1 pode ser induzida pelo fator nuclear-kβ (NF-Kβ) e por elementos responsivos pelo estímulo de interferon (ISRE) que são fundamentais para o INF-α, STAT1/2. Por outro lado, a IL-4 e a ligação com receptores do tipo Toll 9 (TLR9) inibem a expressão de PD-1 em CD (FRANCISCO et. al., 2011; ZAMANI et. al., 2016; CHAMOTO; AL-HABSI; HONJO, 2017).

O PD-1 possui dois ligantes conhecidos, o PD-L1, também denominado B7-H1 ou CD274; e o PD-L2, conhecido também como B7-DC e CD273. A regulação da expressão tanto do PD-L1 quanto do PD-L2 acontece por meio de citocinas pró-inflamatóias, como interferons, TNF-α e citocinas da cadeia y, secretadas por LTCs ativados e células NK. O PD-L1 possui uma ampla expressão e pode ser encontrado tanto em células de linhagem hematopoiéticas, como células T ativadas, células B, monócitos ativados, CD e macrófagos, quanto em células e tecidos não hematopoiéticos periféricos, com elevada expressão no coração, músculo esquelético, placenta, pulmão, rim e em células não-parenquimais do fígado, células da ilhota pancreática, células da glia e queratinócitos (FRANCISCO et. al., 2011; DAI et. al., 2014; CHAMOTO; AL-HABSI; HONJO, 2017). Em relação ao PD-L2, sua expressão foi

primeiramente relacionada exclusivamente as APCs, tais como macrófagos e CD. No entanto, foi demonstrado que a partir de estímulos microambientais a expressão de PD-L2 pode ser induzida em uma variedade de células imunes e não imunes, como mastócitos, linfócitos B1, células B de memória, células intrapulmonarias não-hematológicas e na superfície de LT sob sinalização de TCR (FRANCISCO et. al., 2011; MESSAL et. al., 2011; ZHANG et. al., 2019).

A função inibitória do PD-1 ocorre a partir da ligação com o PD-L1 ou PD-L2 mediante sinalização do TCR e é capaz de inibir os LTs no início de uma resposta imune nos tecidos linfoides secundários. O PD-1 possui um domínio citoplasmático com dois motivos de sinalização: um motivo inibidor à base de tirosina (ITIM) e um motivo de troca à base de tirosina (ITSM). O ITSM é mais importante para a imunoinibição do PD-1 e a partir da sua fosforilação ocorre o recrutamento das fosfatases SHP-1 e SHP-2 para o domínio citoplasmático do PD-1, desencadeando a desfosforilação direta de moléculas de sinalização associadas ao complexo TCR. A interação dessas moléculas para a ativação do PD-1 resulta na inibição das vias fosfatidilinositol 3-quinase / proteína quinase B (PI3K/Akt) e consequentemente na regulação negativa de Bcl-xl e NFAT afetando a sobrevivência celular e produção de IL-2. Adicionalmente, a desfosforilação das vias Ligante de células T ativadas / proteína Zap-70 associada à cadeia zeta (LAT/Zap70) e C3G / Rap1, leva a diminuição da proliferação e adesão de LT, respectivamente, ocasionando a perda gradual da função efetora (DAI et. al., 2014; PEDOEEM et. al., 2014; CHAMOTO; AL-HABSI; HONJO, 2017).

Por outro lado, o PD-L1 e o PD-L2 poderiam modular a resposta de células T efetoras durante a migração para o local da inflamação ou no próprio tecido-alvo através da estimulação e liberação de citocinas de células T como demonstrado por Shin e colaboradores (2003). Em seu trabalho utilizando camundongos normais e deficientes em PD-1, o efeito co-estimulador do PD-L2 poderia resultar de uma ação sinérgica com o sistema B7-1 / B7-2 por meio de um provável receptor alternativo capaz de transmitir sinais de ativação para células T CD4, independente do PD-1 (SHIN et. al., 2003).

Sabe-se que alguns tipos de células tumorais podem expressar ambos os ligantes do PD-1, sendo o PD-L1 mais frequentemente expresso, os quais estão associados à presença e evasão tumoral pela anergia e apoptose de células T (KUOL et. al., 2017). Estudos com imunoterápicos utilizados no tratamento de neoplasias malignas também têm evidenciando a importância dessas moléculas na regulação da imunidade, uma vez que o bloqueio da via PD-1 / PD-L1 melhora a resposta imune anti-tumoral. Entretanto, efeitos adversos com características

autoimunes foram relatados em pacientes em terapia anti-PD-1, com reações em pele sendo o efeito adverso mais comumente relatado (HOFFMAN et. al., 2016; WAKADE et. al., 2016).

Estudos realizados com camundongos diabéticos não obesos demonstraram que o PD-1 contribui para a regulação da autoimunidade e limitação do diabetes pela regulação da proliferação e infiltração de células T no pâncreas e que a indução da expressão de PD-L1 reduz significativamente a incidência de diabetes autoimune. Da mesma forma, o surgimento do diabetes foi acelerado após a administração de anticorpos bloqueadores do PD-1 e PD-L1 (ANSARI et. al., 2003; WANG et. al., 2008). Uma revisão recente demonstrou na literatura muitos estudos associando a deficiência ou o bloqueio de PD-1/PD-L1 com a patogênese de doenças autoimunes, como Artrite Reumatóide (AR), Lupus Eritematoso Sistêmico (SLE) e Sindrome de Sjogren (SS). Logo parece evidente o papel da via PD-1/PD-L1 na resposta imune, uma vez que o comprometimento dessa via implica na regulação negativa da tolerância periférica com falha no controle de LT autorreativos, culminando no surgimento de doenças autoimunes (ZAMANI et. al., 2016).

2.5. Vias PD-L1/PD-L2-PD-1 e o LPO

Com o objetivo de avaliar a expressão e função do PD-1 e seus ligantes no LPO, Youngnak-Piboonratanakit et al. (2004) demonstraram pela técnica da imunofluorescência a expressão de PD-1 e PD-L1 em células T tanto no infiltrado intraepitelial quanto no infiltrado subepitelial, sendo que o PD-L1 também foi encontrado expresso em macrófagos e queratinócitos localizados próximos aos LTs. Por meio da análise de cultura de células, foi demonstrada uma possível função regulatória do PD-L1 expresso por queratinócitos na indução da tolerância periférica pela estimulação da produção de IL-10 e consequente diminuição da proliferação de LT produção de IFN-y. Da mesma forma, o bloqueio dessa proteína resultou no aumento significativo da resposta proliferativa de LT e produção da citocina pro-inflamatória INF-y, demonstrando o importante papel dessa molécula na regulação da resposta imune no microambiente do LPO. Apesar da expressão relativamente alta de PD-L2 na cultura de queratinócitos, somente o PD-L1 foi capaz de regular negativamente a função dos LTs (YOUNGNAK-PIBOONRATANAKIT et. al., 2004). Corroborando esses resultados, Zhou et. al. (2012) também determinaram por meio de cultura de células que a via PD-1/PD-L1 é capaz de diminuir a resposta proliferativa de LT e produção de citocinas no LPO e que o bloqueio dessa via estimularia a produção de INF-y e IL-2. Além disso, a expressão de PD-1 e seu ligante

PD-L1 em amostras de LT provenientes de sangue periférico de pacientes com LPO foi avaliada por meio da citometria de fluxo. Os resultados revelaram um número significativamente maior dessas moléculas inibitórias no LPO em comparação com mucosa saudável. Além disso, a análise da associação dessas proteínas com a severidade do LPO demonstrou uma associação positiva relacionada com a expressão de PD-L1 colocar a filosofia e pensamento dos autores (ZHOU et. al., 2012).

Em contrapartida, Du e colaboradores demonstraram a expressão de PD-L1 e PD-L2 por meio de imunohistoquímica em amostras de LPO, tanto nos queratinócitos quanto no infiltrado inflamatório subepitelial. Entretanto, devido à diferença significativamente maior na expressão de PD-L2, esses autores realizaram um modelo de co-cultura de células para investigar a relação desta proteína com a resposta imune no microambiente do LPO. Os resultados reveleram que a expressão gênica (mRNA) de PD-L2 em mucosa e no sangue de pacientes com LPO foi consideravelmente maior em comparação com o controle. Em adição, o bloqueio do PD-L2 resultou na redução da proliferação de LT e produção de IL-2 e INF-y, sugerindo que esta proteína pode exercer um possível efeito co-estimulatório no LPO (DU et. al., 2011). O que isso significa pro desenvolvimento da doença

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a expressão do PD-L1 e PD-L2, bem como das populações de células PD-1^+, $CD8^+$ e GrB^+ no líquen plano oral (LPO) e correlacionar a expressão dessas moléculas e células com a severidade da doença.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1 Identificar e analisar por imunoistoquimica a densidade as proteínas envolvidas na inibição da resposta imunológica, tais como os ligantes de morte programada-1 e -2 (PDL-1 e PDL-2) e seu receptor PD-1, em amostras de LPO;

3.2.2 Verificar a densidade das populações celulares PD-1^+, $CD8^+$ e GrB^+ nas amostras de LPO;

3.2.3 Investigar se há correlação da expressão do PD-L1 e PD-L2 com as densidades das populações celulares CD-8^+ e GrB^+;

3.2.4 Investigar se há associação PD-L1, PD-L2 e as populações celulares PD-1^+, $CD8^+$ e GrB^+ com os parâmetros clínicos de severidade do LPO tais como tipo clínico, sintomatologia e resposta à corticoterapia.

4 METODOLOGIA

4.1. Tipo de Estudo, Local do Estudo e Aspectos Éticos

Este estudo transversal e observacional faz parte de um projeto maior submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (UFG) (CAAE 35868214.6.0000.5083; ANEXO A). A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Imunoistoquímica/Análise de Saliva e de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia Faculdade de Odontologia (FO)/UFG.

4.2. Obtenção, seleção e caracterização da amostra

No presente estudo foram incluídas amostras de pacientes com LPO atendidos, diagnosticados e acompanhados no Centro Goiano de Doenças da Boca (CGDB) entre os anos de 2007 e 2017. A pesquisa das anotações dos prontuários dos pacientes, bem como a revisão dos blocos e lâminas foi realizada.

Foram incluídos no estudo pacientes com hipótese clínica de diagnóstico de LPO, que apresentavam confirmação diagnóstica através de biópsia incisional e laudo anatomopatológico. Todos os casos foram revisados de acordo com os critérios clínicos estabelecidos pela Associação Americana de Patologia Oral e Maxilofacial (AAOMP/2016) onde as descrições dos prontuários deveriam ser de lesões brancas ou vermelhas, multifocais, de distribuição simétrica, sendo classificadas em uma ou mais das seguintes formas: reticular/papular, atrófica (eritematosa), erosiva (ulcerativa), placa e bolhosa (CHENG et al. 2016) (CHENG et al. 2016). A revisão dos blocos e lâminas também foi realizada de acordo com os critérios microscópicos da AAOMP/2016: infiltrado predominantemente linfocitário localizado em lâmina própria, destruição/liquefação dos queratinócitos basais, exocitose de linfócitos e ausência de displasia epitelial.

Foram excluídos pacientes onde não havia informações suficientes nos prontuários sobre os dados clínicose resposta ao tratamentos, bem como amostras cujos blocos e lâminas apresentavam em mal estado de conservação ou com material insuficiente para os cortes microscópicos.

4.3. Técnicas Empregadas

4.3.1. Hematoxilina e Eosina

Os blocos dos pacientes selecionados foram seccionados em micrótomo (Leica RM2165, Heidelberg, Germany), obtendo-se de cada bloco cortes consecutivos de 5µm, colocados sobre lâminas histológicas e corados pelo método da Hematoxilina e Eosina (HE). Todos os casos foram revistos e caracterizados de acordo com os critérios histopatológicos da AAOMP/2016: infiltrado predominantemente linfocitário localizado em lâmina própria, destruição/liquefação dos queratinócitos basais, exocitose de linfócitos e ausência de displasia epitelial (CHENG Y.S.L. et al, 2016).

4.3.2. Técnica da Imunoistoquímica

Cortes de 3µm coletados em lâminas polarizadas (Leica) foram submetidos a técnica imunoistoquímica (método do polímero) para identificação das proteínas PD-L1, PD-L2, PD-1, CD8 e GrB. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-PD-L1 (clone E1L3N; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; 1:600), anti-PD-L2 (clone 176611; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA; 1:800), anti-CD8 (clone C8/144B; Dako, Carpinteria, CA, USA; 1:200), anti-GrB (clone GrB-7, Dako, Carpinteria, CA, USA; 1:100) e anti-PD-1 (clone NAT105, Cell Marque, Rocklin, CA, USA; pronto para uso, overnight). De acordo com padronizações realizadas em estudos prévios (GONÇALVES A.S. et al. 2017; LOPES M.L.D.S. et al. 2019; MOSCONI C. et al. 2019), os controles positivos foram tonsila lingual (PD-1) e trofoblasto (PD-L1 e PD-L2) e, para o CD8 e GrB o próprio LPO foi considerado controle positivo (Apêndice A). Para as etapas de desparafinização, re-hidratação e recuperação antigênica, os cortes foram submetidos ao TRILOGY™ (Cell Marque, Rocklin, CA, USA; 1:100), a temperatura de 96ºC em banho maria digital (DeLeo, Porto Alegre, RS, Brazil) for 30 minutes. As soluções de bloqueio da peroxidase endógena, de biotina endógena, os anticorpos secundários, solução reveladora e hematoxilina foram utilizadas conforme proposto pelo fabricante do Kit Novolink™ Max Polymer Detection System (Novocastra, Leica Biosystems Gmb, Wetzlar, HE, Germany).

4.4. Análise dos dados

O PD-L1 e PD-L2 foram mensurados por método semi-quantitativo no revestimento epitelial (queratinócitos positivos) e nas células imune-inflamatórias presentes no tecido

conjuntivo em íntima associação com o epitélio da lesão. Os escores foram considerados da seguinte forma: 1= - (negativo): ≤ 1% de células positivas de acordo com o estudo de ILIE et al. 2016; 2= +: 1 a 10% de células positivas (focal ou difusamente distribuídas); 3= ++: 10 a 50% de células positivas (focal ou difusamente distribuídas) e 4= +++: > 50% de células positivas (focal ou difusamente distribuídas).

As densidades (mm^2) de células $CD8^+$, GrB^+ e de células mononucleares $PD\text{-}1^+$, nas regiões intraepitelial e subepitelial, foram quantificadas em 03 campos microscópios alternados, no aumento de 40x, com o auxílio de um retículo de integração em rede quadrada (com área de $0{,}0961mm^2$) acoplado a ocular do microscópio de luz (4740680000000-Netzmikrometer 12.5 x, Carl Zeiss, Gottingen, Germany).

A análise dos dados foi realizada utilizando o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) software, version 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A análise estatística descritiva com valores absolutos e relativos dos parâmetros clínicos e demográficos coletados foi realizada. Para investigação da associação entre PD-L1, PD-L2, células $PD\text{-}1^+$, $CD8^+$ e GrB^+ com a severidade do LPO, a amostra foi dividida nos seguintes grupos: subtipo clínico (reticular ou erosivo/bolhoso), sintomatologia (presente ou ausente) e resposta a corticoterapia tópica ou sistêmica (positiva ou sem resposta). O teste exato de Fisher foi aplicado para avaliação entre as variáveis nominais. Após a avaliação da normalidade dos dados numéricos utilizando o teste de Shapiro-Wilk, utilizou-se o teste não-paramétricos de Mann-Whitney. O teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliações dependentes. O teste de Spearman foi aplicado para a correlação entre as populações celulares investigadas.

5 ARTIGO

Os capítulos de resultados, discussão e conclusões serão apresentados a seguir no formato de artigo científico, conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), intitulado “Evaluation of PD-L1, PD-L2, PD-1 and cytotoxic immune response in oral lichen planus”, que foi submetido e aceito para publicação no periódico *Oral Diseaes*; ISSN 1601-0825, qualis A2, cujas normas estão descritas no **ANEXO B** ao final desta dissertação.

Results

The demographic data and clinical features of the 33 individual cases are listed in Table 1. The mean age of affected individuals was 46.9 (±11.6) years, and women predominated (n=22, 66.7%). Most OLPs occurred in the buccal mucosa (75.7%), but some patients had other sites simultaneously affected. Regarding clinical subtypes, 51.5% (n=17) were erosive, 45.4% (n=15) were reticular, and 3.1% (n=1) were bullous. Twenty-four (72.7%) individuals reported painful symptomatology and 16 (48.4%) did not respond effectively to corticotherapy. Among the symptomatic cases, erosive patterns were present in 17 cases (70.8%), followed by reticular (n=6, 25.0%) and bullous (n=1, 4.2%) lesions. All asymptomatic cases were reticular subtypes (n=9, 100%).

PD-L1 positivity was observed in the cell membrane. Most OLP samples were considered negative for PD-L1 (n=22, 66.6%) both regarding keratinocytes and immune-inflammatory cells. Eleven cases (33.3%) showed mild/moderate PD-L1 expression in immune-inflammatory cells and/or keratinocytes. Importantly, of these 11 cases with a score 2 (+), four showed PD-L1$^+$ keratinocytes. High PD-L1 expression was not observed in any OLPs (Figure 1). However, a high expression of PD-L2 in the cytoplasm and membrane (n=32, 96.9%) by both keratinocytes and immune-inflammatory cells was observed (Figure 1). There was no association between the investigated molecules (PD-L1 and PD-L2) and the clinical subtype of OLP, symptomatology or corticosteroid response ($p>0.05$ for all groups investigated).

CD8$^+$ cell density (per mm^2) was significantly higher compared to that of GrB$^+$ in 33 OLP samples (subepithelial: median value of 1176 for CD8$^+$, median value of 288 for GrB$^+$; intraepithelial: median value of 339 for CD8$^+$, median value of 66 for GrB$^+$) ($p<0.01$). However, a positive correlation was found between CD8$^+$ and GrB$^+$ cell populations in both the intraepithelial ($r=0.6$, $p=0.0001$) and subepithelial ($r=0.5$, $p=0.004$) regions (Figure 2). Larger numbers of GrB$^+$ cells and a reduced CD8$^+$:GrB$^+$ ratio were observed in the intraepithelial region of erosive/bullous OLPs compared to that of reticular OLPs ($p=0.004$ and $p=0.01$, respectively). Similarly, higher CD8$^+$ and GrB$^+$ cell densities were detected in the subepithelial region when these clinical OLP subtypes were compared ($p<0.05$) (Table 2). There was no association between cell populations

This article is protected by copyright. All rights reserved

($CD8^+$ and GrB^+) and the other investigated clinical characteristics such as symptomatology and corticotherapy response ($p>0.05$).

PD-1 was found in the membrane of some mononuclear immune-inflammatory cells in the intraepithelial (exocytosis) and subepithelial regions (Figure 2). PD-1^+ cell density per mm^2 (intraepithelial: median value of 94; subepithelial: median value of 378) was reduced compared to $CD8^+$ lymphocyte density per mm^2 (intraepithelial: median value of 339; subepithelial: median value of 1176) ($p=0.003$ for the intraepithelial region and $p=0.06$ for the subepithelial region). In addition, no statistical correlation was found between PD-1^+ cells and the other cell populations investigated ($CD8^+$ and GrB^+) ($p>0.05$), and no association was detected between the number of PD-1^+ cells and the clinical subtype, symptomatology or response to corticotherapy ($p>0.05$).

Discussion

In the present study, individuals with OLP were mostly Caucasian, middle-aged women with the erosive subtype. Moreover, we observed a high frequency of patients with painful symptomatology, recurrence when corticosteroids were discontinued and lack of response to corticotherapy, in agreement with literature reports (Cheng, Gould, Kurago, Fantasia, & Muller, 2016; Warnakulasuriya, 2019). In the past two decades, an increasing number of studies have attempted to investigate the complex immunopathogenesis of OLP with the aim of expanding new therapeutic options, especially for symptomatic patients who do not respond to corticotherapy (Youngnak-Piboonratanakit et al., 2004; Du et al., 2011; Thongprasom, Carrozzo, Furness, & Lodi, 2011; Zhou et al., 2012; Dai, Jia, Zhang, Fang, & Huang, 2014; Dillenburg et al., 2015; Cheng, Gould, Kurago, Fantasia, & Muller, 2016). Interestingly, in our series, six individuals with reticular subtypes had symptoms as also reported in a large Chinese study in which 62 cases of reticular OLP were symptomatic (Xue et al., 2005). Reticular OLP is usually asymptomatic; however, cases of reticular OLP exhibiting unconventional oral symptoms unrelated to clinical characteristics and very similar to those described in individuals with burning mouth syndrome (BMS) have been documented (Adamo et al., 2017). In addition, cases of BMS-like oral symptoms in reticular OLP that do not respond to conventional therapy may be treated with the use of antidepressants and benzodiazepines. Additionally, screening for mood and sleep disorders is recommended (Adamo, Mignogna, Pecoraro, Aria, & Fortuna, 2018).

In this respect, the immunological tolerance mediated by PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA-4 has been investigated in autoimmune diseases such as OLP because these ligands represent

This article is protected by copyright. All rights reserved

therapeutic targets (Youngnak-Piboonratanakit et al., 2004; Du et al., 2011; Zhou et al., 2012; Dai, Jia, Zhang, Fang, & Huang, 2014). Herein, we noted absence and/or low expression of PD-L1 in most cases, as well as a smaller population of PD-1$^+$ than CD8$^+$ TL cells in the OLP microenvironment. These features are in line with our hypothesis that the PD-L1/PD-1 immunoinhibitory pathway may be compromised in OLP. Therefore, a possible failure to regulate CD8$^+$ TL may occur in this autoimmune disease (Iijima et al., 2003; Lage et al., 2011; Cheng, Gould, Kurago, Fantasia, & Muller, 2016; Zamani, Aslani, Salmaninejad, Javan, & Rezaei, 2016; Theofilopoulos, Kono, & Baccala, 2017).

Some studies have shown that therapies including monoclonal antibodies that block immune checkpoints have led to the development of autoimmune diseases such as lichenoid dermatitis and mucositis, as well as OLP (Hofmann et al., 2016; Schaberg et al., 2016; Wakade et al., 2016; Shazib et al., 2020). Hofmann et al. (2016) have demonstrated that the use of drugs that block the PD-L1/PD-1 pathway leads to the development of hepatic, cutaneous, renal, endocrine and gastrointestinal disorders, and lichen planus. Furthermore, Schaberg et al. (2016) reported five cases of lichenoid eruption, comprising one case of lichenoid mucositis and one case of lichen sclerosus, associated with anti-PD-L1 and anti-PD-1 therapy. Wakade et al. (2016) reported the presence of bullous lichen planus-like reactions in various parts of the body of three patients treated with PD-1 inhibitors. More recently, Shazib et al. (2020) demonstrated that 10 of 13 patients who were treated with nivolumab or pembrolizumab (PD-1 inhibitor therapy) suffered oral immune-related adverse events, including lichenoid lesions, erythema multiforme and acute graft-versus-host disease. Therefore, it appears that blocking PD-L1 and its receptor PD-1 leads to the development of immune- mediated lesions, thus supporting the idea that the absence or low expression of PD-L1 in OLP is intrinsically related to the pathogenesis of the disease.

Divergent outcomes published by Youngnak-Piboonratanakit et al. (2004) and by Zhou et al. (2012) demonstrated that the PD-L1 immunoinhibitory molecule and PD-1$^+$ cells are elevated in both tissue (Youngnak-Piboonratanakit et al., 2004) and peripheral blood (Zhou et al., 2012) specimens from patients diagnosed with OLP. Nevertheless, these authors also observed *in vitro* that the PD-1/PD-L1 pathway participates in immune tolerance by inhibiting lymphocytes and proinflammatory cytokines such as IFN-γ (Youngnak-Piboonratanakit et al., 2004; Zhou et al., 2012) and IL-2 (Zhou et al., 2012).

Our hypothesis of absent or low PD-L1 expression in OLP was confirmed. However, we observed a possible regulation of the cytotoxic immune response shown by the low association

This article is protected by copyright. All rights reserved

between the number of $CD8^+$ TL and the GrB cytotoxic enzyme, both in reticular and erosive/bullous OLPs. Interestingly, in the intraepithelial region of erosive/bullous subtypes, a low CD8:GrB ratio was also significantly demonstrated. Contrary to the theory formulated initially, high PD-L2 expression was observed in virtually all OLP samples regardless of disease severity. Taken together, these data suggest that the PD-L2 molecule may contribute to a possible regulation of $CD8^+$ TL cytotoxicity, and this scenario may reflect the chronic profile of the disease. In addition, we demonstrated that the GrB^+ cell population represented approximately 10% of the $CD8^+$/perforin$^+$ (double-labelled) cell population in a series of 10 OLPs (Costa et al., 2011). Consistent with our findings, Du et al. (2011) reported high PD-L2 expression in OLP tissue samples. However, these authors have shown that PD-L2 contributed to enhanced lymphocyte proliferation and increased IFN-γ and IL-2 concentrations, suggesting that PD-L2 may play an important role in generating the Th1 cell-mediated immune response and, consequently, the cytotoxic lymphocyte-mediated response. Shin et al. (2003, 2005) have indicated *in vitro* and *in vivo* that PD-L2 may have a PD-1 independent receptor-mediated co-stimulatory role.

Although the topic is controversial, OLP has been considered to be a potentially malignant disorder, since some cases have undergone malignant transformation to oral squamous cell carcinoma (Cheng, Gould, Kurago, Fantasia, & Muller, 2016; González-Moles et al., 2019). Systematic reviews carried out in 2014 and 2019 revealed that the occurrence of malignant transformation of OLP ranges from 0 to 3.5% (Fitzpatrick, Hirsch, & Gordon, 2014; Giuliani et al., 2019). Of note, overexpression of PD-L1 and PD-L2 has been identified in tumor cells and in potentially malignant disorders (Gonçalves et al., 2017; Lopes et al., 2019). In the current study, PD-L2 expression was elevated in keratinocytes in most of the OLP samples. Also, four cases of OLP showed PD-L1$^+$ in keratinocytes. Hence, it would be reasonable to consider that the expression of PD-Ls by keratinocytes in OLP samples may contribute to the evasion of possible mutated cells and, thus, to the malignancy of this condition. Certainly, this assumption should be confirmed by analysing a larger series of OLP and by comprising samples with epithelial dysplasia.

Noteworthy, according to the latest criteria proposed by the AAOMP/2016, we did not include herein oral lichenoid reaction (Cheng, Gould, Kurago, Fantasia, & Muller, 2016). Yet, smoking can be a confounding factor for both clinical and microscopic characteristics (Cheng, Gould, Kurago, Fantasia, & Muller, 2016). Tobacco is known to influence the immune response. Recently, in a characterization of the tumour immune microenvironment of head and neck

This article is protected by copyright. All rights reserved

squamous cell carcinoma, de la Iglesia et al. (2020) demonstrated that tobacco reduces the number of LTCD8 and PD-L1^{+} cells. Conversely, it is postulated that the restrictive diagnosis of OLP applied in studies may be responsible for underestimation of its malignant potential. In particular, habits such as smoking and alcohol consumption have been reported as risk of malignization (González-Moles et al., 2019). In this sense, further studies are needed to shed light on the potential contribution of immunological checkpoints to OLP, including these confounding factors.

This collaborative study retrospectively analysed a series of 33 cases of OLP obtained from two reference centres in Brazil; however, as a fact inherent in the nature of this analysis, some patients did not attend the follow-up appointment. Moreover, the small sample size is likely to incorporate unforeseen bias, and the statistical results should be interpreted with caution.

In summary, we observed that the PD-L1/PD-1 pathway appears to be compromised in OLP due to low PD-L1 expression in most samples. On the other hand, PD-L2 overexpression coupled with a possible regulation of the cytotoxic immune response (CD8:GrB ratio) suggests an immunological tolerance that may contribute to the chronic profile of OLP as illustrated in Figure 3. Thus, the present investigation contributes to expanding the knowledge of the aetiopathogenesis of OLP and consequently to the development and application of new therapies for the treatment of this disorder.

Acknowledgements

This study was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, #401610/2016-0). A.C.B. and R.A.M. are research fellows of CNPq. The authors thank the Foundation for Research Support in the State of Goiás (FAPEG), Brazil and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Finance code 001), Brazil, for financial support. S.L.G.L. and J.A.A.A. are the recipients of fellowships. We would like to extend our thanks to Centro Goiano de Doenças da Boca (CGDB), Goiânia, Brazil. Mrs. E. Greene provided English editing of the manuscript.

Conflict of Interest and Source of Funding: None to declare.

This article is protected by copyright. All rights reserved

References

Adamo, D., Cascone, M., Celentano, A., Ruoppo, E., Leuci, S., Aria, M., & Mignogna, M. D. (2017). Psychological profiles in patients with symptomatic reticular forms of oral lichen planus: A prospective cohort study. *Journal of Oral Pathology & Medicine, 46*(9), 810-816. doi: 10.1111/jop.12577.

Adamo, D., Mignogna, M. D., Pecoraro, G., Aria, M., & Fortuna, G. (2018). Management of reticular oral lichen planus patients with burning mouth syndrome-like oral symptoms: a pilot study. *Journal of Dermatological Treatment, 29*(6), 623-629. doi: 10.1080/09546634.2018.1425359.

Cheng, Y. S., Gould, A., Kurago, Z., Fantasia, J., & Muller, S. (2016). Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, 122*(3), 332-354. doi: 10.1016/j.oooo.2016.05.004.

Costa, N. L., Gonçalves, A. S., Souza-Lima, N. C., Jaime-Paiva, L. G., Junqueira-Kipnis, A. P., Silva, T. A., ... Batista, A. C. (2011). Distinct expression of perforin and granzyme B in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine, 40*(5), 380-384. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01014.x.

Dai, S., Jia, R., Zhang, X., Fang, Q., & Huang, L. (2014). The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases. *Cellular Immunology, 290*(1), 72-79. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.05.006.

de la Iglesia, J. V., Slebos, R. J., Martin-Gomez, L., Wang, X., Teer, J. K., Tan, A. C., ... Chung CH. (2019). Effects of tobacco smoking on the tumor immune microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research, 26*(6), 1474-1485. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1769.

de Lima, S. L. G., de Arruda, J. A. A., Abreu, L. G., Mesquita, R. A., Ribeiro-Rotta, R. F., Mendonça, E. F., ... Batista AC. (2019). Clinicopathologic data of individuals with oral lichen planus: A Brazilian case series. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry, 11*(12), e1109-e1119. doi:10.4317/jced.56379.

Dillenburg, C. S., Martins, M. A., Almeida, L. O., Meurer, L., Squarize, C. H., Martins, M. D., & Castilho, R. M. (2015). Epigenetic Modifications and Accumulation of DNA Double-Strand

This article is protected by copyright. All rights reserved

Breaks in Oral Lichen Planus Lesions Presenting Poor Response to Therapy. *Medicine (Baltimore), 94*(30), e997. doi: 10.1097/MD.0000000000000997.

Du, G. H., Qin, X. P., Li, Q., Zhou, Y. M., Shen, X. M., & Tang, G. Y. (2011). The high expression level of programmed death-1 ligand 2 in oral lichen planus and the possible costimulatory effect on human T cells. *Journal of Oral Pathology & Medicine, 40*(7), 525-532. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01035.x.

Fitzpatrick, S. G., Hirsch, S. A., & Gordon, S. C. (2014). The malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a systematic review. *The Journal of the American Dental Association, 145*(1), 45-56. doi: 10.14219/jada.2013.10.

Francisco, L. M., Sage, P. T., & Sharpe, A. H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews, 236,* 219-242. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x.

Giuliani, M., Troiano, G., Cordaro, M., Corsalini, M., Gioco, G., Lo Muzio, L., ... Lajolo, C. (2019). Rate of malignant transformation of oral lichen planus: A systematic review. *Oral Diseases, 25*(3), 693-709. doi: 10.1111/odi.12885.

Gonçalves, A. S., Mosconi, C., Jaeger, F., Wastowski, I. J., Aguiar, M. C. F., Silva, T., ... Batista, A. C. (2017). Overexpression of immunomodulatory mediators in oral precancerous lesions. *Human Immunology, 78*(11-12), 752-757. doi: 10.1016/j.humimm.2017.09.003.

González-Moles, M. Á., Ruiz-Ávila, I., González-Ruiz, L., Ayén, Á., Gil-Montoya, J. A., & Ramos-García, P. (2019). Malignant transformation risk of oral lichen planus: A systematic review and comprehensive meta-analysis. *Oral Oncology, 96*, 121-130. doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.07.012.

Hofmann, L., Forschner, A., Loquai, C., Goldinger, S. M., Zimmer, L., Ugurel, S., … Heinzerling, L. M. (2016). Cutaneous, gastrointestinal, hepatic, endocrine, and renal side-effects of anti-PD-1 therapy. *European Journal of Cancer, 60*, 190-209. doi: 10.1016/j.ejca.2016.02.025.

Iijima, W., Ohtani, H., Nakayama, T., Sugawara, Y., Sato, E., Nagura, H., ... Sasano, T. (2003). Infiltrating CD8+ T cells in oral lichen planus predominantly express CCR5 and CXCR3 and carry respective chemokine ligands RANTES/CCL5 and IP-10/CXCL10 in their cytolytic granules: a potential self-recruiting mechanism. *The American Journal of Pathology, 163*(1), 261-268. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63649-8.

This article is protected by copyright. All rights reserved

Ilie, M., Hofman, V., Dietel, M., Soria, J. C., & Hofman, P. (2016). Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. *Virchows Archiv, 468*(5), 511-525. doi: 10.1007/s00428-016-1910-4.

Knottnerus, A., & Tugwell, P. (2008). STROBE--a checklist to Strengthen the Reporting of Observational Studies in Epidemiology. *Journal of Clinical Epidemiology, 61*(4), 323. doi: 10.1016/j.jclinepi.2007.11.006.

Lage, D., Pimentel, V. N., Soares, T. C., Souza, E. M., Metze, K., & Cintra, M. L. (2011). Perforin and granzyme B expression in oral and cutaneous lichen planus - a comparative study. *Journal of Cutaneous Pathology, 38*(12), 973-978. doi: 10.1111/j.1600-0560.2011.01781.x.

Lenouvel, D., González-Moles, M. Á., Talbaoui, A., Ramos-García, P., González-Ruiz, L., Ruiz-Ávila, I., & Gil-Montoya, J. A. (2019). An update of knowledge on PD-L1 in head and neck cancers: Physiologic, prognostic and therapeutic perspectives. *Oral Diseases*. doi: 10.1111/odi.13088. [Epub ahead of print].

Lopes, M. L. D. S., Gonzaga, A. K. G., Mosconi, C., Palomino, G. M., Mendonça, E. F., Batista, A. C., & Silveira, É. J. D. D. (2019). Immune response and evasion mechanisms in lip carcinogenesis: An immunohistochemical study. *Archives of Oral Biology, 98,* 99-107. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.09.017.

Mosconi, C., de Arruda, J. A. A., de Farias, A. C. R., Oliveira, G. A. Q., de Paula, H. M., Fonseca, F. P., ... Batista, A. C. (2019). Immune microenvironment and evasion mechanisms in adenoid cystic carcinomas of salivary glands. *Oral Oncology,* 88, 95-101. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.11.028.

Schaberg, K. B., Novoa, R. A., Wakelee, H. A., Kim, J., Cheung, C., Srinivas, S., & Kwong, B. Y. (2016). Immunohistochemical analysis of lichenoid reactions in patients treated with anti-PD-L1 and anti-PD-1 therapy. *Journal of Cutaneous Pathology, 43*(4), 339-346. doi: 10.1111/cup.12666.

Shazib, M. A., Woo, S. B., Sroussi, H., Carvo, I., Treister, N., Farag, A., … Villa, A. (2020). Oral Immune-Related Adverse Events Associated with PD-1 Inhibitor Therapy: A Case Series. *Oral Diseases, 26*(2), 325-333. doi: 10.1111/odi.13218.

This article is protected by copyright. All rights reserved

Shin, T., Kennedy, G., Gorski, K., Tsuchiya, H., Koseki, H., Azuma, M., … Housseau, F. (2003). Cooperative B7-1/2 (CD80/CD86) and B7-DC costimulation of CD4+ T cells independent of the PD-1 receptor. *The Journal of Experimental Medicine, 198*(1), 31-38. doi: 10.1084/jem.20030242.

Shin, T., Yoshimura, K., Shin, T., Crafton, E. B., Tsuchiya, H., Housseau, F., … Pardoll, D. M. (2005). In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *The Journal of Experimental Medicine, 201*(10), 1531-1541. doi: 10.1084/jem.20050072.

Theofilopoulos, A. N., Kono, D. H., & Baccala, R. (2017). The multiple pathways to autoimmunity. *Nature Immunology 18*(7), 716-724. doi: 10.1038/ni.3731.

Thongprasom, K., Carrozzo, M., Furness, S., & Lodi, G. (2011). Interventions for treating oral lichen planus. *Cochrane Database Syst Rev,* (7), CD001168. doi: 10.1002/14651858.CD001168.pub2.

Wakade, D. V., Carlos, G., Hwang, S. J., Chou, S., Hui, R., & Fernandez-Peñas, P. (2016). PD-1 inhibitors induced bullous lichen planus-like reactions: a rare presentation and report of three cases. *Melanoma Research, 26*(4), 421-424. doi: 10.1097/CMR.0000000000000263.

Warnakulasuriya, S. (2019). White, red, and mixed lesions of oral mucosa: A clinicopathologic approach to diagnosis. *Periodontology 2000, 80*(1), 89-104. doi: 10.1111/prd.12276.

Xue, J. L., Fan, M. W., Wang, S. Z., Chen, X. M., Li, Y., & Wang, L. (2005). A clinical study of 674 patients with oral lichen planus in China. *Journal of Oral Pathology & Medicine, 34*(8), 467-472. doi: 10.1111/j.1600-0714.2005.00341.x

Youngnak-Piboonratanakit, P., Tsushima, F., Otsuki, N., Igarashi, H., Machida, U., Iwai, H., … Azuma, M. (2004). The expression of B7-H1 on keratinocytes in chronic inflammatory mucocutaneous disease and its regulatory role. *Immunology Letters, 94*(3), 215-222.

Zamani, M. R., Aslani, S., Salmaninejad, A., Javan, M. R., & Rezaei, N. (2016). PD-1/PD-L and autoimmunity: A growing relationship. *Cellular Immunology, 310*, 27-41. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.09.009.

Zhou, G., Zhang, J., Ren, X. W., Hu, J. Y., Du, G. F., Xu, X. Y. (2012). Increased B7-H1 expression on peripheral blood T cells in oral lichen planus correlated with disease severity. *Journal of Clinical Immunology, 32*(4), 794-801. doi: 10.1007/s10875-012-9683-2.

This article is protected by copyright. All rights reserved

Figure legends

Figure 1. (A, B) Photomicroscopy illustrating oral lichen planus samples with an intense mononuclear inflammatory infiltrate, a band-like infiltrate of lymphocytes and destruction of basal/suprabasal layers (haematoxylin and eosin; original magnification **A**, **B**, ×10). **(C)** PD-L1 expression in the keratinocyte and mononuclear cell membrane. **(D)** Absence of PD-L1$^+$ cells [Immunohistochemistry (IHQ); original magnification **C**, **D**, ×100]. **(E, F)** PD-L2 expression was elevated in OLP in both keratinocytes and mononuclear immune-inflammatory cells. (IHQ; original magnification **E**, **F**, ×100).

Figure 2. Photomicroscopy exhibiting density of CD8$^+$ **(A, B)**, GrB$^+$ **(C, D)** and PD-1$^+$ **(E, F)** cell population in oral lichen planus. (Immunohistochemistry; original magnification **A**, **C**, **E** ×40, and **B**, **D**, **F**, ×100).

Figure 3. Schematic presentation of the PD-L1/PD-L2/PD-1 and cytotoxic immune response in oral lichen planus (OLP) aetiopathogenesis. OLP exhibits the absence and/or low expression of PD-L1. On the other hand, high PD-L2 expression is observed. A possible regulation of the cytotoxic immune response is observed based on the low relationship between the number of CD8$^+$ TL and the GrB cytotoxic enzyme in OLP. Overall, the PD-L2 molecule may contribute to a possible regulation of CD8$^+$ TL cytotoxicity. It is suggested that there is a balance between co-stimulatory and co-inhibitory stimuli, possibly reflecting the chronic profile of this condition.

This article is protected by copyright. All rights reserved

Table 1. Demographic data and clinical characteristics of oral lichen planus cases (n=33)

Variable	Number (%)
Sex	
Female	22 (66.7)
Male	11 (33.3)
Age, mean ± SD (range)	46.9 ± 11.6 years (22-67)
Anatomical location	
Buccal mucosa	25 (75.7)
Lateral border of tongue	8 (24.2)
Dorsum of tongue	8 (24.2)
Palate	7 (21.2)
Gingiva	6 (27.7)
Symptomatology	
Symptomatic	24 (72.7)
Erosive subtype	17 (70.8)
Reticular subtype	6 (25.0)
Bullous subtype	1 (4.2)
Asymptomatic	9 (27.3)
Reticular subtype	9 (100.0)
Clinical subtype	
Reticular	15 (45.4)
Erosive	17 (51.5)
Bullous	1 (3.1)
Corticotherapy	
Topical administration	23 (69.9)
Topical + systemic administration	6 (18.1)
Not available	4 (12.0)
Response to corticotherapy	
Positive	11 (33.3)
Absent	16 (48.4)
Not available	6 (18.3)
Recurrence	
Yes (<6 months)	13 (39.3)
No (mean of 12 months of follow-up)	15 (45.4)
Not available	5 (15.3)

Accepted Article

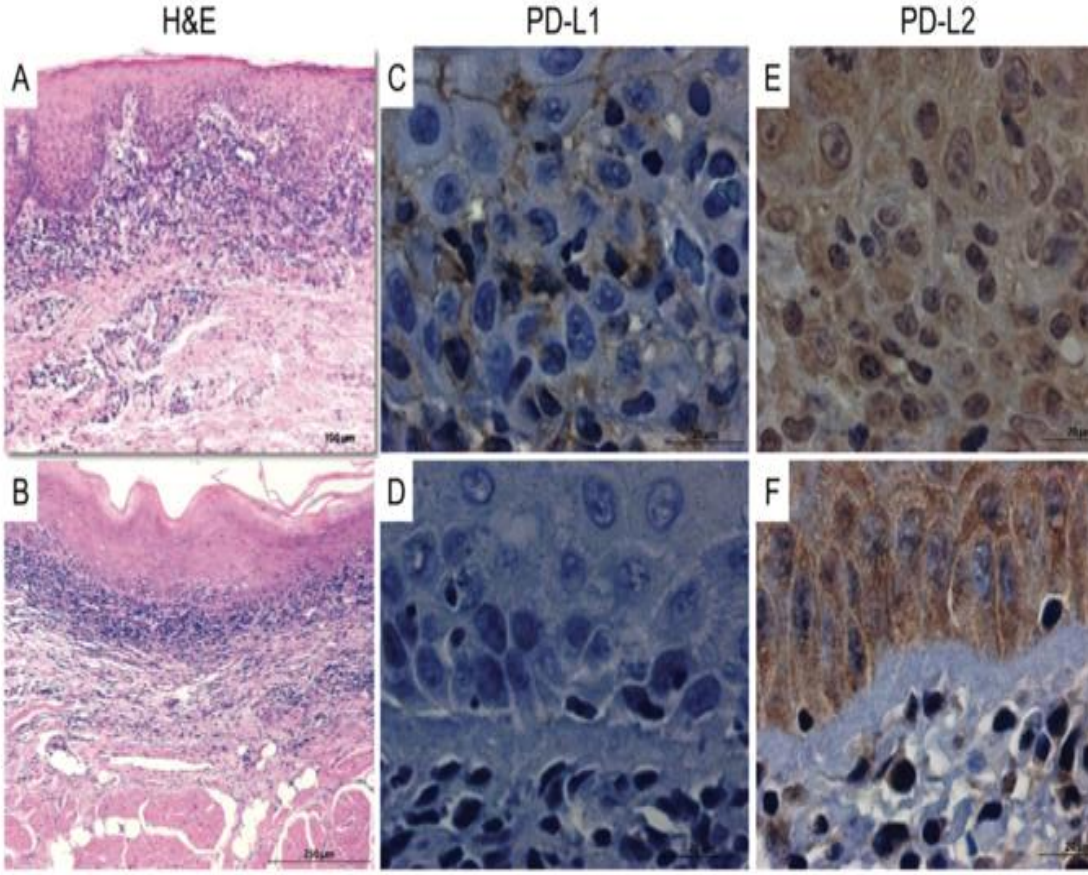
pted Article

Table 2. Mean, median, and density range of PD-1$^+$, CD8$^+$ and GrB$^+$ cell populations distributed within the intraepithelial re
(subepithelial) connective tissue of reticular (n=15) and erosive/bullous (E/B) (n=18) oral lichen planus samples

		Intraepithelial				Subepithelial		
		PD-1	**CD8**	**GrB**	**CD8:GrB**	**PD-1**	**CD8**	**GrB**
Reticular	Mean	117.6	245.3	35.9	10.8	510.6	913.8	161.2
	Median	76	179	29	8.5	492	857	127.5
	Range	66-211	62-590	0-177	1-29	395-645	222-1620	38-545
E/B	Mean	78.4	284.7	96.3	4.4	635.5	1350.1	246.9
	Median	94	305	80	3.5	360	1129	235.5
	Range	14-135	55-503	6-248	1-11	118-2012	340-2470	45-506
	p-value*	0.69	0.53	0.004	0.01	0.39	0.02	0.02

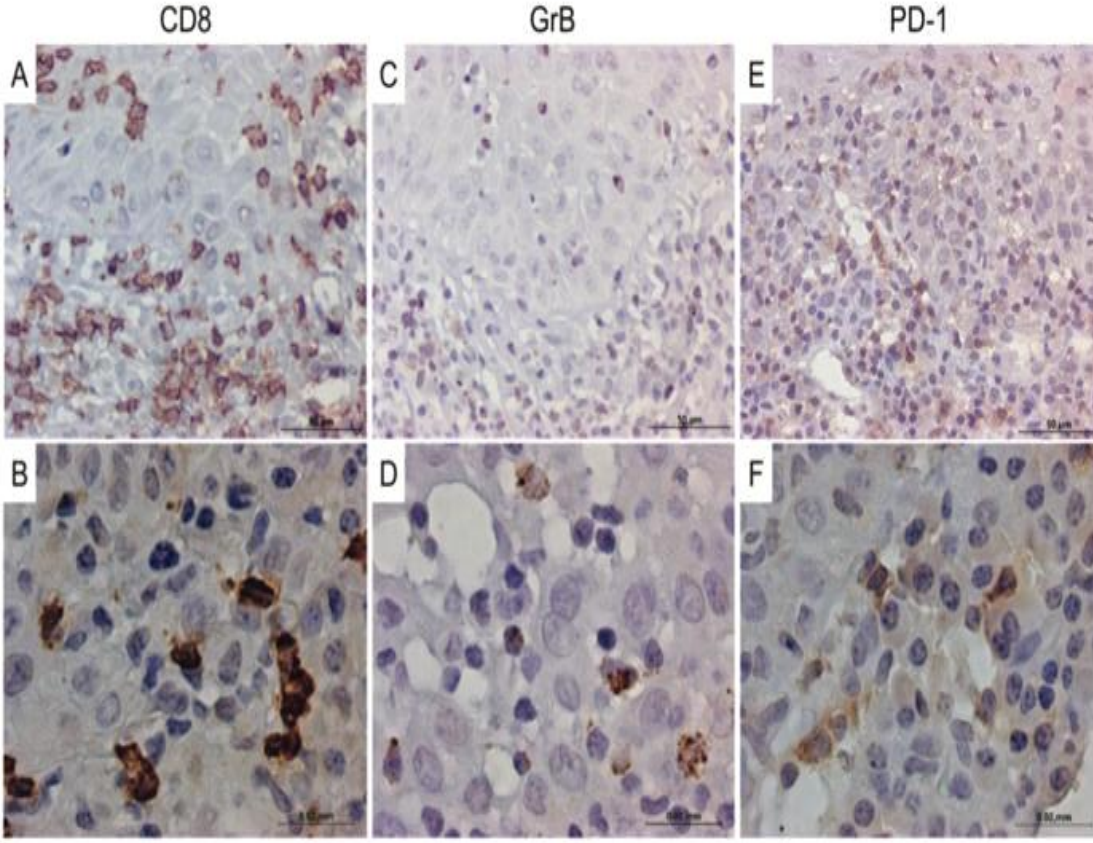
*Mann-Whitney test.

Article

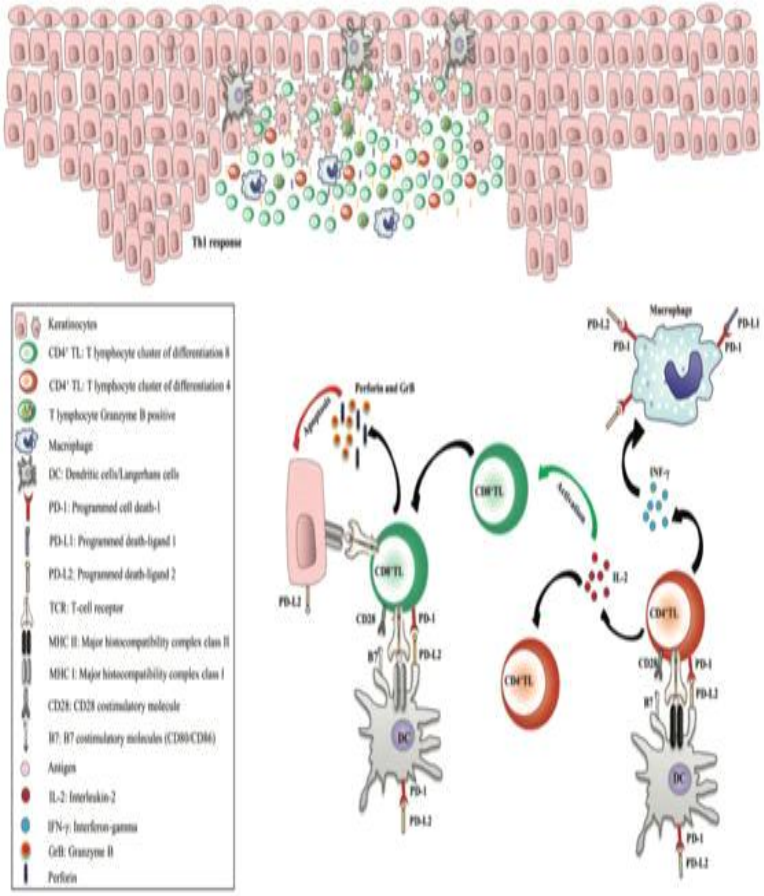


odi_13344_f1.jpg

Article



odi_13344_f2.jpg



odi_13344_f3.jpg

REFERÊNCIAS (Dissertação)

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S**. Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ALEXANDER, H.K.; WAHL, L.M. Self-tolerance and Autoimmunity in a Regulatory T Cell Model. **Bull Math Biol**, v.73, p. 33-71, 2011.

ANSARI, M.J.; SALAMA, A. D.; CHITNIS, T.; SMITH, R. N.; YAGITA, H.; AKIBA, H.; YAMAZAKI, T.; AZUMA, M.; IWAI, H.; KHOURY, S. J.; AUCHINCLOSS, H. J. R.; SAYEGH, M. H. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. **Journal of Experimental Medicine**, v.198, n.1, p. 63-9, jul. 2003.

AU, J.; PATEL, D.; CAMPBELL, J. H. Oral Lichen Planus. Oral and Maxillofacial **Surgery Clinics of North America**, v. 25, n. 1, p. 93–100, 2013.

CHAMOTO, K.; AL-HABSI, M.; HONJO, T. Role of PD-1 in immunity and diseases. **Microbiology and Imunnology**, v.410, set. 2017.

CHENG, Y. S. L.; GOULD, A.; KURAGO, Z.; FANTASIA, J.; MULLER, S. Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v.122, n.3, p. 332 -54, set. 2016.

CHIANG, C-P.; CHANG, J. Y-F.; WANG, Y-P.; WU, Y-H.; LU, S-Y.; SUN, A. Oral lichen planus e differential diagnoses, serum autoantibodies, hematinic deficiencies, and management. **Journal of the Formosan Medical Association**, 2018.

COSTA, N.L.; GONÇALVES, A.S.; SOUZA-LIMA, N.C.; JAIME-PAIVA, L.G.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P.; SILVA, T.A, MENDONÇA, E.F.; BATISTA, A.C. Distinct expression of perforin and granzyme B in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.40, n.5, p. 380-4, mai. 2011.

DAI, S; JIA, R.; ZHANG, X.; FANG, Q.; HUANG, L. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases. **Cellular Immunology**. v.290, n.1, p.72-9. jul. 2014.

DILLENBURG, C.S.; MARTINS, M. A. T.; ALMEIDA, L. O.; MEURER, L.; SQUARIZE, C. H.; MARTINS, M. D.; CASTILHO, R. M. Epigenetic Modifications and Accumulation of DNA Double-Strand Breaks in Oral Lichen Planus Lesions Presenting Poor Response to Therapy. **Medicine (Baltimore)**. v.94, n.30, jul. 2015.

DU, G. H.; QIN, X. P.; LI, Q.; ZHOU, Y. M.; SHEN, X. M.; TANG, G. Y. The high expression level of programmed death-1 ligand 2 in oral lichen planus and the possible costimulatory effect on human T cells. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.40, n.7, 525–532, 2011.

FRANCISCO, L.M.; SAGE, P.T.; SHARPE, A.H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. **Immunological Reviews**, v. 236, p.219-42, jul. 2010.

GONÇALVES, A. S.; MOSCONI, C.; JAEGER, F.; WASTOWSKI, I. J.; AGUIAR, M. C. F.; SILVA, T. A.; RIBEIRO-ROTTA, R. F.; COSTA, N. L.; BATISTA, A. C. Overexpression of immunomodulatory mediators in oral precancerous lesions. **Human Immunology**, 78(11-12):752-757. nov.2017.

GONZÁLEZ-MOLES, M. Á.; RUIZ-ÁVILA, I.; GONZÁLEZ-RUIZ, L.; AYÉN, Á.; GILMONTOYA, J. A.; RAMOS-GARCÍA, P. Malignant transformation risk of oral lichen planus: A systematic review and comprehensive meta-analysis. Oral **Oncology**, v.96, p.121–130, 2019.

GOROUHI, F; DAVARI, P; FAZEL, N. Cutaneous and mucosal lichen planus: a comprehensive review of clinical subtypes, risk factors, diagnosis, and prognosis. **The Scientific World Journal**, v. 2014, n. 742826, p. 1–22, 2014.

HOFMANN, L.; FORSCHNER. A.; LOQUAI, C.; GOLDINGER, S. M.; ZIMMER, L.; UGUREL, S.; SCHMIDGEN, M. I.; GUTZMER, R.; UTIKAL, J. S.; GÖPPNER, D.; HASSEL, J. C.; MEIER, F.; TIETZE, J. K.; THOMAS, I.; WEISHAUPT, C.; LEVERKUS, M.; WAHL, R.; DIETRICH, U.; GARBE, C.; KIRCHBERGER, M. C.; EIGENTLER, T.; BERKING, C.; GESIERICH, A.; KRACKHARDT, A. M.; SCHADENDORF, D.; SCHULER,

G.; DUMMER, R.; HEINZERLING, L. M. Cutaneous, gastrointestinal, hepatic, endocrine, and renal side-effects of anti-PD-1 therapy. **European Journal of Cancer**, v.60, p.190-209, jun. 2016.

JAVVADI, L.R.; PARACHURU, V.P.B.; MILNE, T.J.; SEYMOUR, G.J.; RICH, A.M. Regulatory T-cells and IL17A+ cells infiltrate oral lichen planus lesions. **Pathology**, v.48, n.6, p. 564-73, 2016.

KUOL, N.; STOJANOVSKA, L.; NURGALI, K.; APOSTOLOPOULOS, V. PD-1/PD-L1 in disease. **Immunotherapy**, v.10, n.2, p. 149-60, 2018.

KURAGO, Z. B. Etiology and pathogenesis of oral lichen planus: an overview. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology Oral Radiology**, v.122, n.1, jul. 2016.

LOPES, M.L.D.S.; GONZAGA, A. K. G.; MOSCONI, C.; PALOMINO, G. M.; MENDONÇA, E. F.; BATISTA, A. C.; SILVEIRA, É. J. D. D. Immune response and evasion mechanisms in lip carcinogenesis: an immunohistochemical study. **Archives of Oral Biology**, v.98, p.99-107, fev. 2019.

MESSAL, N.; SERRIARI, N.-E.; PASTORA, S; NUNÈS, J.A.; OLIVE, D. PD-L2 is expressed on activated human T cells and regulates their function. **Molecular Immunology**, v. 48, p. 2214-19, 2011.

MIRZAA, S.; REHMANB, N.; ALRAHLAHC, A.; ALAMRID, W.R.; VOHRAE, F. Efficacy of photodynamic therapy or low level laser therapy against steroid therapy in the treatment of erosive-atrophic oral lichen planus. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.21, p. 404-8, 2018.

MOSCONI, C.; DE ARRUDA, J. A. A.; DE FARIAS, A. C. R.; OLIVEIRA, G. A. Q.; DE PAULA, H. M.; FONSECA, F. P.; MESQUITA, R. A.; SILVA, T. A.; MENDONÇA, E. F.; BATISTA, A. C. Immune microenvironment and evasion mechanisms in adenoid cystic carcinomas of salivary glands. **Oral Oncol**, v.88, p.95-101, 2019.

NICO, M.M.S.; FERNANDES, J.D.; LOURENÇO, S.V. Líquen plano oral. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.4, p. 633-43, 2011.

OBERTI, L; LUCCHESE, A.; PETRUZZI, M; CARINCI, F; LAURITANO, D. Clinical Management of Oral Lichen Planus: A Systematic Review. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.09, n.0, 2019.

OKAZAKI, T.; HONJO, T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. **International Immunology**, v.19, n.7, p.813-24, 2007.

PEDOEEM, A.; AZOULAY-ALFAGUTER, I; STRAZZA, M.; SILVERMAN, G.J. ; MORA, A. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity. **Clinical Immunology**, v.153, p. 145-52, abr. 2014.

PAYERAS, M.R.; CHERUBINI, K.; FIGUEIREDO, M.A.; SALUM, F.G. Oral lichen planus: focus on etiopathogenesis. **Archives of Oral Biology**, v.58, n.9 p. 1057-69, set. 2013.

RITPRAJAK, P.; AZUMA, M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v.51, p. 221-8, 2015.

SANKETH, D. S.; PATIL, S., SWETHA, B. Oral lichen planus and epithelial dysplasia with lichenoid features: a review and discussion with special reference to diagnosis. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v.8, n.3, 2017.

SCHABERG, B. K.; NOVOA, R.A.; WAKELEE, H.A.; KIM, J.; CHEUNG, C.; SRINIVAS, S.; KWONG, B.Y. Immunohistochemical analysis of lichenoid reactions in patients treated with anti-PD-L1and anti-PD-1 therapy. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 43, p. 339-4, 2016.

SCHIETINGER, A.; GREENBERG, P.D. Tolerance and exhaustion_defining mechanisms of T cell dysfunction. **Trends in Immunology**, v.35, n.2, p. 51-60, fev. 2014.

SHIN, T et. al. Cooperative B7-1/2 (CD80/CD86) and B7-DC costimulation of CD4+ T cells independent of the PD-1receptor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n.1, p. 31-8, jul. 2003.

SUGERMAN, P.B.; SAVAGE, N.W.; WALSH, L.J.; ZHAO, Z.Z.; ZHOU, X.J.;KHAN A, SEYMOUR, G.J.; BIGBY, M. The pathogenesis of oral lichen planus. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.13, n.4, p.350-65, 2002.

TRAPANI JA, DAVIS J, SUTTON VR, SMYTH MJ. Proapototic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. **Current Opinion in Immunology**, v.12, n.3, p.323-9, jul. 2000.

VOSKOBOINIK, I.; WHISSTOCK, J.C.; TRAPANI, J.A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. **Natures Reviews Immunology**, v.15, n.6, p. 388-400, jun. 2015.

XING, Y.; HOGQUIST, K.A. T-Cell Tolerance: central and peripheral. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.4, 2012.

WAKADE, D.V.; CARLOS, G.; HWANG, S.J.E.; CHOU, S.; HUI, R.; FERNANDEZ-PEÑAS, P. PD-1 inhibitors induced bullous lichen planus-like reactions: a rare presentation and report of three cases. **Melanoma Research**, v.26, n.4, p.421-4, ago. 2016.

WANG, C.J.; CHOU, F. C.; CHU, C. H.; WU, J. C.; LIN, S. H.; CHANG, D. M.; SYTWU, H. K. Protective role of programmed death 1 ligand 1 (PD-L1) in nonobese diabetic mice: the paradoxal in transgenic models. **Diabetes**, v.57, n.7, p. 1861-9, jul. 2008.

YOUNGNAK–PIBOONRATANAKIT, P.; TSUSHIMA, F.; OTSUKI, N.; IGARASHI, H.; MACHIDA, U.; IWAI, H.; TAKAHASHI, Y.; OMURA, K.; YOKOZEKI, H.; AZUMA, M. The expression of B7-H1 on keratinocytes in chronic inflammatory mucocutaneous disease and its regulatory role. **Immunology Letters**, v.94, n.3, p.215-22, jul. 2004.

YUAN, X.; CHENG, G.; MALEK, T.R. The importance of regulatory T-cell heterogeneity in maintaining self-tolerance. **Immunological Reviews**, v.259, p.103-14, 2014.

ZAMANI MR, ASLANI S, SALMANINEJAD A, JAVAN MR, REZAEI N. PD-1/PD-L and autoimmunity: A growing relationship. **Cellular Immunology**, v.310, p. 24-41, dez. 2016. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.09.009.

ZHANG, N.; TU, J.; WANG, X.; CHU, Q. Programmed cell death-1/programmed cell death ligand-1 checkpoint inhibitors: differences in mechanism of action. **Immunotherapy**, v.11, n.5, p. 429-41, 2019.

ZHOU, G.; ZHANG, J.; REN, X. W.; HU, J. Y.; DU, G. F.; XU, X. Y. Increased B7-H1 expression on peripheral blood T cells in oral lichen planus correlated with disease severity. **Journal of Clinical Immunology**, v.32, n.4, p.794-801, ago. 2012.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa

UFG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D 3 [1,25 (OH)2] EM PACIENTES COM LÍQUEN PLANO ORAL E SUA ASSOCIAÇÃO COM A SEVERIDADE DESTA DOENÇA

Pesquisador: Aline Carvalho Batista

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 02766818.0.1001.5083

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.095.226

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D 3 [1,25 (OH)2] EM PACIENTES COM LÍQUEN PLANO ORAL E SUA ASSOCIAÇÃO COM A SEVERIDADE DESTA DOENÇA. Pesquisadora Responsável: Aline Carvalho Batista. n.CAAE: 02766818.0.1001.5083. Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás.

Membros da Equipe de Pesquisa: José Alcides Almeida de Arruda; Diego Antonio Costa Arantes; SARA LIA GONCALVES; Tarcília Aparecida da Silva; Ricardo Alves de Mesquita.

Estudo observacional caso-controle para avaliar a frequência e o risco (associação com a severidade) da deficiência de VD3 em pacientes com LPO. Serão selecionados pacientes com diagnóstico clínico e microscópico de LPO. A frequência relativa de deficiência de VD3 na população com LPO será comparada àquela de indivíduos sem a doença pareados por idade e sexo. O risco ou influência da deficiência VD3 na severidade do LPO será investigado a partir da avaliação dos níveis séricos da VD3 nos pacientes acometidos e, considerando os grupos com e sem deficiência propõe-se investigar a associação da VD3 com parâmetros clínicos de severidade da doença tais como tipo clínico, sintomatologia, recorrência e resposta a corticoterapia. Em adição, os níveis séricos de VD3 dos pacientes com LPO serão correlacionados com a concentração de citocinas inflamatórias salivares (mensuradas por citometria de fluxo - cytometric bead array) e com a porcentagem de queratinócitos positivos para o receptor de vitamina D (VDR)(identificados

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
Bairro: Campus Samambaia, UFG **CEP:** 74.690-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com

pela técnica de imunoistoquímica). Será realizada a análise descritiva. Testes paramétricos ou não paramétricos serão empregados para testar a associação entre deficiência de VD3, sexo, idade, localização, tipo clínico, sintomatologia, recorrência, resposta à corticoterapia, manifestações extrabucais, citocinas próinflamatórias salivares e VDR. Adicionalmente, testes de correlação serão aplicados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os níveis séricos de vitamina D3[1,25 (OH)2] em pacientes com líquen plano oral (LPO) e se há relação desses níveis com os parâmetros clínicos de severidade da doença.

Objetivo Secundário:

• Mensurar os níveis séricos de vitamina D3 [1,25 (OH)2] (VD3) em pacientes diagnosticados com líquen plano oral (LPO) e acompanhados nos Serviços de Estomatologia das Faculdades de Odontologia da UFG, UFMG e UFRS entre 2018 e 2023;

• Determinar comparativamente a frequência de deficiência de VD3 entre pacientes com LPO e àquela em indivíduos sem doença;

• Associar os níveis sérios de VD3 dos pacientes com LPO com parâmetros clínicos de severidade da doença: epidemiológicos; tipo clínico; sintomatologia; recorrência e resposta à corticoterapia;

• Associar a expressão de VDR pelos queratinócitos e células imune-inflamatórias nas amostras teciduais dos pacientes com LPO com parâmetros clínicos de severidade da doença;

• Correlacionar os níveis da VD3 e VDR com citocinas inflamatórias salivares;

• Determinar se pacientes com VD3deficiente/VDRbaixo; VD3normal/VDRbaixo; VD3baixo/VDRnormal e VD3normal/VDRnormal possui associação com parâmetros clínicos de severidade da doença e com citocinas inflamatórias salivares.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Desconforto ao paciente o qual poderá ser gerado nos procedimentos de coleta de saliva e obtenção do fragmento de biópsia. As informações coletadas serão estritamente confidenciais, garantindo o sigilo, confidencialidade e a privacidade dos participantes.

Contribuir com o entendimento da patogênese do LPO, contribuir com tratamento mais individualizado (com reposição de VD3 naqueles pacientes com deficiência) e, dependendo dos resultados, esse estudo poderá auxiliar na implementação de protocolos e terapias auxiliares no

procedimento de diagnóstico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

-Folha de Rosto devidamente assinada;

-Cronograma com inicio em março de 2019;

- TCLE: está redigido em forma de convite, apresenta objetivos e justificativas bem como se dará a coleta de dados, a um box solicitando ou não a autorização da utilização o material coletado em nova pesquisa,há um box que garante autonomia dos participantes em receber ou não os resultados bem como em autorizar toda e nova qualquer pesquisa e ser informado também quando o material for destruído. Garante o sigilo, a privacidade e a confidencialidade. Apresenta no TCLE a garantia do direito a indenização em caso de danos advindos da pesquisa.

-Orçamento: Próprio;

-Apresentam anuências das instituições coparticipantes (UFMG e UFRS);

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise dos documentos postados somos favoráveis à aprovação do presente protocolo de pesquisa, smj deste Comitê.

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1207053.pdf	18/12/2018 15:00:22		Aceito
Outros	CARTA_ATENDIMENTO_PENDENCIAS.pdf	18/12/2018 14:59:15	Aline Carvalho Batista	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_SaraLia_detalhado_corrigido.pdf	18/12/2018 14:58:54	Aline Carvalho Batista	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_LPO_corrigido.pdf	18/12/2018 14:58:13	Aline Carvalho Batista	Aceito

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
Bairro: Campus Samambaia, UFG **CEP:** 74.690-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com

tratamento dessa doença, podendo, então, os pacientes serem BENEFICIADOS diretamente, uma vez que o custo da realização destas investigações moleculares como do VDR nas amostras teciduais e de citocinas inflamatórias em saliva é alto. Os participantes dessa pesquisa também terão BENEFÍCIOS indiretos, de forma que o conhecimento construído a partir desta pesquisa possa colaborar para o entendimento e tratamento dessa doença autoimune altamente frequente em boca.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Critério de Inclusão:

Pacientes com LPO diagnosticados de acordo com os critérios propostos pela Academia Americana de Patologia Oral e Maxilofacial (AAOMP/2016),tratados e acompanhados no Centro Goiano de Doenças da Boca (CGDB) e nos centros parceiros nos anos de 2018 e 2019.

Critério de Exclusão:

Pacientes com uso de corticoterapia ou anti-inflamatórios nos últimos 6 meses; com reposição de vitamina D [1,25 (OH)2] nos últimos 12 meses; pacientes que não responderem ao contato e sem seguimento mínimo de 6 meses.

Metodologia:

Estudo observacional, caso-controle, multicêntrico: Universidade Federal de Goiás (UFG) com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS). Local de execução da pesquisa na UFG: Centro Goiano de Doenças da Boca da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (CGDB/FO/UFG) do Laboratório de Patologia Bucal e Laboratório de Imunoistoquímica e Análise da Saliva da FO/UFG e dos Serviços de Estomatologia das Universidades Federais de Minas Gerais (UFMG) e do Rio Grande do Sul (UFRS). O participante do presente será atendido no CGDB/FO/UFG e Serviços de Estomatologia das UFMG e UFRS para diagnóstico e tratamento de lesões de boca. Os pacientes com lesões com hipótese de diagnóstico de LPO em cavidade oral e lábio será submetido a biópsia incisional para avaliação no Laboratório de Patologia dos aspectos microscópicos e emissão de laudo anatomopatológico. Será coletada saliva e avaliadas. O procedimento de biópsia possui RISCO mínimo, uma vez que isto será realizado em Consultório Odontológico equipado, limpo adequadamente, com campos cirúrgicos estéril, com material cirúrgico e equipamento estéril e, realizada por cirurgião dentista estomatologista. No caso de eventual complicação trans-operatória, todos os Serviços apresentam os equipamentos de primeiros socorros(oxigênio, medicação, desfibrilador. A biópsia faz parte do

procedimento de diagnóstico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

-Folha de Rosto devidamente assinada;

-Cronograma com inicio em março de 2019;

- TCLE: está redigido em forma de convite, apresenta objetivos e justificativas bem como se dará a coleta de dados, a um box solicitando ou não a autorização da utilização o material coletado em nova pesquisa,há um box que garante autonomia dos participantes em receber ou não os resultados bem como em autorizar toda e nova qualquer pesquisa e ser informado também quando o material for destruído. Garante o sigilo, a privacidade e a confidencialidade. Apresenta no TCLE a garantia do direito a indenização em caso de danos advindos da pesquisa.

-Orçamento: Próprio;

-Apresentam anuências das instituições coparticipantes (UFMG e UFRS);

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise dos documentos postados somos favoráveis à aprovação do presente protocolo de pesquisa, smj deste Comitê.

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1207053.pdf	18/12/2018 15:00:22		Aceito
Outros	CARTA_ATENDIMENTO_PENDENCIAS.pdf	18/12/2018 14:59:15	Aline Carvalho Batista	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_SaraLia_detalhado_corrigido.pdf	18/12/2018 14:58:54	Aline Carvalho Batista	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_LPO_corrigido.pdf	18/12/2018 14:58:13	Aline Carvalho Batista	Aceito

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
Bairro: Campus Samambaia, UFG **CEP:** 74.690-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LPO_corrigido.pdf	18/12/2018 14:57:55	Aline Carvalho Batista	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	UFMG_LPO.pdf	12/11/2018 18:55:30	Aline Carvalho Batista	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	HCPA_LPO.pdf	12/11/2018 18:54:18	Aline Carvalho Batista	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	12/11/2018 18:51:15	Aline Carvalho Batista	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_LPO.pdf	23/10/2018 13:43:19	Aline Carvalho Batista	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

GOIANIA, 19 de Dezembro de 2018

Assinado por:
João Batista de Souza
(Coordenador(a))

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
Bairro: Campus Samambaia, UFG **CEP:** 74.690-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com

ANEXO B – Normas da Revista Oral Diseases

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge
Articles exceeding 6 published pages, including title page, abstract, references, table/figure legends and tables and figures, are subject to a charge of GBP70 per additional page. As a guide, one published page amounts approximately to 850 words, or two to four small tables/figures. Additional supplementary material (including text and figures), which does not fit within the page limits, can be published online only as supporting information.

5.2. Format

Language: Authors should write their manuscripts in British English using an easily readable style. Authors whose native language is not English should have a native English speaker read and correct their manuscript. Spelling and phraseology should conform to standard British usage and should be consistent throughout the paper. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Presentation: Authors should pay special attention to the presentation of their findings so that they may be communicated clearly. The background and hypotheses underlying the study as well as its main conclusions should be clearly explained. Titles and abstracts especially should be written in language that will be readily intelligible to any scientist.

Technical jargon: should be avoided as much as possible and clearly explained where its use is unavoidable.

Abbreviations: Oral Diseases adheres to the conventions outlined in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used.

5.3. Structure: All papers submitted to *Oral Diseases* should include:

- Title Page
- Structured Abstract
- Main text
- References
- (Figures)
- (Figure Legends)
- (Tables)

Title Page: should be part of the manuscript uploaded for review and include:

- A title of no more than 100 characters including spaces
- A running title of no more than 50 characters
- 3-6 keywords
- Complete names and institutions for each author
- Corresponding author's name, address, email address and fax number
- Date of submission (and revision/resubmission)

Abstract: is limited to 200 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form set out under:

- Objective(s),
- Subject(s) (or Materials) and Methods,
- Results,
- Conclusions(s).

The Main Text of Original Research Articles should be organised as follows

Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are inappropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation.

Materials and Methods must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This includes antibodies and the constructs used to make transgenic animals, although not the animals themselves. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(i) Clinical trials: As noted above, these should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Clinical trials can be registered in any of the following free, public clinical trials registries: **www.clinicaltrials.gov**, **http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/**, **http://isrctn.org/**.As stated in an editorial published in *Oral Diseases* (12:217-218), 2006), all manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website. The clinical trial registration number and name of the trial register will be published with the paper.

(ii)Experimental subjects: As noted above, experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association **Declaration of Helsinki** (version 2002) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used. When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

***(iii) Suppliers*:** Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Results: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations.

Discussion: may usually start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results sections should be avoided. The section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

Acknowledgements: Should be used to provide information on sources of funding for the research, any potential conflict of interest and to acknowledge contributors to the study that do not qualify as authors. All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. Where people are acknowledged, a cover letter demonstrating their consent must be provided.

5.4. References

References should be prepared according to the *Publication Manual of the American Psychological Association* (6th edition). This means in-text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). For references with three to five authors, all authors should be listed only on the first occurrence of the in-text citation, and in subsequent in-text occurrences only the first author should be listed followed by '*et al.*'. The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper.

A sample of the most common entries in reference lists appears below. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the **APA website**. Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one.

Journal article

Example of reference with 2 to 7 authors

Beers, S. R., & De Bellis, M. D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry, 159*, 483–486. doi: 10.1176/appi.ajp.159.3.483

Ramus, F., Rosen, S., Dakin, S. C., Day, B. L., Castellote, J. M., White, S., & Frith, U. (2003). Theories of developmental dyslexia: Insights from a multiple case study of dyslexic adults. *Brain, 126*(4), 841–865. doi: 10.1093/brain/awg076

Example of reference with more than 7 authors

Rutter, M., Caspi, A., Fergusson, D., Horwood, L. J., Goodman, R., Maughan, B., … Carroll, J. (2004). Sex differences in developmental reading disability: New findings from 4 epidemiological studies. *Journal of the American Medical Association, 291*(16), 2007–2012. doi: 10.1001/jama.291.16.2007

Book edition

Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school* (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed.

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Figures: All figures and artwork must be provided in electronic format. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS) and bitmap files (e.g. half-tones) or clinical or in vitro pictures in Tagged Image Format (TIFF).

Detailed information on our digital illustration standards can be found at **http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp**.

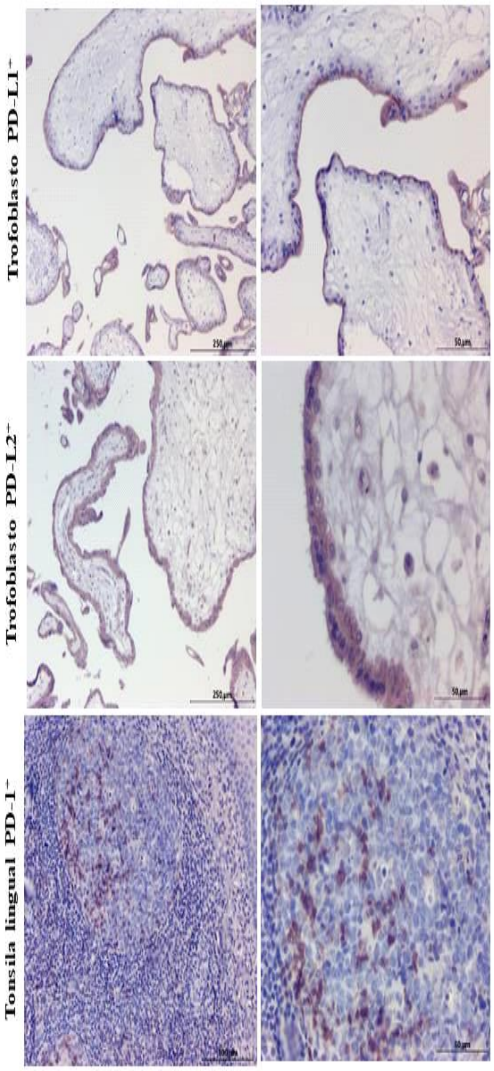
Check your electronic artwork before submitting it: **http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp**.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same type size as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and unit, and follow SI nomenclature common to a particular field. Unusual units and abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc).

Color figures

Color figures may be published online free of charge; however, the journal charges for publishing figures in colour in print. If the author supplies colour figures at Early View publication, they will be invited to complete a colour charge agreement in RightsLink for Author Services. The author will have the option of paying immediately with a credit or debit card, or they can request an invoice. If the author chooses not to purchase color printing, the figures will be converted to black and white for the print issue of the journal.

APÊNDICES

APENDICE A – Controles positivos