



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

RENATA APARECIDA BELOTTO

**LÍQUEN ESCLEROSO VULVAR :COMPARAÇÕES DAS TERAPIAS DE
FOTOBIMODULAÇÃO, FOTODINÂMICA E CORTICOSTERÓIDE TÓPICO
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA , IMUNOHISTOQUÍMICA E CLÍNICA-
ESTUDO FASE II**

São Paulo, SP.

2018



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA

RENATA APARECIDA BELOTTO

**LÍQUEN ESCLEROSO VULVAR :COMPARAÇÕES DAS TERAPIAS DE
FOTOBIMODULAÇÃO, FOTODINÂMICA E CORTICOSTERÓIDE TÓPICO
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA , IMUNOHISTOQUÍMICA E CLÍNICA-
ESTUDO FASE II**

Dissertação apresentada à Universidade
Nove de Julho para obtenção do título de
Doutor em Medicina

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina
Chavantes.

Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Correa

São Paulo, SP.

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Nome autor: Renata Aparecida Belotto

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Chavantes

Dissertação – Doutorado: **“LÍQUEN ESCLEROSO VULVAR:
COMPARAÇÕES DAS TERAPIAS DE FOTOBIMODULAÇÃO,
FOTODINÂMICA E CORTICOSTERÓIDE TÓPICO - AVALIAÇÃO
HISTOPATOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E CLÍNICA :
ESTUDO FASE II .”**

São Paulo, 18 de dezembro de 2018.

TERMO DE APROVAÇÃO

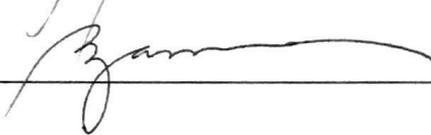
Aluno (a): **Renata Aparecida Belotto**

Título da Dissertação: **AVALIAÇÃO CLÍNICA, HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA EM LIQUEM ESCLEROSO VULVAR COMPARATIVAMENTE ENTRE TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO, FOTODINÂMICA E CORTICOIDE: ESTUDO FASE II**

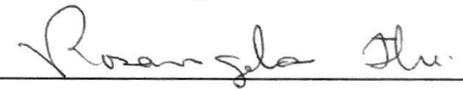
Presidente: PROFA. DRA. MARIA CRISTINA CHAVANTES



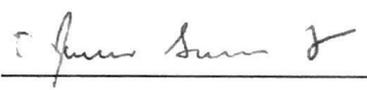
Membro: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER



Membro: PROFA. DRA. ROSANGELA ITRI



Membro: PROF. DR. GLAUCO BAIOCCHI NETO



Membro: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI



DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Lucília A.M. Belotto e Arthur Belotto Filho (in memoriam), por me fazerem acreditar nos meus sonhos e lutar por eles, por terem me ensinado os caminhos da fé, respeito e honestidade, mas sobretudo, sobre a gratidão! Para vocês eu dedico essa tese com todo meu amor e toda minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Deus que está em tudo.

Ao meu irmão Reinaldo e meu sobrinho Arthur pela paciência, compreensão e apoio.

À Profa. Dra. Maria Cristina Chavantes, não apenas por ser uma orientadora multisciente e um exemplo a seguir, mas principalmente pelo companheirismo, amizade, pelas inúmeras horas investidas nesse estudo e pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis, só posso expressar a minha eterna gratidão.

À Prof^a. Dra. Luciana Correa, Coorientadora desse estudo, pelo acolhimento, carinho e pela ajuda desde a imuno-histoquímica até a discussão do estudo, por oferecer seu laboratório dentro da Universidade de São Paulo para a leitura e interpretação das lamínas que, com certeza sem esse apoio, eu não teria a oportunidade de avaliar todos os marcadores propostos, não tenho palavras para agradecer.

Agradeço imensamente a Marina e Flávia, que ajudaram na leitura dos marcadores de imuno-histoquímica e que me receberam com tanto carinho no laboratório da Prof^a.Dra. Luciana Correa.

À Prof^a. Dra. Waleska K. Martins, querida Wal, pelo tempo que pacientemente dedicou à elaboração dos dados de bioestatística, além das orientações e carinho que teve comigo nessa jornada, sem sua ajuda essa tese estaria incompleta, minha sincera gratidão.

Queridas Prof^{as}. Dras. Rosângela Itri, Martha Simões, Elisabeth M. Yoshimura e Sílvia Nunez, não tenho palavras para agradecer todo o apoio e amizade de vocês! A colaboração, a ajuda de todas me ensinando e apoiando nessa trajetória.” Abençoados os que possuem amigos, os que os tem sem pedir. Porque amigo não se pede, não se compra, não se vende. Amigo a gente sente”. Obrigada amigas de todo coração!

Ao Prof. Dr. João Paulo Tardivo, que sempre me apoiou, me ensinou e guiou no entendimento da PDT, querido amigo e inspiração!

Ao Prof. Dr. Roberto Euzébio dos Santos, pelo incentivo e amizade, por confiar no meu trabalho e me dar oportunidades que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa clínica. Todo o meu respeito e admiração, meu agradecimento eterno.

Às queridas Prof^{as}. Dras. Maria Aparecida Dalboni e Stella R. Zamuner pelas orientações desde a qualificação, como também sobre a estrutura da tese e aspectos éticos, minha sincera admiração e gratidão.

À minha amiga Prof.^a. Dra. Raquel C.M. Fernandes pelos ensinamentos em histologia, pela colaboração incansável nesse e em outros projetos de pesquisa, pela amizade e parceria, sem a sua ajuda a tese não teria a riqueza de detalhes e imagens da histologia, não tenho palavras para agradecer.

Meu agradecimento especial a Ana Carolina de Magalhães, Luiz Antônio Jesus Rocha, Sarah M. Marques e Raphael S.S. Medeiros, pela ajuda na difícil missão da bioestatística, avaliação e orientação sobre as lâminas e TMA, muito obrigada pelo tempo dispendido no estudo, pelo carinho e amizade de vocês!

Aos colegas do Hospital Pérola Byington, Francisco Miranda, Márcia C. Felician, Margarida Carvalho, Djackson X. Dantas, assim como Cynthia A. Castro, Fernanda M. Carbinatto, Cássia M. Angelo, Luana M. Araújo e Vera L. Gregório: “A amizade não se busca, não se sonha, não se deseja, ela exerce-se.” Muito obrigada a cada um de vocês por todo apoio.

Agradeço aos alunos que me acompanham no ambulatório, Rubens E. Paiva, Giovanna M.C. Serrano, Alessandra C. Pacífico e aos residentes do Hospital Pérola Byington, pela busca constante de conhecimento e pelo respeito à paciente doente: “Comprimidos aliviam a dor, mas só o amor alivia o sofrimento”.

À toda equipe técnica, Diretoria e Enfermagem do Hospital Pérola Byington pelo apoio e respeito com a dinâmica da pesquisa clínica.

Meu eterno agradecimento à Marisa, Edna, Silvana e Rosângela, equipe que me auxilia de forma incansável na pesquisa clínica, muito obrigada pelo carinho.

À UNINOVE, especialmente à Coordenação da Medicina, por permitir que eu pudesse cursar a pós-graduação nessa importante instituição e por me inserir no mundo acadêmico.

Gostaria de agradecer especialmente à Prof.^a. Dra. Fernanda M. Consolim Colombo, por ter aceitado meu ingresso na pós-graduação da Medicina-UNINOVE. Foi um momento de transição bastante difícil, e mesmo sem conhecer o trabalho, teve a generosidade e compreensão de acreditar que o estudo seria possível, minha sincera gratidão e respeito.

*“É dito que conhecimento é luz
e força.*

Onde há luz é possível discernir entre o certo ou errado, escuro ou luminoso, inútil ou poderoso. Aqueles que entendem o que está errado, não se deixam influenciar por ações e pensamentos negativos. Aqueles que possuem conhecimento são sensíveis em relação aos atos e sentimentos dos outros. Pessoas assim têm o poder de transformar o errado em certo.”

Albert Einstein

RESUMO

O Líquen Escleroso Vulvar (LEV) é uma dermatose crônica inflamatória, não neoplásica, não infecciosa, de etiologia pouco conhecida, podendo ocasionar excessivo prurido e estenose genital. Tal fato pode limitar a vida sexual e social, devido à intensa dor e trauma locais. O tratamento padrão desta doença é o uso de corticosteróide ultra potente tópico, com intuito de restringir os sintomas, além de espaçar a reativação do LEV. A literatura demonstra que terapia fotodinâmica (PDT) e terapia de fotobiomodulação (TPBM) promovem respostas moduladoras no sítio da aplicação nas dermatoses crônicas. O objetivo consistiu em estudar e comparar os efeitos da PDT, TPBM e Corticosteróide tópico no LEV, através do contexto histológico e da imuno-histoquímica, além do impacto dos tratamentos sobre o prurido vulvar, principal sintoma clínico. Estudo prospectivo, randomizado, controlado foi realizado em 36 pacientes com LEV (histopatológico), no setor de Ginecologia-Laserterapia do Hospital Pérola Byington. Foram alocadas em 3 grupos (12 mulheres em cada): Corticosteróide tópico (GC), PDT(GPDT) e TPBM (GTPBM). Histologicamente, as lâminas foram classificadas (Robboy), no pré e pós tratamentos. A análise imuno-histoquímica ocorreu por meio dos marcadores P53,

Ki67, Citoqueratinas 10 e 14, Laminina, CD34 e Mastócitos, além dos marcadores da morfologia epitelial. Análises estatísticas foram conduzidas para comparação entre grupos, com $p < 0,05$ estatisticamente significativa. A histologia pós tratamento, em todos grupos, alterou de

L2 para L1. A degeneração hidrópica, hiperqueratose e hialinização do colágeno mostraram redução pós tratamentos. Todas terapias reduziram o processo inflamatório, GC em 58%, GPDT em 30% e GTPBM em 66,7%. Os mastócitos diminuíram em todos os grupos ($p = 0,405$). P53 e Ki 67 sofreram alterações pós tratamentos, $p = 0,405$ e $p = 0,841$, respectivamente. CK10 e

CK14 mostraram alterações ao término dos tratamentos com $p = 0,638$ e $p = 0,838$, respectivamente. Laminina aumentou pós tratamentos ($p = 0,251$). O CD34 mostrou alteração pós tratamentos ($p = 0,405$). O prurido reduziu em todos os grupos estudados, de forma similar, $p = 0,926$. As recorrências variaram pós tratamentos, em 60% GC, 36,3% GPDT e 63,6% GTPBM. Neste estudo, o prurido vulvar e o fototipo IV, de acordo com Fitzpatrick, foram sinalizadores importante de recorrências. As terapias fotônicas são promissoras no tratamento do LEV, sobretudo, se comparadas ao tratamento padrão (corticoide), que pode ocasionar efeitos adversos. Não obstante, novos estudos multicêntricos e com maior casuística, ainda se fazem necessários para se estabelecer os melhores protocolos na aplicação de terapias fotônicas.

Palavras-chave: Líquen escleroso vulvar. Terapia Fotodinâmica. Laser de Baixa Intensidade. Terapia de Fotobiomodulação. Propionato de Clobetasol.

ABSTRACT

Vulvar Lichen Sclerosus (VLS) is a non-neoplastic, non-infectious, chronic inflammatory dermatosis by unknown etiology that causes intense pruritus and genital stenosis. VLS can hinder the evacuation and urination, limiting the sexual life by pain and local trauma. At present, the gold standard treatment is the topical ultra-potent steroids to decrease clinical symptoms, even though they may cause several side effects. The literature indicates to chronic dermatosis that Photodynamic therapy (PDT) and Photobiomodulation Therapy (PBMT) are efficient treatments, which promote an effective anti-inflammatory and immunomodulatory effects, such as VLS. The aim of this study was to evaluate and compare PDT, PBMT and topical Corticosteroid (CG) responses in VLS by clinical (pruritus), histological and immunohistochemical responses. A prospective, randomized, controlled clinical study in VLS diagnosed by 36 patients at the Pérola Byington Hospital was performed. Twelve women, into 3 groups, were allocated: Steroid, PBMT and PDT Groups. Histological slides, according to Robboy's classification, pre and post treatment were studied. Immunohistochemical analysis by P53, Ki67, Cytokeratins 10 and 14, CD 34 and Laminin markers, as well as Mast cells (anti-inflammatory response) were verified. Statistical analyzes among groups evaluation by significant statistically ($p < 0,05$) were presented. Histological pattern changed from L2 to L1 in all treatments. Hydropic degeneration, hyperkeratosis and collagen hyalinization exhibited diminution post treatments. All therapies reduced the inflammatory process, CG in 58%, PDTG in 30% and TPBMG in 66.7%. Mast cells indicated reduction in all groups ($p = 0.405$). P53 and Ki 67 underwent changes after treatments, $p = 0.405$ and $p = 0.841$, respectively. CK10 and CK14 increased with $p = 0.638$ and $p = 0.838$, respectively. Laminin increased post treatments ($p = 0.251$). CD34 showed post-treatment change ($p = 0.405$). Pruritus reduced in all groups studied. Recurrences varied according to groups: CG recurred in 60%, PDTG in 36.3% and TPBMG in 63.6%. The photonic therapy seems to be a significant management while compared to steroid therapy as result of its side-effect, when applied for long periods. In this study, the vulvar pruritus and the skin phototype (Fitzpatrick) signalized their significant recurrence. Photonic therapies are promising, even though some multicentric studies should be carry out, by a larger casuistic for establishing reliable protocols.

Keywords: Vulvar lichen sclerosus. Photodynamic Therapy. Photobiomodulation Therapy. Low Level Laser Therapy. Clobetasol Propionate.

SUMÁRIO

1. Introdução	17
1.1. Etiopatogenia	18
1.2. Manifestações clínicas	19
1.3. Diagnóstico	20
1.3.1. Aspectos histológicos da lesão	20
1.3.2. Marcadores morfologia epitelial	21
1.3.3. Marcadores de proliferação celular	24
1.3.4. Marcadores de estratificação epitelial	26
1.4. Tratamentos do LEV	28
1.4.1. Corticosteroides	28
1.4.2. Terapia fotodinâmica (PDT)	31
1.4.3. Fotossensibilizadores	33
1.4.4. Fotobiomodulação (TPBM)	34
2. Justificativa	36
3. Objetivos	38
3.1. Objetivo geral	38
3.2. Objetivo específico	38
4. Método	39
4.1. Critérios de inclusão	39
4.2. Critérios de exclusão	39
4.3. Alocação dos grupos estudados e parâmetros de tratamento	40
4.4. Variáveis estudadas	43
4.5. Análise estatística	48
5. Resultados	50
5.1. Idade	50
5.2. Doenças associadas	51
5.3. Fototipo de pele	52
5.4. Prurido	53
5.5. Histologia	55

5.6.	Análise da morfologia epitelial	57
5.7.	Análise do infiltrado inflamatório	62
5.8.	Análise da estratificação epitelial	67
5.9.	Análise de proliferação celular	73
6	Recorrências	76
7	Avaliação de biomarcadores	83
8	Correlação biomarcadores pós tratamentos	89
9	Discussão	96
10	Considerações finais	105
11	Conclusões	108
12	Referências bibliográficas	110
13	Apêndice	118

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Apresentação dos sachês de propionato de clobetasol 0,05%	41
Figura 2: Demonstração dos pontos de aplicação das terapias fotônicas	42
Figura 3: Escala analógica visual	44
Figura 4: TMA.	46
Figura 5: Aspecto histológico pré e pós tratamento.	56
Figura 6: Aspecto histológico do LEV.	57
Figura 7: Histologia pós tratamento.	58
Figura 8: Mastócitos em degranulação.	63
Figura 9: Avaliação CD34 pré e pós tratamento.	65
Figura 10: CK 10 pré e pós tratamentos	67
Figura 11: CK 14 pré e pós tratamentos	69
Figura 12: Laminina pré e pós tratamentos.	71
Figura 13: Representação da expressão da P53	73
Figura 14: Representação da expressão do KI 67	75
Figura 15: Expressão da laminina pós tratamentos	81
Figura 16: Correlação laminina e recorrência	82
Figura 17: KI 67 pré e pós tratamentos, amostras pareadas.	85
Figura 18: Marcação de laminina pré e pós tratamentos	88
Figura 19: Correlação laminina e CK10.	89
Figura 20: Correlação P53-KI67-CD34.	90
Figura 21: Correlação CD34 e intensidade de prurido.	91

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1:	Alocação dos grupos estudados e parâmetros dosimétricos.	40
Tabela 2:	Intensidade do prurido.	54
Tabela 3:	Análise da média do CD34 pré e pós tratamento.	66
Tabela 4:	Expressão da CK10 pré e pós tratamentos.	68
Tabela 5:	Imunomarcção da CK14.	70
Tabela 6:	Imunomarcção da laminina.	72
Tabela 8:	Recorrências pós tratamentos.	77
Tabela 10:	Correlação entre recorrência, fototipo pele e prurido.	79
Tabela 11:	Recorrência e laminina	80
Tabela 12 :	Análise de biomarcadores mastócitos.	84
Tabela 13:	Análise histológica pré e pós tratamentos	86
Tabela 14:	Intensidade do prurido.	87
Tabela 15:	Correlação entre KI67 e CD34.	92
Tabela 16:	Correlação entre P53 e CK14	93
Tabela 17:	Recorrência e mastócitos.	94
Tabela 18:	Correlação entre mastócitos e CD34.	95
Gráfico 1:	Idade das pacientes	50
Gráfico 2:	Doenças de associação.	51
Gráfico 3:	Representação de fototipo de pele.	52
Gráfico 4:	Tempo de prurido.	53
Gráfico 5 :	Histologia pré e pós tratamentos.	55
Gráfico 6:	Representação de degeneração hidrópica.	57
Gráfico 7:	Representação da hiperqueratose.	60
Gráfico 8:	Representação da hialinização de colágeno.	61
Gráfico 9:	Representação do infiltrado inflamatório.	62
Gráfico10:	Imunomarcção de mastócitos.	64
Gráfico11:	Imunomarcção da P53	74
Gráfico12:	Imunomarcção do KI67	76
Gráfico13:	Correlação entre recorrência e prurido	78
Gráfico14:	Correlação entre KI67, e CD34 pós PDT.	92

Gráfico15:	Correlação entre P53 e CK14.	93
Gráfico16:	Correlação entre recorrência e mastócitos.	94
Gráfico17:	Avaliação entre recorrência e mastócitos.	95

LISTA DE ABREVIATURAS

5ALA:	5 ácido aminolevulínico.
AM:	Azul de Metileno.
BIC/miR-155	Micro RNA155
CD44	Receptor de ácido hialurônico
CD4/CD8	Linfócitos supressores ou citotóxicos
CD68	Marcador de macrófagos
CD34	Marcador de angiogênese
CEC	Carcinoma Espinocelular
CQ/CK 10 e 14	Citoqueratinas
COX2	Enzima ciclooxigenase 2
COL 1A 2	Gene codificador de colágeno I
ECM1:	Proteína da matriz celular.
EROs	Espécies reativas de O ₂
EVA	Escala visual analógica
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo (aceptor de H ₂)
FDA:	Food Drugs Administration.
FTU:	Finger tip unit (unidade de ponta de dedo).
GC:	Grupo corticosteroide.
PDT	Terapia Fotodinâmica
TPBM	Fotobiomodulação
GC-SF:	Fator estimulador de crescimento granulocítico.
HLA:	Antígeno leucocitário humano.
HSP70 e 90	Proteínas do choque térmico
IDH:	Enzima izocitrato desidrogenase (converte NAD em NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo.
IgG:	Imunoglobulina G.
IL 1, 2, 6,10	Interleucinas 1, 2, 6, 10
ISSVD:	Sociedade Internacional de Estudos de Doenças de Vulva e Vagina

K5-K14:	Genes da queratina, marcadores de queratina basal.
K6-K16	Genes marcadores de queratina ativados.
LEV:	Líquen escleroso vulvar.
LP:	Líquen plano
L1	Líquen inicial
L2	Líquen estabelecido/old
LBI	Laser de potência baixa
MMP	Metaloproteinase
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
PgG2:	Prostaglandina G2 (ação vasodilatadora sistêmica).
PgH 2:	Prostaglandina H2
PgI 2:	Inibidora da agregação plaquetária.
TFD:	Terapia fotodinâmica.
Th1:	Linfócito T helper.
TLBI:	Terapia laser em baixa intensidade.
TNF α :	Fator de necrose tumoral.
TPBM:	Terapia de Fotobiomodulação

1-INTRODUÇÃO

O Líquen Escleroso Vulvar (LEV) foi descrito por Hallopeau em 1887, como uma variante do Líquen Plano (LP). Só em 1889, Darier descreveu, histologicamente, o termo escleroso, ao quadro clínico de uma liquenificação e aspecto esbranquiçado de pele vulvar, que fora descrito, anteriormente, por Hallopeau. Baseado na classificação clínica e histopatológica, o LEV e LP tornaram-se condições distintas, apesar de uma possibilidade da coexistência entre ambas (PEREZ-LOPEZ,2013).

O LEV é a causa mais comum de doença crônica vulvar. Wallace et al., em 1971, estimou a prevalência entre 0,1 a 0,3% das pacientes referidas à Dermatologia, enquanto Goldstein et al, relataram uma frequência do LEV ao redor de 1 a cada 60 mulheres, na prática ginecológica geral. Bleeker et al., relataram incidência do LEV em 14,6 por 100.000 mulheres/ano, enquanto Tasker and Wojnarowska descreveram prevalência de 0,1% em mulheres na pré menarca (MURPHY,2010; BLEEKER *et al*,2016; TASKER *et al*,2003). A forma genital é mais frequente em mulheres acima de 50 anos (10:1), sendo que a região anogenital é comprometida em 85% das vezes enquanto a extragenital em 11% a 20% (MURPHY,2010; BLEEKER *et al*,2016). Esta doença pode acometer crianças (1:900) e o seguimento de longo prazo se faz necessário, portanto, tem uma apresentação bimodal quanto a faixa etária: pré púberes (1:900) e pós menopausadas, sendo mais frequente em mulheres caucasianas pós menopausadas (GOMES,2005).

A doença é classificada, de acordo com a *International Society for the Study of Vulvovaginal Disease* (ISSVD), como dermatose crônica inflamatória, não neoplásica, não infecciosa, de provável origem autoimune que afeta, principalmente, a pele genital, causando prurido intenso, erosão, ulceração, aspecto esbranquiçado da região vulvar, atrofia e estenose, resultando em mudanças do aspecto anatômico, além de dispareunia (dor às relações sexuais), dificuldade miccional e às evacuações, e conseqüentemente, a disfunção sexual (GOMES,2005; LYNCH,2012).

O potencial de malignização é ao redor de 2% a 5%, sendo possível observar incidência entre 32% a 76% de carcinoma escamoso de vulva adjacente à área de líquen (MONSALVEZ,2010). Em estudo de Raspollini et al, houve associação positiva entre angiogênese e COX2 no LEV, evoluindo para Carcinoma Escamoso de Vulva (RASPOLLINI,2007).

1.1. ETIOPATOGENIA

O LEV apresenta etiopatogenia idiopática, todavia algumas teorias são descritas na literatura, como a saber:

- Genética-Familiar: cerca de 12% do líquen pode ter origem genético-familiar (TASKER,2003; KREUTER *et al* , 2012). Há presença no LEV, de antígenos leucocitários humanos (HLA) DQ 7, DQ8 e DQ 9. Em recente estudo foi demonstrado pela primeira vez que o líquen escleroso vulvar está associado a 5-hidroximetilação e expressão alterada de enzimas IDH, fornecendo evidência para um fator epigenético na patogênese (TERLOU,2012; OYAMA *et al*,2003; GAMBICHLER *et al*,2011).

- Alterações Hormonais: No LEV pode se observar dois picos de incidência associados ao hipoestrogenismo, ocorrendo na pré-púbere e na menopausa tal fato permite-nos considerar a influência hormonal nesta doença. Há relatos de diminuição dos níveis de diidrotestosterona e androstenediona, que poderia levar a um início precoce do LEV, além da redução da atividade da enzima 5 α redutase, que explicaria o insucesso do tratamento com testosterona tópica (KREUTER *et al* , 2012).

- Fatores Autoimunes: Também têm sido aceitos devido à alta associação com doenças autoimunes ,sendo as mais frequentes a tireoidite em 21%, alopecia areata em 9%, vitiligo em 6% e anemia perniciosa (2%), além da presença de anticorpos altamente específicos, que apontam para a proteína da matriz extracelular (ECM 1) (GAMBICHLER *et al*, 2011;FARREL,2006;FISTAROL,2013). O ECM 1 atua na regulação da membrana basal e organização das fibras colágenas, a diminuição da sua expressão, como também do CD 44, que é uma glicoproteína de matriz celular, sendo, assim, responsável pela interação célula-célula, adesão e migração que podem estar associados à gênese dessa patologia .

Há estudo reportando um fenótipo autoimune, caracterizado pelo aumento dos níveis de citocinas específicas do Th1, um denso infiltrado de células T e incrementada a expressão de BIC/miR-155, associado à vasculite linfocitária,caracterizando estresse oxidativo (OYAMA *et al*,2003; GAMBICHLER *et al*,2011).

- Infeciosa e Fatores Locais: *Borrelia* foi observada em pacientes com LEV, trauma e fricção têm sido considerados, não obstante, ainda sem comprovação (FISTAROL,2013).

1.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA

No LEV o principal sintoma clínico é o intenso prurido em 90% dos casos, porém em 7% das crianças e 1% dos adultos isso não é observado. Outras condições, tais como, dor, distúrbios miccionais e dispareunia são também descritos.

1.2.1 SINAIS E SINTOMAS

As lesões típicas são pápulas branco-nacaradas, que podem agrupar-se, conferindo um aspecto “*cellophane like*” da pele, além do aspecto esbranquiçado, afinamento e característica distribuição em “figura-de-oito” (anogenital) são também encontradas. Erosões, fissuras, púrpuras e equimoses podem ocorrer, assim como distorção do aspecto anatômico vulvar em virtude da fusão de pequenos lábios, atrofia e estenose genital (MURPHY,2010; TASKER,2003). O LEV pode, ainda, se manifestar em áreas extragenitais, como no dorso, tórax, pescoço e face (FISTAROL,2013).

Em estudo prévio realizado em 2015, por Belotto et al., quanto à resposta clínica do LEV ao tratamento com corticosteroide tópico e terapias fotônicas em 28 mulheres, foi possível observar que as doenças de associação mais frequentes com a dermatose vulvar foram Diabetes, Hipertensão arterial e Hipotireoidismo. Na avaliação do prurido vulvar houve a diminuição da intensidade em todos os grupos estudados, sendo, respectivamente, em 83,75% no Corticoide, 60% na PDT e 50% na TPBM. Quanto à recorrência, pode-se averiguar 3 pacientes em cada grupo, sendo que na PDT ocorreu em 1 mês pós tratamento, no Corticoide em 2 meses, e na TPBM em 4 meses, encorajando, assim, esta pesquisa pioneira na linha da Terapia de Fotobiomodulação, como alternativa ao corticoide (BELOTTO,2015).

1.3. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico é clínico, os estágios iniciais da doença podem gerar dúvidas, sendo os principais diagnósticos diferenciais a psoríase, líquen plano, líquen simples crônico, vitiligo e penfigoide mucomembranoso benigno. A biópsia é recomendada nos casos não responsivos ao tratamento com corticosteroide ultra-potente tópico, no caso de líquen ulcerado ou ainda em suspeita de lesão invasora (GAMBICHLER,2014).

1.3.1. HISTOPATOLÓGICO

Os achados histológicos característicos de LEV incluem epiderme atrófica, normal ou até hipertrófica com graus variados de hiperqueratose, com tamponamento folicular, degeneração hidrópica da camada basal, melanócitos diminuídos, hialinização da derme papilar. Esta é constituída por edema, homogeneização das fibras colágenas e desaparecimento das elásticas, ademais com a presença de banda de infiltrado inflamatório (linfocítico), logo abaixo da derme papilar (MONSALVEZ,2010). O início e a persistência do LEV estão associados a presença do processo inflamatório crônico, formado por linfócitos T, que possuem uma potencial ação citotóxica (grânulos citotóxicos) e se encontram muito próximas da área de degeneração hidrópica da camada basal. A literatura específica descreve que, o infiltrado inflamatório tem a presença de CD4, CD8 e CD 68 (macrófago)(TERLOU,2012).

Segundo Robboy há relação estreita do aspecto histológico com o momento clínico da doença, sendo reconhecidas três fases em tecidos biopsiados, a saber (ROBBOY,2009).

- **Lesão Inicial de Líquen Escleroso (*Early lesion*):** apresenta estrato córneo com ortoqueratose compacta, afinamento da epiderme com alteração vacuolar da junção dermoepidermal, infiltrado linfocítico focal perivascular e liquenóide irregular e discreto na junção dermoepidermal, edema dermopapilar com variável extensão, conferindo uma cor pálida ao colágeno dermo papilar e as fibras elásticas estão empurradas para baixo.

- **Lesão de Líquen Escleroso Estabelecido (*Established lesion*):** neste se encontra o estrato córneo com ortoqueratose compacta, epiderme fina, que pode alternar com hiperplasia (transformação maligna tem sido reportada nessas áreas). A junção dermoepidérmica revela alteração vacuolar com linfócitos sobrepostos, já a membrana basal pode estar fragmentada, evidenciando aglomerados na derme subjacente, em óstios ampliados de glândulas écrinas e folículos pilosos. Não obstante, na derme papilar e a porção superior da reticular, exibem profundos feixes de colágeno homogêneo, espesso e esclerótico. As fibras elásticas estão destruídas na porção superior da derme. Vasos dilatados dentro da área de esclerose, correspondendo a telangiectasias, são vistos clinicamente, assim como a presença de

macrófagos carregados de melanina. Infiltrado linfocítico moderadamente denso perivascular é visualizado, misturado com células plasmáticas e histiócitos, envolvendo o plexo vascular superficial com vasos, sendo estes empurrados para baixo pela esclerose, deslocando a inflamação para dentro da derme profunda.

- **Lesão Tardia de Líquen Escleroso (*Old lesion*):** essas lesões mostram alterações escleróticas bem estabelecidas, ou seja, epiderme fina e ausência de anexos, além disso, o componente inflamatório ativo é quase sempre ausente.

Em nosso estudo utilizamos a classificação de Robboy, e denominamos como **L1** a Lesão Inicial de Líquen Escleroso (*Early lesion*) e para **L2** foram incluídas as de Líquen Escleroso Estabelecido (*Established lesion*) e a Tardia de Líquen Escleroso (*Old lesion*): os danos observados no tecido biológico desencadeiam uma série de mecanismos, segundo Virshov, que são expressos como fases do processo inflamatório traduzidos, como rubor, tumor, calor e dor. Dessa forma, são levados ao local afetado, neutrófilos, monócitos, queratinócitos e fibroblastos, envolvidos na cicatrização e reepitelização (BALBINO,2005; ROBBINS&COTRAN, 2010).

Segundo Clark (1993), o reparo tecidual possui 3 fases: inflamação, formação de tecido de granulação e maturação ou remodelação, bem como a evolução dessas etapas contam com o envolvimento celular, tissular e metabólico. Para a eficácia de uma intervenção deve-se conhecer o evento desencadeante da inflamação e atuar, especificamente, na fase envolvida, assim como nos processos inflamatórios crônicos, os critérios são mais complexos (BALBINO,2005).

No LEV, doença autoimune, o uso de corticosteroides tópicos é indicado para o controle da inflamação, mas não favorece outras fases do processo de reparação tecidual (ROBBINS&COTRAN, 2010).

1.3.2. MARCADORES BIOLÓGICOS DESCRITOS EM DERMATOSSES:

I. Marcadores da Morfologia Epitelial: hialinização do colágeno, degeneração hidrópica e hiperqueratose:

A pele tem fundamental importância na proteção contra microrganismos e desidratação, além de estar envolvida com a resposta imune, cicatricial e sensorial. Para que haja equilíbrio desse sistema, o trofismo deve estar mantido com níveis adequados de carboidratos, sais minerais, e produção adequada da principal proteína que mantém arcabouço

extracelular do tecido conjuntivo, o colágeno. Atualmente, são conhecidos 27 tipos diferentes de colágeno, que são compostos por três cadeias protéicas, formando um trímero, no qual a glicina é o principal componente, ocupando a terceira posição (Gly-X-Y, onde X e Y podem ser outros aminoácidos, exceto cisteína ou triptofano) e contém aminoácidos especializados 4-hidroxiprolina e hidroxilisina. (ROBBINS&COTRAN, 2010).

O colágeno corresponde a mais de 30% das proteínas totais do organismo e uma de suas funções importante é unir e fortalecer os diferentes tecidos. O pró colágeno é secretado da célula e clivado por proteases, formando a unidade básica das fibrilas, cuja formação está associada à oxidação dos resíduos de lisina e hidroxilisina por ação da lisil-oxidase. Essa hidroxilação é vitamina C-dependente, por essa razão há cicatrização deficiente das feridas no escorbuto (GODOY *et al*,2015; ALMEIDA *et al*, 2014). A manutenção das propriedades fisiológicas da vulva depende da organização dos colágenos tipo I, III e V, que interagem com a proteína da matriz celular. No líquen escleroso há um decréscimo das fibras elásticas e proteína da matriz celular (ECM 1) na zona de hialinização.

Godoy e colegas avaliaram por imuno-histoquímica a distribuição anormal do colágeno na zona de hialinização do LEV, estes observaram que alteração anômala poderia funcionar como, um fator desencadeante da patogênese do LEV (GODOY *et al*,2015). No estudo de Almeida Jr. *et al* foi observado a agregação de complexos imunes e/ou proteínas de matriz alteradas, estando ao longo das fibras colágenas (ALMEIDA *et al*, 2014).

Na morfologia epitelial relacionada ao LEV, além da hialinização do colágeno, a degeneração hidrópica e a hiperqueratose foram considerados para observar o impacto dos tratamentos.

A **degeneração hidrópica** é um processo reversível que ocorre na camada basal, devido ao processo inflamatório crônico, resultando na alteração da bomba de Na^+/K^+ da célula. A alteração da regulação hidroeletrólítica gera a retenção intracelular de Na^+ e extracelular de K^+ que facilitará a entrada rápida de água na célula, causando o edema celular (ROBBOY,2009).

A **hiperqueratose** ocorre devido ao intenso processo inflamatório, que irá causar espessamento do estrato córneo da epiderme. Em revisão sistemática e meta-análise de ensaios clínicos randomizados envolvendo 249 participantes, Chi *et al.*, evidenciaram que a utilização de propionato de clobetasol 0,05% e furoato de mometasona 0,05%, foram eficazes para tratar LEV, propiciando redução da inflamação e da hiperqueratose (CHI *et al*,2012). Cattaneo *et al.*, em estudo com 20 mulheres tratadas com propionato de clobetasol 0,05%, em esquema prolongado (24 meses de tratamento), obtiveram resposta na hiperqueratose, inflamação, edema, atrofia epitelial, concluindo que corticoide ultra potente é altamente eficaz para tratar

LEV (CATTANEO et al, 1992). Em revisão de literatura, Pérez-Lopéz e Vieira- Baptista, relataram que o corticoide ultra potente é o tratamento padrão para tratar o LEV, com redução da inflamação, hiperqueratose e degeneração hidrópica. Fistarol e Itin, em revisão de literatura, relataram que o uso de corticosteroide ultra potente, melhorou o sintoma clínico da doença em 70% e em 1/5 das mulheres houve remissão completa das alterações epiteliais, com redução da hiperqueratose, liquenificação, infiltrado inflamatório, hialinização do colágeno, atrofia (PÉREZ-LOPES, 2017; CATTANEO et al, 1992).

As terapias fotônicas apresentam poucos descritores em literatura sobre mudanças histológicas em LEV, entretanto, Olejek et al., descreveram 62% de melhora pós PDT-ALA em LEV, com aumento de CD44, molécula de adesão receptora de ácido hialurônico e ligand de osteopontina, colágeno e metaloproteinases (OLEJEK et al,2010). Kim et al., relataram que a PDT, além dos efeitos fototóxicos celulares, estimulava resposta imune celular, mediadores inflamatórios e fibroblastos (KIM,2015). A TPBM, contudo, promove incremento do pró colágeno, do fator de crescimento de fibroblastos, inibe a apoptose, melhora a perfusão da pele, estimula a IL-1 β , TNF- α , ICAM-1 (AVCI *et al*, 2013; FIORIO *et al*, 2017).

II. Infiltrado Inflamatório, Mastócitos e CD34:

O **infiltrado inflamatório** do LEV, é composto por células mononucleares em região supra epitelial. Cattaneo et al., relatam em estudo com 40 mulheres com LEV, que o infiltrado linfoide dérmico é reduzido após uso de propionato de clobetasol (CATTANEO et al, 1992). Conforme descrito acima, inúmeros são os relatos em literatura sobre a ação antiinflamatória do corticoide e terapias fotônicas na redução do processo inflamatório.

Os **Mastócitos** são originados da célula pluri potencial (CD34) da medula óssea, estas células estão no tecido conjuntivo, contém no seu interior, histamina e heparina. Esta através da corrente sanguínea migra para um tecido específico, onde sofre sua maturação plena, adquirindo grande quantidade de grânulos no seu interior, assumindo sua morfologia definitiva. Quando ocorre distúrbio na homeostase, os mastócitos liberam mediadores solúveis da imunidade inata, tais como: citocinas, quimiocinas, proteases de remodelação da matriz, espécies reativas de O^2 e histamina, que induzem a infiltração de células imunes (macrófagos, células T) para que ocorra o reparo tecidual. A degranulação dos mastócitos estimula a proliferação tissular, induzindo a propagação de queratinócitos, que liberam citocinas inflamatórias e fatores de crescimento. Outros mediadores pré-formados e expressos pelos mastócitos são: serotoninas, histamina, proteoglicanos, proteases e fator de crescimento de

fibroblastos, que irão produzir processo inflamatório, vasodilatação, recrutamento e adesão celular, fibrose e angiogênese (NIEUWENHOF *et al*, 2010; MALUF,2009). Em dermatite atópica, a IL-8 é o principal mediador da resposta imune inata, cuja ação é facilitar a migração de neutrófilos, além de aumentar a expressão das moléculas de adesão por células endoteliais e com isso, incrementar o metabolismo oxidativo. As altas concentrações dessa citocina pode explicar a paraceratose e hiperqueratose, que ocorre na psoríase, que é uma dermatose similar ao LEV. Em cerca de 80% dos pacientes com mastocitose, somente a pele é envolvida, além de que a doença mais comum se refere à Urticária Pigmentosa (MALUF,2009). O aumento de mastócitos é encontrado no infiltrado inflamatório do Líquen, Penfigoide, Líquen Plano, ajudando a diferenciar essas patologias. Os mastócitos, entretanto, também podem ser vistos na periferia de lesões pré-malignas, como na neoplasia intraepitelial de vulva diferenciada (dNIV). (NIEUWENHOF *et al*, 2010).

O **CD34**, é uma glicoproteína presente na superfície de células progenitoras hematopoiéticas, fibroblastos, tecido nervoso, células endoteliais e está relacionada à adesividade celular, sendo desta forma um potencial indicador de diferenciação vascular.

A presença das células dérmicas CD34 positivas na pele humana sugere que esta tem um papel na fisiologia, podendo denotar um mecanismo regulador na fibrose cutânea e na síntese de colágeno, assim como sua perda resultaria na deficiência do controle da colagenogênese na derme. Há estudos associando a perda do CD34 na Esclerodermia, Esclerose Sistêmica e Morfeia, já no Líquen Plano e Cutâneo está relacionado à angiogênese (VAN DER AVOORT *et al*, 2010).

III. Marcadores de Proliferação Celular: P53 e Ki 67

A proteína **P53** é responsável pelo reparo do DNA, apoptose e diferenciação celular, além da angiogênese. Essa proteína regula o ciclo celular em dois pontos: Fase G1 (ponto de restrição ou partida) e na transição da Fase G2 para a mitose.

Em situações de homeostase celular, essa proteína é mantida em níveis basais (ação da proteína MDM2), com ação regulatória. Entretanto, quando há sinais de desequilíbrio celular, a P53, que é uma proteína citoplasmática, irá sofrer translocação para o núcleo da célula e transcrição (formação de uma molécula de RNA, por ação da enzima RNA polimerase). Em consequência, irá atuar na regulação do ciclo celular, apoptose, autofagia e reparo de DNA (GAMBICHLER,2014; SOUZA,2015; ABRANTES *et al*,2018). Então, a P53 expressa no citoplasma terá a função de reparo de DNA mitocondrial e apoptose, enquanto expressa no

núcleo da célula, irá promover regulação do ciclo celular, reparo de DNA, apoptose e autofagia. Está, ainda, envolvida, tanto na supressão da inflamação quanto no câncer, contudo, as mutações dessa proteína podem contribuir com a carcinogênese, devido à inativação das suas funções nuclear e citoplasmática (CARLSON *et al*,2013). Essa mutação no gene de supressão tumoral, é expresso em 50% de todos os tumores humanos.

No LEV a mutação da P53, encontra-se elevada assim como no carcinoma escamoso de vulva, tornando-se, por essa razão, um fator prognóstico para esse tipo de tumor maligno. Hantschmann et al., avaliaram as alterações dessa proteína sobre a carcinogênese vulvar, examinando sua expressão no Carcinoma Escamoso de Vulva, na Neoplasia Intraepitelial de Vulva, no Líquen Escleroso e na Hiperplasia de Células Escamosas (HANTSCHMANN *et al*,2005). Os autores encontraram P53 positiva em 40% no líquen e na hiperplasia de células da escamosa, 77% na neoplasia intraepitelial de vulva e em 90% dos casos de carcinoma escamoso de vulva (CEC), tal fato sugere maior risco de desenvolvimento de câncer de vulva, quando a proteína está presente. Em estudo de Carlson et al., sobre os marcadores de malignidade em LEV, os autores consideraram que a inativação da P53, estaria associada à carcinogênese, já que observaram o incremento da expressão dessa proteína nesta dermatose, assim como em Carcinoma Escamoso de Vulva. Ademais, observaram que o LEV de longa data, mostrou um aumento na expressão da P53, em comparação com aquelas com a doença de curta duração, potencializando o risco de progressão em mulheres com LEV antigo (GAMBICHLER *et al*,2011; CARLSON *et al*,2013). Afirmam, também, que a super-expressão da proteína P53, associada às mutações e aneuploidias, seriam o fomento necessário para a progressão do LEV para o CEC de Vulva. Os autores concluíram que essa progressão é o exemplo de carcinogênese, que provam do dano celular derivado de radicais livres, produzidos pelo processo inflamatório crônico. Abrantes et al., sugeriram que a P53 pode fazer a supressão tanto de processos inflamatórios quanto o câncer e, isso se relaciona a mecanismos de atuação da P53, quando no citoplasma ou núcleo celular (ABRANTES *et al*,2018).

Hoang et al., observaram 83% de positividade na imunomarcagem na P53 em Neoplasia Intraepitelial Vulvar diferenciada (NIVd), evidenciando, deste modo uma expressão mais significativa nas camadas basal e suprabasal do epitélio. A possibilidade do aumento da P53 no LEV é de 5% a 61%, promovido por provável estresse oxidativo. A progressão da NIVd para o CEC de vulva é de 32,8% em 22,8 meses. Há dois padrões aberrantes de imunocoloração da P53: forte e difusa ou missense, se refere a mutação missense, onde ocorrerá a formação de aminoácidos diferentes do original, a partir do DNA, com isso a geração de uma proteína de função alterada. O outro padrão de imunocoloração seria o nulo ou negativo, ou nosense,

referindo-se à mutação nosense, onde a proteína formada não é funcional (HOANG *et al*,2016). Pinto *et al.*, demonstraram em seu estudo, que a elevação da P53 foi detectada, em apenas poucos casos de dNIV, com imunomarcção missense negativas, além de ausência de coloração associada a deleções (perda total ou parcial de um segmento do cromossomo ou ainda perda de sequências nucleotídicas pelo genoma) do gene P53(PINTO *et al*, 2013). O que eles observaram foi a presença de uma marcação fraca, em camada basal, associada a lesões de Líquen Simples Crônico e em Líquen Escleroso na ausência de atípias basais e não associadas ao carcinoma. Nessas enfermidades, o incremento da expressão da P53, foi associada à uma resposta ao estresse oxidativo/isquêmico e não a um processo mitogênico.

O **Ki 67** é um anticorpo monoclonal murino IgG classe 1, presente no nucléolo das células proliferativas, bem como na cromatina condensada das células mitóticas. Alguns estudos relacionam o aumento do Ki 67 em líquen escleroso em comparação à pele normal (OLEJEK *et al*,2010). O anticorpo monoclonal Ki 67 reconhece um antígeno do núcleo, que é expresso exclusivamente em células, que se encontram em proliferação celular. Assim, esse anticorpo tem sido largamente usado, como marcador de proliferação celular. É expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0 (CARLSON *et al*,2013). O Ki 67 pode ser empregado para avaliar as frações de crescimento dos tecidos normais reacionais e neoplásicos, sendo utilizado para identificar fatores preditivos de neoplasia maligna, calcular a cinética celular, ademais podendo estimar a eficácia de novos medicamentos oncológicos.

IV- Marcadores Relacionados à Estratificação Epitelial: Citoqueratinas 10 e 14, Laminina.

- Citoqueratinas 10 e 14

Citoqueratinas são os constituintes do citoesqueleto de células epiteliais ou ainda são proteínas de queratina, que compõem os filamentos intermediários, encontrados no citoesqueleto intracitoplasmático do epitélio. Possui uma distribuição específica para cada tipo de epitélio e por essa razão são considerados marcadores de diferenciação, podendo ser localizados através de anticorpos monoclonais para diagnóstico de tumores. Existem, de acordo com estudos de genoma humano, pelo menos 49 tipos de citoqueratinas. As CQ têm distribuição característica de cada epitélio e seus anexos, então na epiderme estas podem ter uma expressão basal, onde são encontradas as CQ 5 e 14, ou supra basal as CQ 1 e 10.

A **CQ 10** é um marcador de queratinócitos diferenciados, em geral, expresso nas camadas supra basais da epiderme, sua expressão indica maturação do epitélio em proliferação.

A **CQ 14** é considerada marcador de queratinócitos indiferenciados, incluindo células-tronco e células de amplificação transitórias. Na epiderme normal, localiza-se na camada basal. Atualmente, as mutações descritas em seus genes podem levar a degeneração da camada basal, esclarecendo várias enfermidades cutâneas, como em: epidermólise bolhosa simples hiperqueratose epidermolítica, hiperqueratose palmo plantar epidermolítica, paquioníquia congênita, líquen plano e dermatoses (ALMEIDA *et al*,2014).

A **Laminina** é uma glicoproteína importante em processos de diferenciação, migração e adesão celular. Encontra-se na membrana basal, ligando-se ao colágeno tipo IV, sendo que essa ligação, é coordenada pela ação dessa proteína reguladora. Quando essa ligação é rompida por citocinese ou anormalidades epiteliais, o espaço formado é preenchido por bolhas de exsudato plasmático do tecido conjuntivo. Esta uma das explicações para o pênfigo bolhoso, pois, a laminina influencia a informação genética dentro do núcleo de uma célula e a sua própria destruição, sendo que esta está associada ao desenvolvimento tumoral. Avaliar a laminina no LEV pode vir a explicar a condição alterada da adesividade celular devido, particularmente, ao depósito dos imunocomplexos contra proteínas da matriz celular (MC FADDEN,2016; AMBRA *et al*, 2017).

1.4 TRATAMENTOS

Como a etiopatogenia do LEV é ainda pouco esclarecida, o tratamento é indicado, principalmente para o prurido vulvar, de modo a prevenir a formação de cicatrizes, evitar a deformidade anatômica e melhorar a qualidade de vida sexual dessas pacientes (LIPKIN,2014;BURROWS,2011;BRODRICK,2013). Por ser classificada como doença de provável origem imunológica, o tratamento é conservador com produtos de uso tópico, sendo esta terapia o “padrão ouro” e baseia-se em corticosteróide de alta potência (BRODRICK,2013). Estudo associando, a persistência no LEV, de COX 2 e angiogênese, demonstra que o processo inflamatório pode vir a levar ao desenvolvimento de CEC vulvar. No entanto, estudos ainda não comprovam, que o uso de corticosteroides prolongado, poderia reduzir o risco de progressão desta neoplasia maligna.

1.4.1 CORTICOSTEROIDES (GC)

Os corticosteroides são nomeados, de acordo com sua potência em relação ao cortisol plasmático, assim como pelo poder de vasoconstricção. Os corticosteroides tópicos ultra potentes são a primeira linha de tratamento do LEV, sendo o propionato de clobetasol 0,05% pomada, o mais utilizado. A função antiinflamatória do corticoide se dá pela ação da anexina A1 (lipocortina), que inibirá a fosfolipase A2, bloqueando a síntese de eicosanoides derivados do ácido araquidônico, com inibição das citocinas IL1, IL2, IL3, IL6, IL11, TNF- α . Esse bloqueio ocorre por repressão da transcrição da ciclooxigenase 2 (COX 2). O efeito antiproliferativo associado ao corticoide é devido a sua ação antimitótica epidérmica, com provável aumento da anexina A1(propriedades imunossupressoras). Tais substâncias reduzem a concentração de linfócitos, monócitos e eosinófilos, com isso ocorre a diminuição da resposta imune primária (UVA *et al*,2012). O efeito apoptótico e antiapoptótico decorre da diminuição de sobrevivência de eosinófilos e linfócitos, devido ao bloqueio da IL5 e GM-CSF, que são eosinófilos-dependentes. Ao contrário, o corticoide reduz a apoptose e, conseqüentemente, eleva a sobrevivência dos neutrófilos. A ação imunossupressora dos corticoides envolve a eliminação da resposta inflamatória, tais como: migração de leucócitos, fibroblastos, granulócitos e alteração da função das células endoteliais. Há com isso restrição de células dendríticas e macrófagos, resultando no declínio da IL12 e alterando a resposta imune do tipo Th1 para Th2 (SCHOEPE *et al*,2006; RADOJA *et al*,2000; SLOMINSK *et al*,2014).

Cerca de 60% das pacientes exibem remissão completa dos sintomas, com consequente eliminação de equimoses, fissuras, erosões e hiperqueratose. Sua utilização é eficaz parcialmente, porém, a atrofia da pele, as cicatrizes, estrias permanentes, hipertricose, dermatite, eritema, hiperpigmentação ou hipopigmentação e infecções oportunistas (bactérias, fungos, vírus-herpes) são irreversíveis com seu uso prolongado (THORSTENSEN,2012; SCHOEPE *et al*,2006;ANDREW LEE, 2015).

O afinamento de pele com corticosteroide tópico envolve o adelgaçamento da epiderme e derme, podendo atingir até a hipoderme por incremento da permeabilidade de água portanto, um aumento da perda de água transepidérmica. Há diminuição de proliferação dos queratinócitos e fibroblastos dérmicos. Conseqüentemente, produção afetada de colágeno por bloqueio da expressão do gene COL1A2, que codifica a cadeia do colágeno do tipo I, o qual representa 80% de todo o colágeno dérmico na pele. Os corticosteroides, também, bloqueiam a síntese de lípidos epidérmicos e reduzem colagenases. O afinamento da pele causada por uso de corticosteroide de longo prazo, parece relacionar-se com a inibição dos genes de queratina K5-K14 (marcadores de queratinócitos basais), como também dos genes K6-K16 (marcadores de queratinócitos ativados) e tais fatos incorrem em implicações na cicatrização e no reparo tissular (WEINDL,2011).

Segundo Schoepe, os corticoides tópicos foram classificados em sete grupos: Corticoides classe I (ultra potentes), classes II e III (potentes), classes IV e V (potência moderada), classe VI (baixa potência) e VII (potência muito baixa). No caso de líquen escleroso vulvar estão indicados corticosteroides ultra potentes (classe I) e potentes (classe II), sendo entre os ultrapotentes mais utilizados encontra-se a pomada de Propionato de Clobetasol 0,05%. (SCHOEPE,2006). A ação imunossupressora dos corticoides envolve a eliminação da resposta inflamatória, tais como: migração de leucócitos, fibroblastos, granulócitos e alteração da função das células endoteliais. Há com isso restrição de células dendríticas e macrófagos, resultando no declínio da IL12 (indutora de células T), alterando a resposta imune do tipo Th1 para Th2 (UVA *et al*,2012; RADOJA *et al*,2000).

O mecanismo de atuação do corticoide em pele baseia-se em ação genômica e não genômica. A genômica envolve o receptor de glicocorticoide (GR), que é fator de transcrição ligand-dependente. Se o ligand estiver ausente, o GR ficará acumulado no citoplasma, ligando-se às proteínas, entre elas a HSP 90 e HSP70 (proteínas do choque térmico). Quando o ligand adere-se ao receptor, o GR migra para o núcleo e a transcrição de genes com função antiinflamatória são ativados. O corticoide regula de forma negativa, por transrepressão, a expressão de genes pró-inflamatórios (citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão,

óxido nítrico, prostanoides). A via não genômica atua por receptores ligados à membrana e modula a resposta de células-alvo, como em monócitos, células T e plaquetas (SCHOEPE,2006).

Não há um protocolo de aplicação que seja aceito universalmente, como também não está bem definida a frequência ótima de uso tópico no alcance de resolução terapêutica eficaz. Entretanto, apesar do afinamento da pele, devido ao uso constante de corticosteroide de alta potência, ocorre uma melhora clínica e reforça, também, a teoria autoimune do líquen escleroso (DEY,2014; VIRGILI *et al*,2014).

A utilização requer uma fina camada de esteroide, correspondente à aproximadamente 1 gr do produto por aplicação (*finger tip unit*). A pomada deve ser aplicada uma ou duas vezes por dia durante 2 a 4 semanas, em seguida esta deve ser reduzida para três vezes por semana, para que seja estipulada sua retirada (VIRGILI *et al*,2014).

1.4.2. TERAPIAS FOTÔNICAS

O Laser é um acrônimo da expressão *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*. Este representa um símbolo de avanço tecnológico, sendo que há cerca um quarto de século ingressou na vida cotidiana na área médica, aproximando a interface da física com a esfera biológica.

1.4.2.1. HISTÓRICO

Desde a antiguidade a luz era empregada com finalidades curativas, os indianos por volta de 1.000 a.C. utilizavam psoralenos associados à luz solar para tratar pacientes com vitiligo. No final da Idade Média, a luz do sol ou até mesmo o fogo foi empregado no combate à pandemia de peste negra na Europa, decorrente de *Yersinia pestis*, reduzindo, desta forma as feridas tegumentares e bubões.

No alvorecer do século XX, Nils R.Finsen utilizou a *arc lamp* com radiação na tentativa de tratar lupus vulgaris e tuberculose cutânea com sucesso, recebendo o 3º prêmio Nobel em Medicina, sendo considerado o Pai da Fotomedicina. Em 1917 foram lançadas as bases teóricas para a compreensão da formação da luz do laser, quando o Einstein postulou a teoria da emissão estimulada de radiação.

Em 1960, Theodore Maimann desenvolveu o que seria considerado como o primeiro Laser, que foi empregado pela primeira vez em medicina no ano de 1961, pelo dermatologista na Universidade de Cincinnati, professor Dr. Leon Goldman. Já o professor L' Sperance empregou o laser de rubi e laser de argônio em oftalmologia, em 1962, despertando assim o interesse médico do uso de laser em diversas especialidades médicas (CHAVANTES,2008).

Em 1978, começaram a surgir os primeiros lasers de baixa potência, conhecidos como Laser de baixa intensidade (LBI), cujo espectro de emissão situa-se no vermelho ou infravermelho próximo, e cujo modo de ação difere dos demais dos Lasers cirúrgicos. Contudo, LBI já vinha sendo utilizado, desde final da década de 60, pelo professor Dr. Mester em cicatrização de feridas com sucesso.

Em 1982, Tina Karu descreveu os mecanismos distintos relacionados a ação do Laser no visível e infravermelho, empregando uma potência baixa, facilitando o entendimento deste (KARU,1989).

Segundo Chavantes, os Lasers são classificados, de acordo com sua potência, em alta ou baixa:

➤ **Lasers de Alta Potência ou Cirúrgicos:** são os que apresentam potência acima de 1W e promovem aumento de temperatura tecidual acima de 45°C, levando a efeitos:

- Fototérmicos: resultam em coagulação, carbonização e vaporização.
- Fotomecânicoacústico: corta com alta precisão.
- Fotoablativo: promove ruptura e fotodissociação das moléculas com ruptura intermolecular.
- Fotoionizante: Quebra da ligação quaternária do DNA.

➤ **Lasers com Potência Baixa:** são os que apresentam potência <1.000 mW e temperatura tecidual deve estar abaixo de 1° C. A aplicação terapêutica dos Lasers de Baixa Potência se faz através da Terapia Fotodinâmica (PDT) e a Terapia de Fotobiomodulação (TPBM). Estes apresentam uma ação fotofísicobioquímica, com atuação no receptor exógeno e endógeno celular, respectivamente.

O laser de baixa intensidade (LBI) age reduzindo processo inflamatório, diminuição de edema, aumento da microcirculação local, incremento da fagocitose, proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno, assim como apresenta uma resposta analgésica (CHAVANTES,2008).

1.4.2.1. TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT)

A PDT é uma técnica fotoquímica e tem sido opção de tratamento em algumas doenças ginecológicas e dermatológicas (OLEJEK *et al*,2010; ASCENCIO *et al*,2007; HILLEMANN *et al*,1999). Consiste da associação de um fotossensibilizante, bem como de uma fonte de luz

no mesmo comprimento de onda do corante, as quais devem ser ressonantes opticamente, além da presença do Oxigênio molecular. A droga fotossensibilizadora absorve energia diretamente da fonte de luz e a transfere para moléculas de oxigênio, criando espécies reativas (EROs), em particular o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$). Tais reações serão responsáveis pelo dano e com subsequente morte celular (ASCENCIO *et al*,2007; PRODROMIDOU *et al*, 2018).

Oxigênio singleto é um dos estados eletronicamente excitados do oxigênio molecular. Em sistemas biológicos, este apresenta tempos de vida extremamente baixos, inferiores a 0,04 μs . Em função disso, seu raio de ação é extremamente reduzido (menor de 0,02 μm). Foi Gollnick, quem primeiramente associou a atividade tumoricida da PDT à ação de radicais livres. Os sítios ricos em elétrons, presentes nas células-alvo, tendem a ser os mais facilmente modificados, como a guanina, cadeias laterais de aminoácidos, contendo estruturas aromáticas e ligações de enxofre, ligações duplas de esteroides e lipídeos insaturados. Isso resulta em danos na parede celular, mitocôndria e lisossomos, comprometendo a integridade celular de tecidos neoplásicos.

A resposta à PDT acontece de acordo com dois mecanismos:

Tipo I, ou seja, na presença de oxigênio molecular, o fotossensibilizante ativado pode reagir com moléculas próximas por transferência de elétrons ou hidrogênio, produzindo radicais livres.

Tipo II, onde há transferência de energia ao oxigênio, gerando oxigênio singleto, que é altamente citotóxico. Além dessa ação, ocorre também um fotodano da membrana lipídica, com liberação maciça de fragmentos lipídicos e metabólitos do ácido araquidônico, que são potentes mediadores inflamatórios. Ademais, pode promover as alterações em endotélio vascular, que atraem neutrófilos e plaquetas, com recrutamento de células imunes no sítio foto irradiado, resultando numa resposta imunológica local.

Autores, como Korbelic, acreditam numa memória imunológica com envolvimento do linfócito T para controle tumoral e antimicrobiano. Sua eficácia depende da seletividade e retenção do fotossensibilizante, da intensidade da radiação incidente, da transferência de energia de excitação do agente fotossensível e de seu efeito oxidante (CHAVANTES,2008). Especificamente, no LEV sua eficácia tem variado, principalmente, devido às características dos fotossensibilizantes comumente usados, os quais são tópicos, necessitando de períodos que variam de três até doze horas para a adequada produção de porfirina antes da interação com a luz (OSIECKA *et al*, 2012; SOTIRIOU, 2008; BINISZKIEWICZ *et al*, 2005). A falta de padronização dos diversos parâmetros físicos da radiação (fonte luminosa, potência, tempo de exposição, densidade de energia e de potência, área do *spot*, etc) também colabora com o

sucesso parcial dessa modalidade terapêutica (TAUB, 2007). Efeitos adversos são relatados, como eritema, desconforto e ardor, até mesmo após algumas horas da terapia. Portanto, a associação com anestésico intralesional é comum (ALLISON,2013; ROMERO *et al*,2007). No entanto, os efeitos benéficos no LEV se sobressaltam, como o alívio dos sintomas por períodos de até seis meses e/ou ausência da lesão (BINISZKIEWICZ *et al*, 2005).

A Terapia fotodinâmica tem como premissa básica a destruição de células tumorais e microrganismos patogênicos (ação citotóxica), resultando em oxirredução e produção de radicais livres, com seguinte morte celular. O dano endotelial promovido pela PDT no local foto-irradiado, atrai neutrófilos, plaquetas e, conseqüentemente, formação de coágulo de fibrina, que irá culminar em vasoconstricção, favorecendo a destruição tumoral. A resposta inflamatória gerada pela PDT prevê a degradação de fosfolipídios (dano oxidativo) com liberação de mediadores inflamatórios e citocinas como IL1- β , IL1, IL2, IL6, IL10, TNF α , G-CSF, MMP-1 e MMP-3. Ademais, linfócitos T auxiliares CD4 e CD8 são ativados pós- PDT, que podem gerar necrose ou induzir vias apoptóticas, mesmo após término de tratamento de células neoplásicas (KORBELIK,2011; KHARKWAL *et al*,2011; NAYAK, 2005; SHARMA *et al*,2012).

- **FOTOSSENSIBILIZANTES**

Os poucos trabalhos que tratam o LEV com PDT utilizam o ácido 5-aminolevulínico (ALA), um precursor do agente fotossensível protoporfirina IX, ou seu éster metil-ALA que é mais lipofílico. Todavia, em pH fisiológico o ALA torna-se um íon dipolar, o que retarda sua capacidade de atravessar barreiras biológicas, tais como as membranas celulares, resultando numa distribuição não homogênea e lenta no tecido alvo, sem mencionar seu alto custo e a fototoxicidade (BINISZKIEWICZ *et al*, 2005; SOTIRIOU, 2008;VANO-GALVAN *et al*, 2009), por outro lado, o azul de metileno (AM), como fotossensibilizante, torna a PDT uma opção com excelente custo-benefício.

O azul de metileno é um composto aromático heterocíclico solúvel em água ou álcool. Possui um bom rendimento quântico e baixo potencial de redução. É atóxico e absorve intensamente em $\lambda=664$ nm, em solução aquosa.

O azul de metileno é conhecido como um corante histológico utilizado em microbiologia e farmacologia, pertence à classe dos benzofenotiazínicos e sua síntese foi descrita pela primeira vez em 1876 como tintura para tecidos.

Na célula o azul de metileno acumula-se preferencialmente na mitocôndria e isso deve-se a lipofilicidade e pela carga eletroquímica positiva atraída pela negativa mitocondrial (KHANAL,2014; CAETANO *et al*, 2007; TARDIVO *et al*, 2005).

Quando em solução aquosa está presente na forma de monômeros (soluções diluídas), dímeros e agregados maiores (soluções bem concentradas) apresentando ação nas bandas de absorção, respectivamente entre 600 a 664 nm e 590 nm, então esse corante é absorvido por luz vermelha do espectro luminoso e além de possuir um elevado rendimento quântico de oxigênio singlete, consegue gerar várias espécies radicais e ser altamente foto estável, também é facilmente eliminado pelo organismo, considerado atóxico e de baixo custo (CAETANO *et al*, 2007; TARDIVO *et al*, 2005). O AM tem afinidade com a melanina por ser mais lipofílico que o ALA e liga-se ativamente na mitocôndria, ocasionando um mecanismo de redução da resposta inflamatória (UCHOA,2007; WAINWRIGHT,2005). Ademais, demonstra atividade *in vivo* contra tumores, vírus, doenças de pele, bactérias e fungos. Uma revisão detalhada sobre as características do AM pode ser encontrada no trabalho de Tardivo et al (TARDIVO *et al*, 2005).

1.4.2.2. TERAPIA LASER EM BAIXA INTENSIDADE OU DE FOTOBIMODULAÇÃO (TPBM)

O Laser de Baixa Intensidade (LBI) surgiu com Endre Mester em Budapeste, Hungria, em 1966, ocasião em que publicou os efeitos bioestimulatórios do Laser (GÁSPAR,2009). Os Lasers terapêuticos mais utilizados nas décadas de 70 e 80 foram os de mistura gasosa de He-Ne (632,8 nm), com emissão na região do vermelho do espectro eletromagnético. Atualmente, se utiliza um semicondutor de diodo que pode ser o arsenieto de gálio (600 – 808 nm) ou estar dopado por outros elementos, além da utilização de sistemas de LEDs (*light emitting diode*) em potência baixa, sendo que as faixas mais estudadas são as do vermelho (600 – 700nm) e infravermelho próximo (700 – 1000 nm) (KARU,1987;JOENSEN et al, 2011).

A TPBM tem sua aplicação em várias condições clínicas, como: controle de dor e úlceras devido ao seu efeito anti-inflamatórios e na regeneração tecidual. Este apresenta um mecanismo de ação que irá resultar em Fotobiomodulação, através de biorregulação de organelas celulares, levando a uma reação foto físico química localizada dentro da célula, especialmente com luz no comprimento do vermelho, do espectro eletromagnético. Ação esta, particularmente, na membrana interna da mitocôndria, especificamente, no citocromo C oxidase na cadeia respiratória. A luz do laser, através da reação de oxirredução, leva a um aumento da síntese de ATP, sendo que na faixa do infravermelho atua, principalmente, na

bomba de Na^+/K^+ e nos canais de Ca^{++} da membrana celular (KARU,1989; HOLANDA *et al*,2017).

Na Fotobioestimulação de tecido biológico, baseada na excitação de fluoróforos endógenos (NAD, FAD, ...), tem como alvo a crista interna na cadeia do citocromo C oxidase da mitocôndria. Assim, os efeitos do TPBM, segundo Karu, são observados:

- À nível molecular (efeitos primários ou diretos): efeito bioelétrico, bioenergético, bioquímico.

- À nível celular (efeitos secundários ou indiretos): efeitos antiedematosos, antiinflamatórios e analgésicos.

- À nível sistêmico (ou efeitos terapêuticos): Estímulos à microcirculação, estímulo do tropismo celular. Os efeitos da TPBM em reparo tecidual estão bem documentados, revelando uma ação antiinflamatória, incrementando o número de células brancas, como também síntese do colágeno, estimulando a proliferação de fibroblastos e neovascularização de tecidos lesados, além da imunomodulação e dos efeitos hemodinâmicos (KARU,1989).

A ação analgésica da TPBM se dá por interferência na mediação da mensagem de dor, através da inibição dos sinais nociceptivos decorrentes de nervos periféricos. Estudos ainda demonstraram o estímulo à produção de endorfinas, aumento da excreção urinária de glicocorticoides (inibidor da síntese de β endorfina), incremento de serotonina, diminuição bradicinina, histamina e acetilcolina. Outra ação da TPBM é o acréscimo na produção de ATP, com consequente relaxamento muscular, aumento da microcirculação local, removendo, assim, substâncias algogênicas, contribuindo para uma resposta analgésica (HOLANDA *et al*,2017).

O laser atua também na síntese de prostaglandinas, aumentando a transformação de prostaglandina G₂ e prostaglandina H₂ em I₂, promovendo um efeito anti edematoso e anti-inflamatório. Este efeito incorre em redução da inflamação e da dor, otimização do reparo tecidual, regeneração de tecidos e nervos e repigmentação de lesões de pele (PIVA *et al*, 2011; TRAJANO *et al*, 2018). Importante mencionar que, essa terapia com laser de baixa intensidade pode levar as células e tecidos para a homeostase (CHAVANTES,2008). Embora estes efeitos sejam desejáveis no tratamento do LEV, até o presente momento nenhum trabalho foi encontrado associando-o à TPBM.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O tratamento padrão para o LEV pode causar efeitos colaterais, como atrofia e estrias permanentes, ademais não promove a cura. Então, a busca por novas terapias é desafiadora e de suma importância, na prática clínica ginecológica (SCHOEPE et al, 2006). Novas propostas terapêuticas são avaliadas mediante estudos clínicos, histopatológicos, que possam informar sobre a segurança e dosagem apropriada.

Até o presente momento nenhuma referência foi encontrada sobre TPBM em LEV, embora os efeitos antiinflamatório e cicatrizante dessa terapêutica sejam largamente documentados em diversas aplicações médicas e biológicas (FIORIO *et al*,2017). Há poucas referências na literatura, sobre a ação da PDT no líquen escleroso vulvar, com número reduzido de pacientes, sem dados técnicos especificados, exposição radiante variando de 9 a 150 J/cm², bem como irradiância oscilando de 40 a 700 mW/cm², sem mencionar os trabalhos que nem relatam a dosimetria adotada. Em estudo clínico randomizado, controlado realizado, previamente, por Belotto et al., em Fase I, foi definida a dosagem segura e sem efeitos adversos durante a aplicação de terapias fotônicas (PDT e TPBM) em comparação com tratamento padrão usual (Corticosteróide tópico) em LEV (PRODRONIDOU et al ,2018; BELOTTO,2015).

Já no estudo atual, em Fase II, o interesse é a ação do tratamento com PDT e TPBM comparados ao tratamento com Corticosteroide tópico (“*Gold Standard*”) para tratar o LEV, avaliando a relação dose/resposta, determinação da eficácia terapêutica e segurança em curto e medio prazo .

Dessa forma, a importância em averiguar a eficácia e a segurança destes novos tratamentos no LEV, se fazem necessárias, bem como da avaliação do tempo de recorrência, além das respostas clínica, histológica e imuno-histoquímica.

Dentro das limitações do tema, encontra-se o número ínfimo de referências sobre tratamento do LEV com PDT, ademais, ausência total de estudo com a aplicação de TPBM em ginecologia, conseqüentemente, a não existência de protocolo dosimétrico na literatura médica.

2.1 HIPÓTESE

A dosimetria empregada no presente trabalho tem como fundamentação um estudo piloto clínico prévio realizado por nosso grupo, em mulheres com LEV, tratadas através da PDT e TPBM, nas quais após 8 aplicações obtiveram melhora do trofismo vulvar e redução do prurido, comparado ao uso do corticoide tópico (Padrão Ouro). Espera-se que, no estudo clínico

prospectivo possa vir a contribuir com o possível entendimento dos mecanismos de ação desses dois tratamentos fotônicos e , dessa maneira, controlar essa dermatose vulvar crônica.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL:

Analisar o efeito das Terapias Fotônicas e Corticosteroide tópico (procedimento padrão) no tratamento do Líquen Escleroso Vulvar crônico diagnosticado previamente.

3.2 ESPECÍFICO:

Avaliação histopatológica, imunohistoquímica e clínica do LEV pré e pós tratamento com Propionato de Clobetasol, PDT e TPBM, como também verificar o impacto das terapias sobre o principal sintoma clínico, o prurido vulvar e recorrência. Os marcadores estudados pré e pós tratamentos foram:

- 1- Estudo Histológico
- 2- Análise de marcadores da morfologia epitelial: degeneração hidrópica, hiperqueratose e hialinização do colágeno.
- 3- Análise do infiltrado inflamatório, mastócitos e CD34.
- 4- Análise dos marcadores de proliferação celular: P53 e Ki67
- 5- Análise de marcadores relacionados à estratificação epitelial: CK10, CK14 e laminina.

4. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

O estudo prospectivo, randomizado, controlado foi realizado com 34 pacientes com diagnóstico histológico de LEV, devidamente matriculadas no Centro de Referência e Saúde da Mulher (Hospital Pérola Byington, São Paulo), alocadas no setor de Laserterapia no Departamento de Ginecologia. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Nove de Julho, tendo sido aprovado sob parecer número 768.168 emitido em 27/08/2014. Após ciência e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE), as pacientes foram submetidas à biópsia para confirmação histológica do LEV.

Foram coletados exames laboratoriais no início do estudo, a saber: hemograma completo, glicemia de jejum, T4 livre, TSH, uréia, creatinina, sódio, potássio, cortisol plasmático e ACTH.

4.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Participaram deste estudo apenas mulheres com idade superior a 25 anos, portadoras de LEV diagnosticado histologicamente e com níveis de cortisol e ACTH normais, confirmados com exame de sangue.

4.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Portadoras de qualquer neoplasia em curso e/ou com AIDS, discrasia sanguínea; grávidas ou em aleitamento; pacientes em uso de corticosteroides, imunossupressores ou anticoagulantes; insuficiência renal, hepática e pulmonar-cardiovascular, além de transplante de órgãos .

4.3. ALOCAÇÃO DOS GRUPOS ESTUDADOS E PARÂMETROS DE TRATAMENTO

A Tabela 1 descreve os os grupos de tratamento, pacientes alocadas e parâmetros de dose.

Tabela 1: Características dos grupos estudados e dosimetria.

Grupos	N	Tratamento	Parâmetros
Corticosteroide	12	Corticosteróide tópico em vulva	Propionato de clobetasol 0,05% pomada, aplicada uma vez ao dia (24/24 hs) na dose de 1g/aplicação (sachês de 1 g), durante 4 semanas seguida de aplicações alternadas por 4 semanas, total de 8 semanas de tratamento (48/48 hs).
PDT	11	Terapia fotodinâmica pontual :8 pontos em vulva	Azul de metileno 1% intralesional, $\lambda = 660 \pm 10$ (nm), $P = 100$ mW, $DP = 510$ mW/cm ² , $E = 4$ J, $DE = 20$ J/ cm ² , $t = 40$ s, uma vez por semana durante 8 semanas
TPBM	11	Fotobiomodulação pontual, em 8 pontos em vulva	Mesmos parâmetros do GPDT, com exceção do azul de metileno, uma vez por semana durante 8 semanas

Parâmetros do laser: λ : comprimento de onda; P: potência; DP: densidade de potência; E: energia; DE: densidade de energia; t: tempo de exposição.

4.4. TRATAMENTO COM CORTICOSTERÓIDE TÓPICO

Foram entregues às pacientes desse grupo, 45 sachês de Propionato de Clobetasol 0,05% pomada, manipulados previamente, na dose de 1 grama do produto por sachê, que deverá ser aplicado diariamente na pele vulvar por 4 semanas. Após esse período, em esquema alternado por mais 4 semanas, num total de 8 semanas de tratamento. Essa dose corresponde a unidade de “finger tip unit” preconizado em literatura. (Figura 1).

Figura 1: Sachês da pomada de propionato de clobetasol 0,05%. A: visão frontal. B: visão posterior



Fonte: CRSM

4.5. TRATAMENTOS FOTÔNICOS

O modo de aplicação das terapias fotônicas foi pontual, em contato com a pele vulvar, em 8 pontos da vulva, conforme a Figura 2, e a ponteira do Laser protegida com envoltório plástico descartável.

Figura 2: Pontos de aplicação das Terapias Fotônicas em região vulvar.



Fonte: CRSM

4.6. ANÁLISES METODOLÓGICAS EMPREGADAS

As análises histológicas e imuno-histoquímicas foram realizadas pré e pós 90 dias do término do tratamento. Entretanto, a avaliação da resposta clínica, através da intensidade do prurido, foi realizada semanalmente, nos dias de tratamento dos grupos PDT e TPBM. O GC não foi acompanhado semanalmente porque o tratamento padrão foi realizado pelas próprias pacientes, nos respectivos domicílios, por 60 dias.

4.6.1. AVALIAÇÃO DO FOTOTIPO DE PELE DE ACORDO COM FITZPATRICK

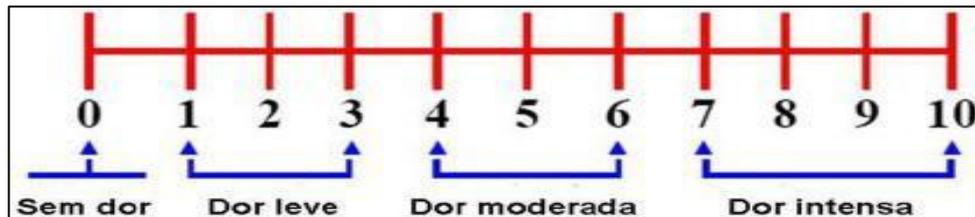
As pacientes foram classificadas de acordo com fototipo de pele, através da escala criada por Thomas B. Fitzpatrick, em 1976, que definiu 6 fototipos variando do tipo I (pele branca) ao tipo VI (pele negra), ou ainda pela capacidade de bronzeamento de cada pessoa, assim como sensibilidade e vermelhidão, quando da exposição solar. Assim, a classificação que foi aplicada no estudo segue a seguinte orientação de Fitzpatrick:

- I:** Pele muito sensível ao sol, queima com facilidade ficando muito vermelha e nunca bronzeia.
- II:** Pele sensível ao sol, queima com facilidade (fica vermelha) e bronzeia pouco.
- III:** Pele com sensibilidade normal ao sol, a pele bronzeia gradualmente, mas às vezes fica vermelha
- IV:** Pele com sensibilidade normal, queima pouco e bronzeia com facilidade.
- V:** Pele pouco sensível, queima raramente, bronzeia bastante.
- VI:** A pele não é sensível, nunca queima, pele muito pigmentada.

462 PRURIDO

As pacientes foram indagadas quanto à intensidade do prurido vulvar para avaliar a severidade e a duração do mesmo, em cada sessão, antes e após as irradiações, de acordo com uma escala analógica visual (Figura. 3).

Figura 3: Escala analógica visual (EVA) para medir a intensidade do prurido vulvar.



Fonte: CRSM

463 HISTOLOGIA

As biópsias foram realizadas em dois momentos: no início do estudo para a confirmação do diagnóstico de LEV, com consequente inclusão no protocolo de pesquisa e ao final de 90 dias do término do tratamento para a investigação da resposta e o prognóstico pós tratamentos. Os fragmentos de pele foram colocados imediatamente em frascos, contendo formol tamponado 4%, devidamente identificados com o número de prontuário e o nome das pacientes, de acordo com rotina padrão do próprio hospital, e encaminhados ao Laboratório de Patologia do CRSM-Hospital Pérola Byington. Não houve qualquer menção dos grupos estudados nos frascos, de maneira que, a análise foi cega e analisada por dois patologistas experientes.

Uma vez fixadas, as amostras foram desidratadas com álcool absoluto, clareadas com xilol, incluídas em parafina, seccionadas em micrótomo e reidratadas com xilol e álcool em diferentes concentrações.

Três conjuntos de cortes histológicos foram processados. Um para coloração em hematoxilina e eosina (HE), com o objetivo de reconhecer as células e seus componentes e inferir sobre a histologia do tecido sob um microscópio óptico comum. Os resultados foram classificados em duas categorias: 1 ou 2.

Na categoria 1, foi identificado o LEV inicial ou estabilizado, correspondente a infiltrado inflamatório crônico abaixo da epiderme, que agride a membrana basal (inicial) ou ainda o início do espessamento e hialinização do colágeno (estabilizado).

Já na categoria 2, foi identificado o LEV como antigo, significando intensa hiperqueratose, destruição e total hialinização do colágeno, corresponde à variante do líquen clássico.

464. ANÁLISE DA MORFOLOGIA EPITELIAL E HIALINIZAÇÃO COLAGÊNICA

Foram avaliadas a intensidade de degeneração hidrópica epitelial, hiperqueratose e hialinização colagênica, observando-se as lâminas coradas em HE de todos os grupos. A análise foi realizada por somente um pesquisador, sem conhecimento dos grupos e dos períodos experimentais.

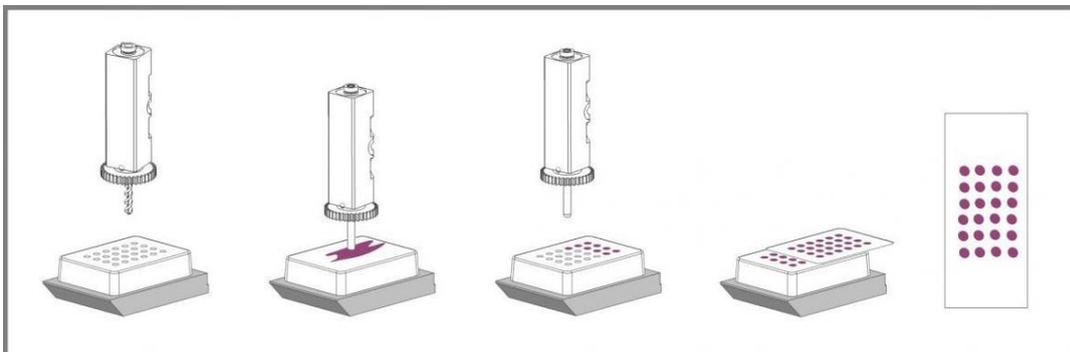
A morfologia epitelial foi classificada em: 0 – ausente, 1 – discreta, 2 – moderada e 3 – intensa.

465. IMUNO-HISTOQUÍMICA

O terceiro conjunto dos cortes histológicos obtido das biópsias foi utilizado para a técnica imuno-histoquímica, com o objetivo de delinear as mudanças inflamatórias e a carcinogênese no LEV. Foi empregado o microarranjo tecidual (TMA) em bloco de parafina, para o preparo posterior das lâminas para a imuno-histoquímica.

O microarranjo tecidual (TMA) é uma coleção organizada de amostras teciduais de dimensões padronizadas dispostas sob a forma de matriz em uma única lâmina. Para confecção das lâminas de TMA, os cortes em HE, correspondentes aos blocos doadores selecionados, foram analisados em microscópio óptico para localização e marcação das áreas mais representativas das lesões. Por meio de sobreposição de imagens das lâminas com os respectivos blocos, as áreas de interesses foram localizadas, recortadas na forma de cilindros de 1 mm de diâmetro e montadas no bloco de parafina receptor em intervalos de 0,3 mm, empregando-se o aparelho de TMA Master (3D HISTECH) (Figura 4). O procedimento foi repetido em duplicata para cada paciente até que todos os espécimes estivessem representados no bloco receptor em duas posições distintas. Após o posicionamento das amostras, o conjunto foi aquecido em forno a 37°C por 30 minutos e em seguida a 60°C por mais 10 minutos para fusão das amostras ao bloco receptor. Uma vez pronto, o bloco TMA foi cortado em secções histológicas e as lâminas foram submetidas aos protocolos de marcação por imuno-histoquímica.

Figura 4- O TMA Master é uma máquina controlada por computador para a criação de blocos de tecidos



Fonte: Departamento de Patologia Hospital A.C.Camargo

466. MARCAÇÃO POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

As amostras do bloco de TMA foram cortadas na espessura de 4 μ m, estendidas em lâminas tratadas com poly-L-lysina, desparafinizadas, reidratadas e após lavagem, submetidas ao protocolo de recuperação antigênica, indicada pelo fabricante de cada anticorpo. Posteriormente, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena utilizando peróxido de hidrogênio a 20% em solução de metanol (1:1v/v) por 30 min. Em seguida, os cortes foram incubados com os seguintes anticorpos primários: anti-Ki67 (1:75, clone MIB-1, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA), anti-P53 (1:50, clone D0-7, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA), anti-CD34 (1:50, clone QBEnd/10, Spring Bioscience, CA, EUA), anti-Citoqueratina 10 (1:100, clone DE-K-10, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA), anti-Citoqueratina 14 (1:500, clone LL002, Cell Marque, CA, EUA) e anti-Laminina (1:50, clone 4C7, Diagnostic Biosystems, CA, EUA) Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado (LSAB, Dako, CA, EUA) na diluição de 1:100 por durante 30 minutos em câmara úmida. Em seguida, a reação foi revelada utilizando-se a solução cromógena composta por DAB (3,3'-diaminobenzidina-Sigma Co-USA-D5637) por 5 min. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e montadas em Permount® (Fisher Scientific NJ USA). Para controle negativo de marcação, o anticorpo primário será substituído por soro não imune da mesma espécie do anticorpo trocado.

4.6.7. COLORAÇÃO ESPECIAL COM AZUL DE TOLUIDINA

A coloração especial com azul de toluidina foi aplicada para a detecção de mastócitos, por intermédio da metacromasia presente nessas células ao reagir com o corante. As lâminas foram desparafinizadas em dois banhos de xilol por 5 minutos, reidratadas em concentrações decrescentes de álcool etílico (100 a 80%) e lavadas em água por 5 minutos. Em seguida, foram coradas com solução de azul de toluidina à 1%, por 1 minuto. Após a coloração, as lâminas foram novamente lavadas após uma rápida desidratação, em concentrações crescentes em álcool etílico e, finalmente, as lâminas foram montadas em permount (Fisher Scientific NJ USA).

4.7 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

As células Ki67 e p53 positivas, bem como aquelas que exibiram metacromasia após reação com azul de toluidina, foram quantificadas manualmente, utilizando a ferramenta de contagem de células disponível no software ImageJ (National Institute of Health, NIH). Os spots contendo as respectivas marcações foram digitalizados em aumento original de 400X, utilizando-se microscópio de luz convencional acoplado a câmera digital (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). O mesmo procedimento foi aplicado para a quantificação das estruturas vasculares CD34 positivas. As marcações de CK10, CK14 e laminina foram analisadas subjetivamente, observando-se a frequência de spots positivos e o local de marcação no epitélio (se na camada basal, supra basal ou na totalidade do epitélio). Todas as análises foram feitas pelo mesmo operador, sem conhecimento dos grupos e dos períodos experimentais.

4.7.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram avaliados 4 spots do mesmo caso e período experimental, obtidos de dois cortes histológicos distintos. Os *spots* foram examinados em 100 e 400x pelo mesmo pesquisador, sem conhecimento dos grupos e dos períodos de análise. Para as Citoqueratinas 10 e 14 e laminina, a expressão imuno-histoquímica foi avaliada por método semi-quantitativo.

Foi atribuído os seguintes escores à intensidade de marcação imuno-histoquímica: 0 – ausente; 1 – discreta; 2 – moderada; 3 – intensa.

Ao final da análise dos quatro spots, foi selecionado o maior escore para fins estatísticos. Para Ki67 e p53, foram quantificadas as células epiteliais positivas em 4 campos de cada caso, obtendo-se ao final a porcentagem de células positivas. Para o CD34, foi obtida a porcentagem

de marcação imuno-histoquímica por intermédio de método de deconvolução da imagem, com posterior quantificação somente do DAB. A área de marcação foi dividida pela área total analisada, obtendo-se uma porcentagem da expressão imuno-histoquímica.

4.7.2. ANÁLISE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO E DE MASTÓCITOS

O infiltrado inflamatório foi classificado em 0 – ausente, 1 – discreto, 2 – moderado e 3 – intenso, analisando-se os casos corados em HE, sem conhecimento dos grupos. Ao final, o maior escore foi adotado para fins estatísticos. Para a quantificação da densidade de mastócitos, duas lâminas de TMA foram coradas com azul de toluidina. Foram quantificados dois campos de cada *spot*, com aumento de 400x, contando-se as células que exibiam metacromasia, independentemente, de estarem exibindo degranulação ou não.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística descritiva foi aplicada para as variáveis idade, doenças associadas, fototipo de pele e tempo de prurido. A avaliação das frequências antes e após os tratamentos foi aplicada para as variáveis intensidade de prurido, histologia, citoqueratinas 10 e 14, laminina, Ki 67, P53, CD34, mastócitos. A frequência da variável recorrência foi avaliada apenas nos pós tratamento. Na análise estatística inferencial os dados foram avaliados quanto à normalidade através do teste de normalidade, de Kolmogorov -Smirnov.

Os testes de Qui-quadrado ou Fisher foram aplicados para a diferença de frequências, segundo os tratamentos, para as variáveis intensidade de prurido, histologia, CK10, CK14 e laminina. As variáveis intensidade de prurido, histologia, CK10, CK14 e laminina, para amostras pareadas, tiveram suas frequências avaliadas pré e pós tratamentos.

Para as variáveis numéricas com amostras pareadas, o teste paramétrico T-student e o não paramétrico de Wilcoxon, foram aplicados. Para avaliação das variáveis idade, tempo de prurido, fototipo de pele, Ki 67, P53, CD34, mastócitos, recorrência pré e pós tratamento, foram empregados teste Anova com pós-hoc Bonferroni, e teste de Dunnet T3. Para avaliação da intensidade do prurido, histologia, CK10, CK14 e laminina, pré e pós tratamentos, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

No presente estudo, os grupos foram compostos por 12 pacientes no grupo Corticoide, 11 no grupo PDT e 11 no grupo PBM. Em todas as análises fixou-se a significância de 5% ($p < 0,05$). O software utilizado foi o SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*).

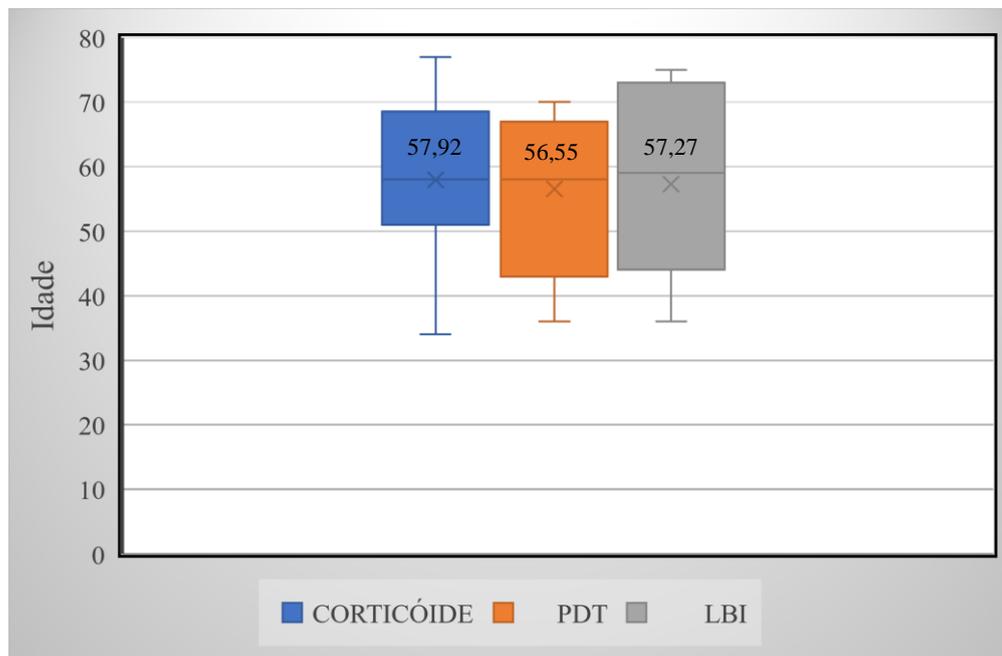
Houve redução do número de casos para análise, em alguns marcadores, em virtude de problemas na confecção das amostras. Além dos fragmentos provenientes de biópsia terem sido diminutos, houve dificuldade no processamento histopatológico que acabou fragmentando ainda mais o material, situação que dificultou a representatividade epitelial pelo TMA.

5. RESULTADOS

5.1. IDADE

A variável idade apresentou distribuição normal e variâncias similares entre os grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à idade, a média foi de 57,26 anos ($p=0,967$), conforme demonstrado no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Idade das pacientes em função dos grupos estudados.



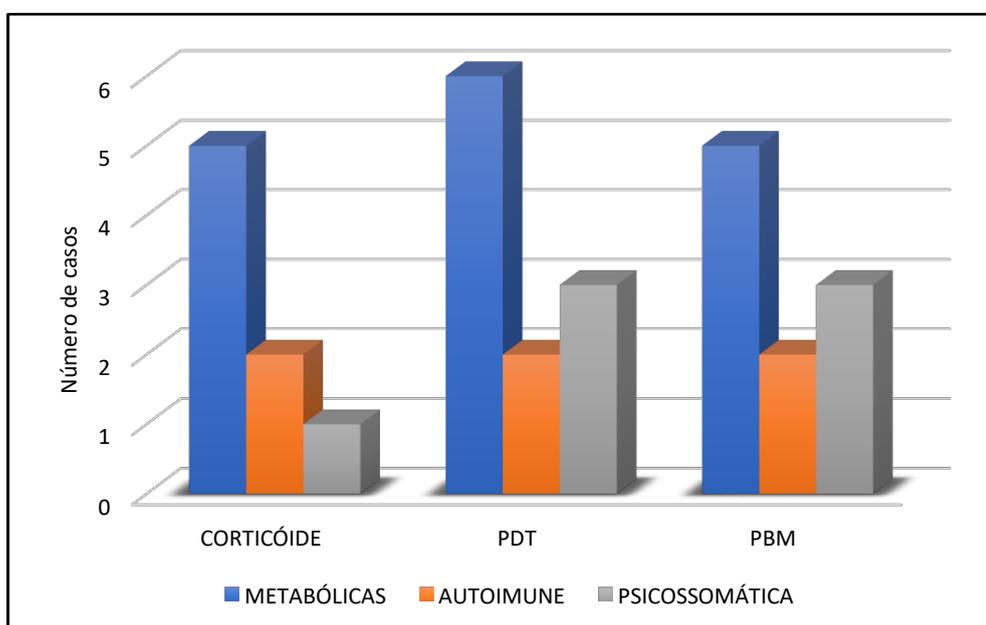
Fonte:CRSM

5.2. DOENÇAS ASSOCIADAS

Foram incluídas em categorias as doenças pré-existent, tais como: Metabólica (Hipertensão arterial e/ou Diabetes mellitus), Autoimune (Hipotireoidismo), Psicossomática (Depressão), conforme demonstrado no Gráfico 2.

As doenças metabólicas foram as mais frequentes entre os grupos estudados, sendo a hipertensão arterial a mais prevalente, seguido de psicossomática e, por último, autoimune.

Gráfico 2: Doenças pré existentes por grupo de tratamento

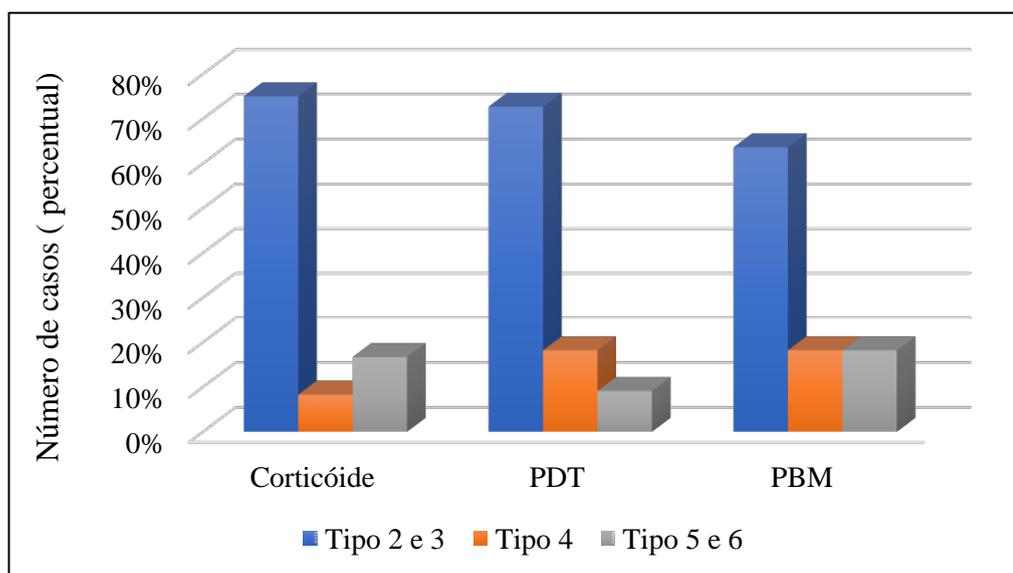


Fonte: CRSM

5.3. FOTOTIPO DE PELE PELA CLASSIFICAÇÃO DE FITZPATRICK

De acordo com o Teste Linear de Associação, não houve diferença quanto ao fototipo de pele e o tratamento proposto ($p=0,629$), uma vez que de 70% das pacientes encontravam-se distribuídas entre os fototipos II e III, conforme demonstra o Gráfico 3. O fototipo mais observado entre os grupos foi o III, seguido do IV e VI, com distribuição similar entre os grupos.

Gráfico 3- Fototipo de pele avaliado por grupo estudado.



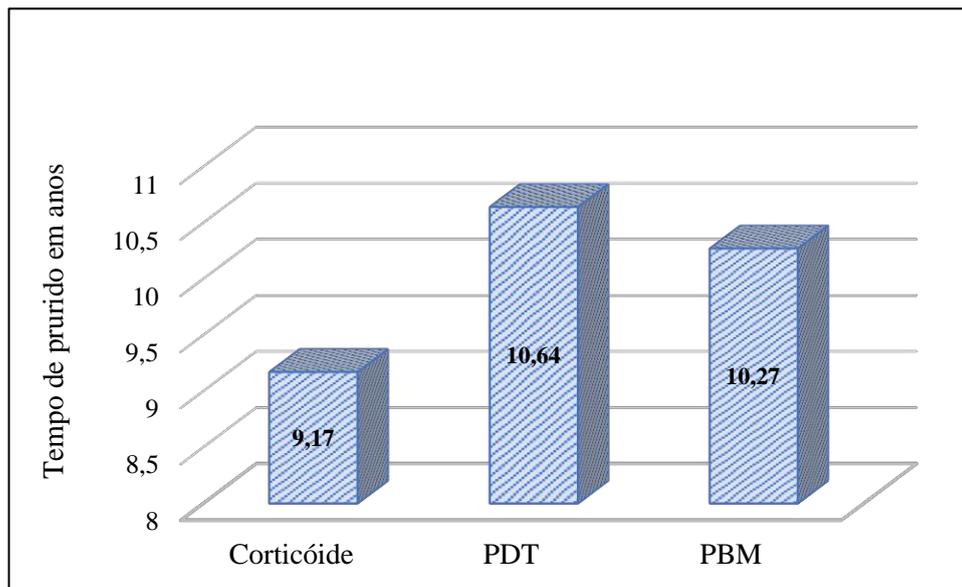
Fonte:CRSM

5.4. PRURIDO

5.4.1. VARIAÇÃO DE TEMPO DE PRURIDO

A variação do tempo de prurido entre os grupos, dado em anos, não revelou diferenças significativas ($p=0,921$). A média do tempo de prurido foi de 10,6 anos, conforme demonstra o Gráfico 4.

Gráfico 4- Variação do tempo de prurido, em anos, entre os grupos tratamento.



Fonte:CRSM

5.4.2. INTENSIDADE DO PRURIDO

A frequência da intensidade do prurido pré e pós tratamento, classificado através da escala visual analógica (EVA), está demonstrada na Tabela 2:

Tabela 2: Intensidade do prurido pré e pós tratamento

EVA	Pré-tratamento				Pós-tratamento			
	Corticóide	PDT	TPBM	total	Corticóide	PDT	TPBM	total
0	3	3	3	9	7	8	6	21
	25,0%	27,3%	27,3%	26,5%	58,3%	72,7%	54,5%	61,8%
1	1	0	1	2	0	0	2	2
	8,3%	0,0%	9,1%	5,9%	0,0%	0,0%	18,2%	5,9%
2	1	0	1	2	2	0	1	3
	8,3%	0,0%	9,1%	5,9%	16,7%	0,0%	9,1%	8,8%
3	1	2	0	3	1	0	0	1
	8,3%	18,2%	0,0%	8,8%	8,3%	0,0%	0,0%	2,9%
4	1	2	0	3	na	na	na	na
	8,3%	18,2%	0,0%	8,8%	na	na	na	na
5	1	1	4	6	1	0	0	1
	8,3%	9,1%	36,4%	17,6%	8,3%	0,0%	0,0%	2,9%
6	2	3	0	5	na	na	na	na
	16,7%	27,3%	0,0%	14,7%	na	na	na	na
7	1	0	0	1	na	na	na	na
	8,3%	0,0%	0,0%	2,9%	na	na	na	na
8	na	na	na	na	1	3	0	4
	na	na	na	na	8,3%	27,3%	0,0%	11,8%
9	1	0	0	1	0	0	1	1
	8,3%	0,0%	0,0%	2,9%	0,0%	0,0%	9,1%	2,9%
10	0	0	2	2	0	0	1	1
	0,0%	0,0%	18,2%	5,9%	0,0%	0,0%	9,1%	2,9%
Total	12	11	11	34	12	11	11	34
	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Fonte: CRSM

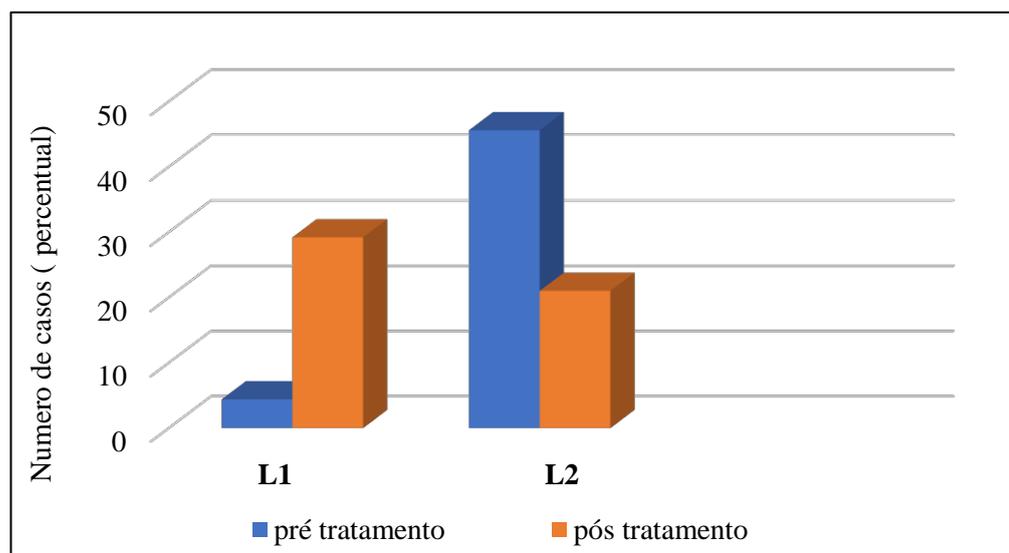
O **pré tratamento**, houve ausência de prurido em **26,5%** das pacientes, enquanto que em 20,6% apresentaram prurido leve (correspondente, ao EVA de 1 a 3), 41,1% prurido moderado (EVA 4 a 6) e 11,7% com prurido intenso (EVA 7 a 10).

Na avaliação dos **pós tratamento** foi observado a ausência de prurido em **61,8%** das pacientes, enquanto que em 17,6% apresentavam prurido leve (correspondente, ao EVA de 1 a 3), 2,9% prurido moderado (EVA 4-6) e 17,6% com prurido intenso (EVA 7 a 10).

5.5. HISTOLOGIA

A análise comparativa avaliando a Histologia pré e pós tratamentos está representada na Gráfico 5.

Gráfico 5 – Histologia pré e pós tratamentos.



Fonte:CRSM

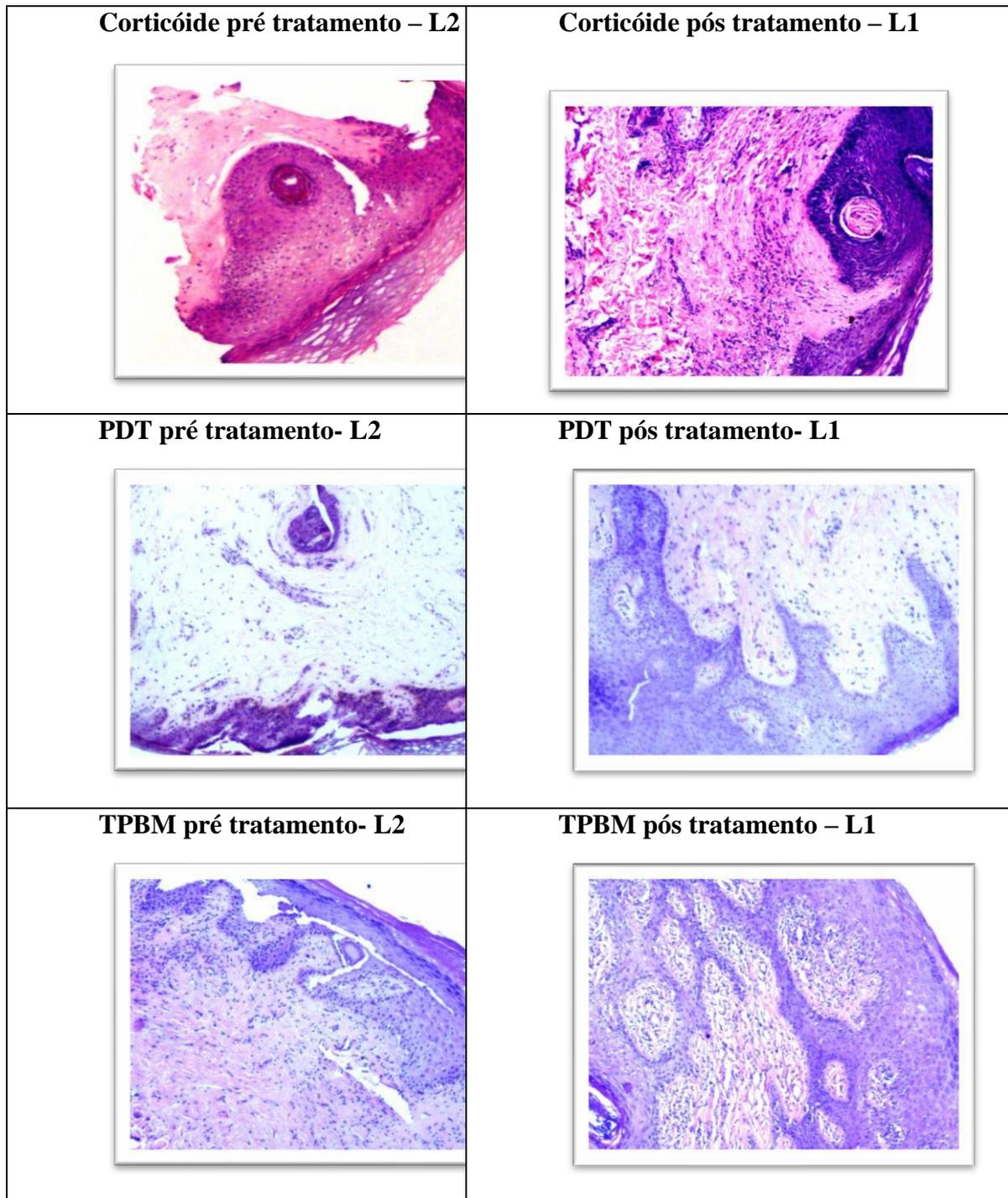
A análise mostrou que no grupo corticoide houve diferença significativa na histologia ($p=0,001$), pelo teste qui-quadrado, sendo que a frequência de padrão do L1 das pacientes se elevou de 4,2% (pré tratamento) para 37,5% (pós tratamento).

No grupo PDT, de forma similar ($p=0,056$), existiu incremento da frequência de L1, de 4,5% (pré tratamento) para 22,7% (pós tratamento).

O grupo de TPBM também denotou modificação histológica significativa ($p=0,025$), onde a frequência de L1 aumentou de 4,5 (pré tratamento) para 27,3% (pós tratamento).

A histologia evidenciou diferença significativa pós tratamento em todos os grupos estudados, modificando o padrão de L2 para L1, conforme ilustra a Figura 5.

Figura 5 –Histopatologia por grupos pré e pós tratamento. (40x)



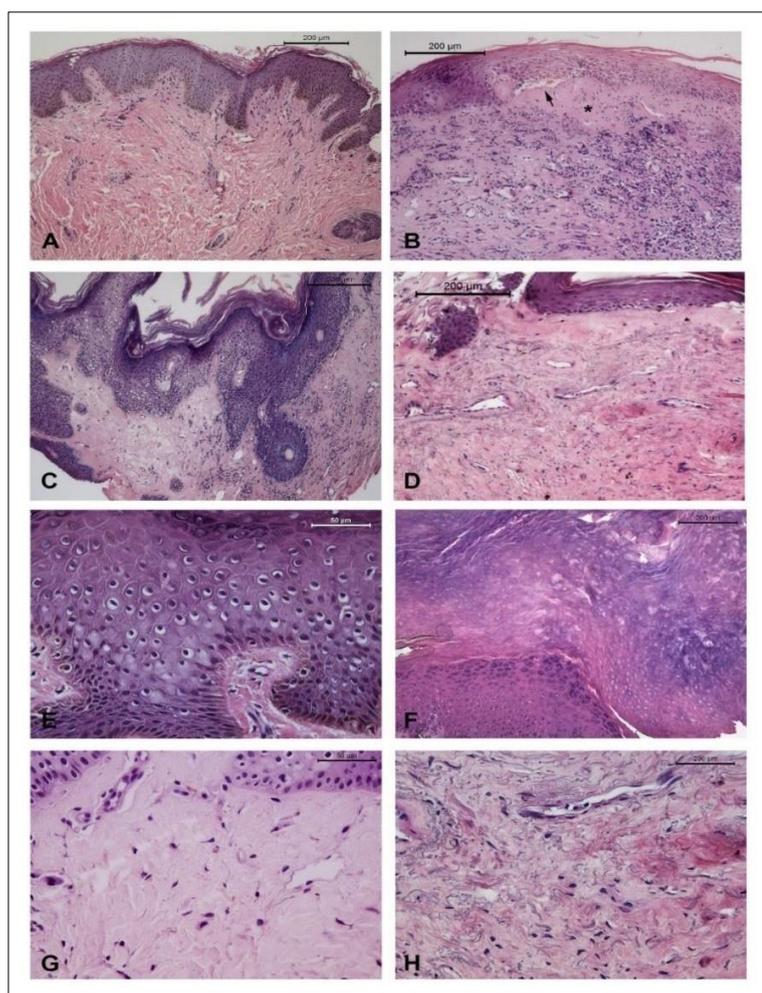
Fonte: Departamento de Patologia CRSM

5.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA EPITELIAL

5.6.1 Degeneração Hidrópica:

Nas vulvas com LEV foi verificada grande quantidade de queratinócitos exibindo degeneração hidrópica, por vezes provocando necrose epitelial em áreas isoladas (Figuras 6

Figura 6: Cortes histológicos representativos da Histopatologia do líquen escleroso vulvar (LE) (HE, aumentos originais de 100X e 400X)



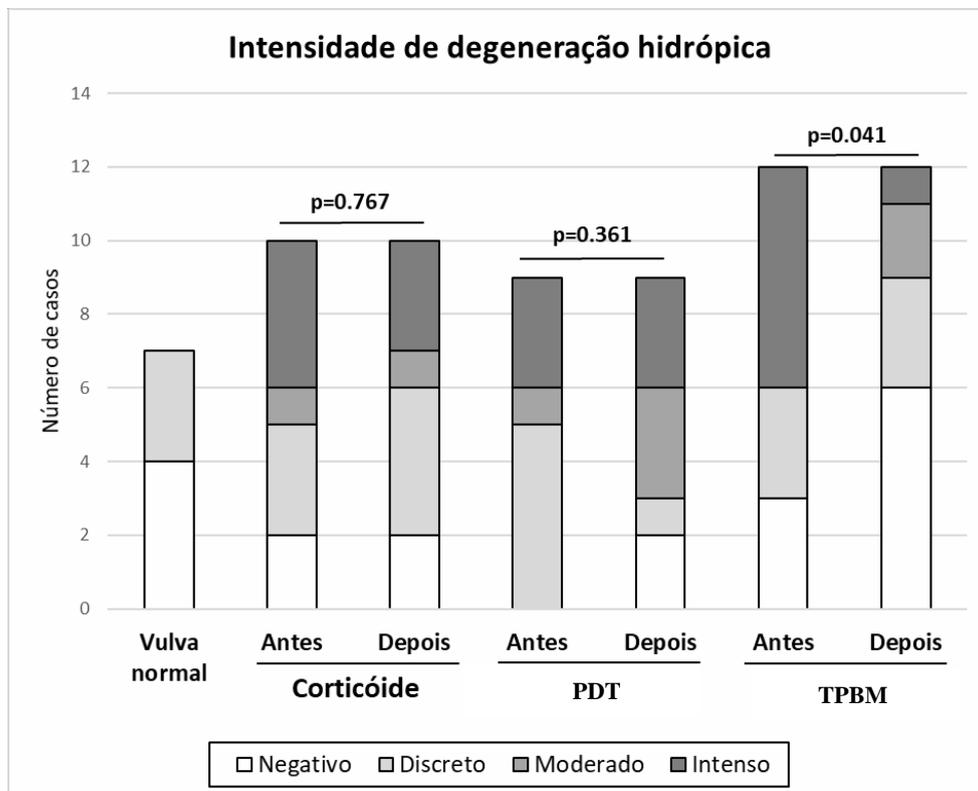
Fonte: Departamento de Estomatologia da USP

A: Vulva normal, exibindo epiderme com várias camadas de células, camada fina de queratina e prolongamentos epiteliais em direção à derme. Esta é constituída por tecido conjuntivo denso não-modelado e rede vascular delicada próxima à epiderme. B: Aspecto histológico típico do LE, exibindo intensa degeneração hidrópica nas células epiteliais, fenda subepitelial (seta) e intenso infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo. Hialinização colagênica também se faz presente (*). C: Aspecto verruciforme do LE, com intensa acantose

e degeneração hidrópica, hiperqueratose, moderada hialinização colagênica no conjuntivo e moderado infiltrado inflamatório difuso predominantemente mononuclear. D: LE exibindo atrofia epitelial e intensa hialinização colagênica, com degeneração basofílica de fibras elásticas na derme. Não se observa infiltrado inflamatório nesse caso. E: Detalhe das células epiteliais, exibindo degeneração vacuolar hidrópica. F: Intensa hiperqueratose e acantose em outro caso de LE. G: Detalhe da matriz colagênica, evidenciando perda da nitidez da rede das fibras e hialinização, com reduzida celularidade. H: Detalhe do caso de LE apresentado em C, em que se notam fibras elásticas basofílicas em meio a hialinização colagênica, com redução da celularidade e da rede vascular.

Após os tratamentos, a TPBM reduziu significativamente a intensidade de degeneração hidrópica enquanto os tratamentos com Corticoide e PDT não provocaram diferenças significativas, conforme Gráfico 6.

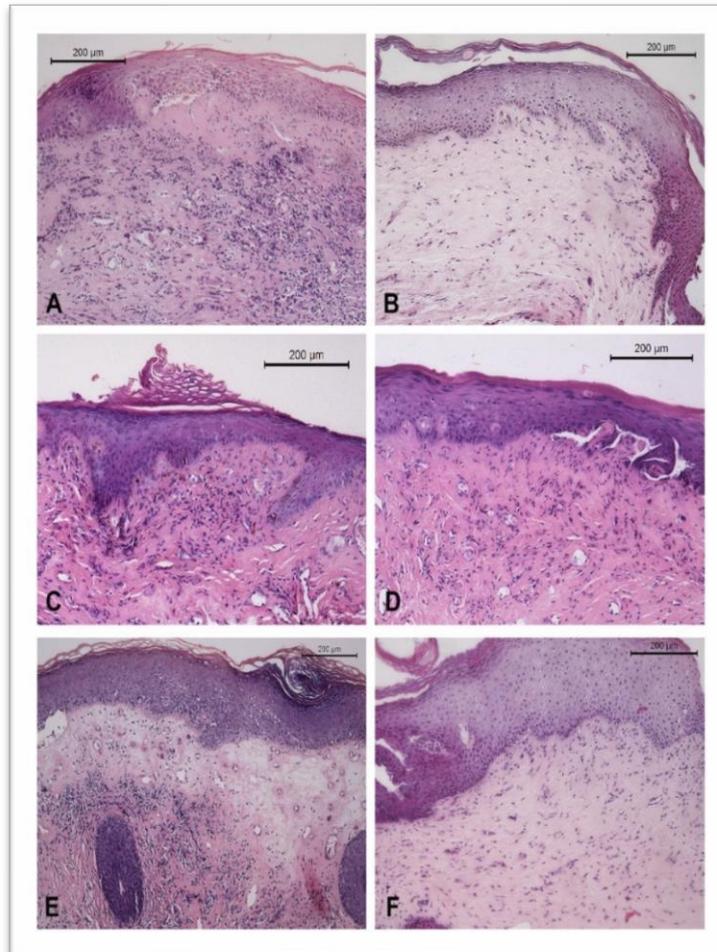
Gráfico 6 – Frequência de casos com as marcações negativa, discreta, moderada e intensa para degeneração hidrópica nas vulvas normais, antes e depois dos tratamentos.



Fonte: Departamento de Estomatologia da USP

Os efeitos dos tratamentos no LEV são observados na Figura 7.

Figura 7: Cortes histológicos representativos do efeito dos tratamentos sobre a vulva (HE, aumento original 100X).



Fonte: Departamento de Estomatologia da USP

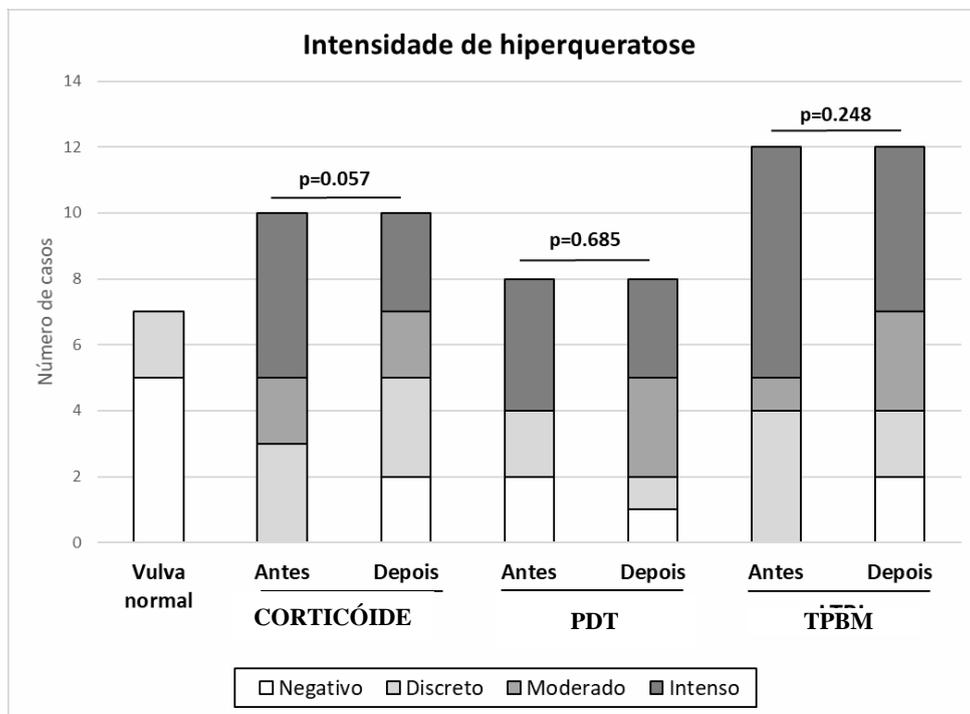
A: Pele de vulva exibindo degeneração hidrópica nas células epiteliais, fenda subepitelial e intenso infiltrado inflamatório na derme, com área subepitelial de hialinização colagênica. B: Mesmo caso após tratamento com corticoide, em que se nota remodelamento epitelial, redução do infiltrado inflamatório; hialinização colagênica ainda se faz presente. C: Vulva exibindo líquen escleroso com atrofia epitelial, perda de nitidez da camada basal e moderado infiltrado inflamatório na derme. D: Mesmo caso após tratamento com PDT, em que se nota intenso remodelamento epitelial, com hiper Cromatismo da camada basal, e remodelamento da matriz colagênica, com celularidade compatível com fibroblastos. Infiltrado inflamatório é discreto após o tratamento. E: Pele de vulva exibindo epitélio com intensa acantose, degeneração hidrópica e área focal de necrose epitelial, edema na derme subepitelial e moderado infiltrado inflamatório. F: Após o tratamento com LTBI, com redução da

degeneração hidrópica, indução de intensa acantose, ausência de infiltrado inflamatório na derme e remodelamento da matriz de colágeno, porém sem distinção das fibras da matriz extracelular e tendência a hialinização das fibras colágenas.

5.6.2 Hiperqueratose:

Nos casos de LEV, a hiperqueratose foi de moderada a intensa (Gráfico 7). Não houve alterações significativas após os tratamentos, apesar de haver uma tendência de o corticoide diminuir a hiperqueratose.

Gráfico 7– Frequência de casos com as marcações negativa, discreta, moderada e intensa para hiperqueratose nas vulvas normais, antes e depois dos tratamentos.



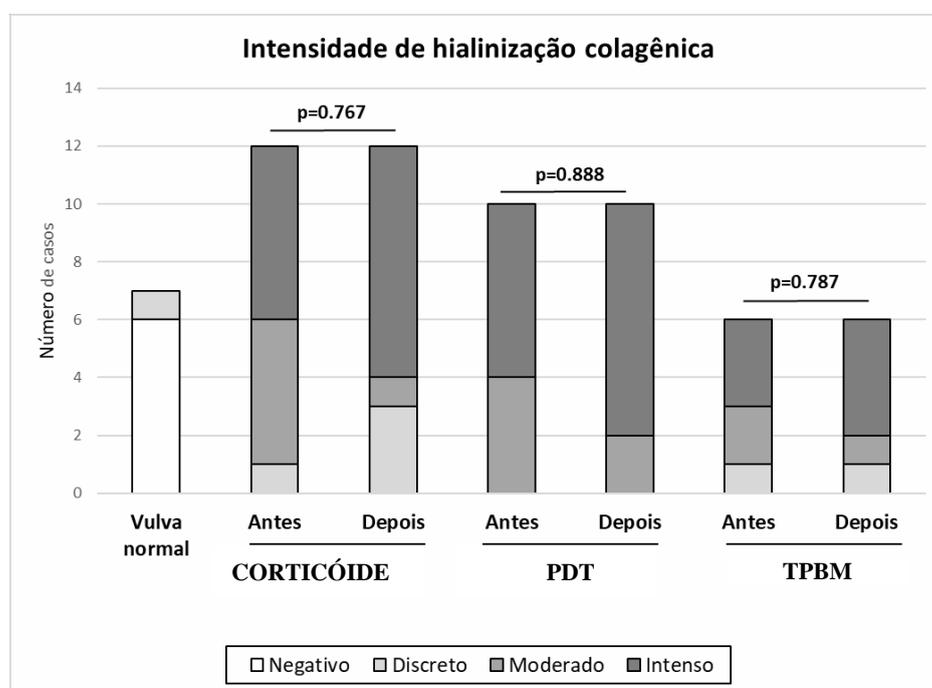
Fonte: Departamento de Estomatologia da USP

5.6.3 Hialinização do colágeno

No LEV, na grande maioria dos casos, moderada a intensa hialinização colagênica era observada no conjuntivo próximo ao epitélio.

Na comparação entre os períodos antes e depois dos tratamentos, não houve diferenças significativas entre nenhum grupo, conforme demonstrado no Gráfico 8. Houve certa tendência de o corticoide diminuir e a LTBI aumentar a intensidade de hialinização de fibras colágenas.

Gráfico 8– Frequência de casos com as marcações negativa, discreta, moderada e intensa para hialinização de fibras colágenas nas vulvas normais, antes e depois dos tratamentos.



Fonte: Departamento de Estomatologia da USP

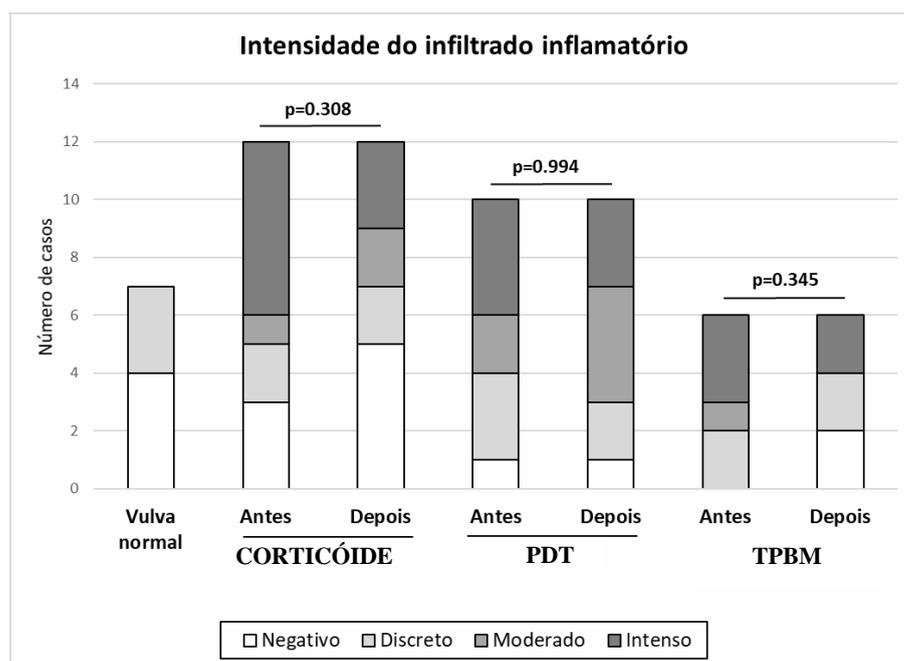
5.7. ANÁLISE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

5.7.1. INTENSIDADE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

Nas vulvas normais, não foi encontrado infiltrado inflamatório na maioria dos casos. No LE o infiltrado inflamatório foi de moderado a intenso na maioria dos casos, sendo difuso, predominantemente, supra epitelial e composto por células mononucleares.

Na comparação entre os períodos pré e pós tratamentos, não houve diferenças significativas (Gráfico 9). Todavia, ocorreu uma tendência do corticoide e da TPBM diminuírem a intensidade do infiltrado inflamatório, fato não observado na PDT. Entre as terapias, também não houve diferenças significativas.

Gráfico 9– Frequência de casos com as marcações negativa, discreta, moderada e intensa o infiltrado inflamatório nas vulvas normais, antes e depois dos tratamentos.

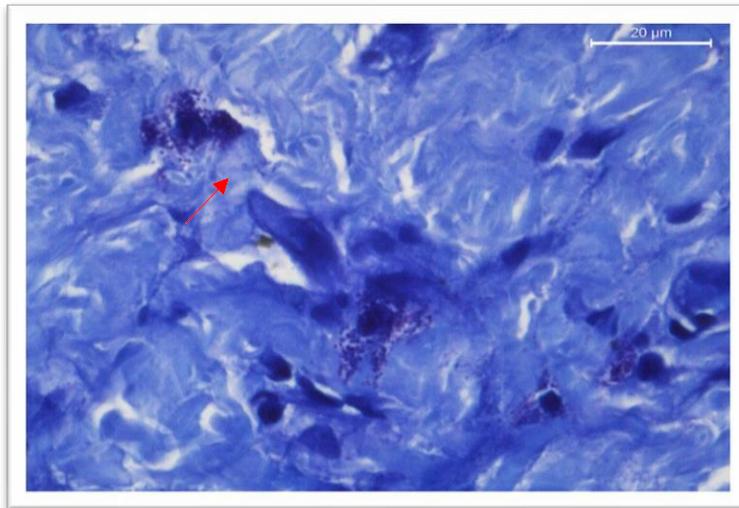


5.7.2. QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS

Nas vulvas normais, a mediana de mastócitos por campo foi de 25.7 células (variação de 18 a 34 células), enquanto nas vulvas com líquen escleroso foi de 31.5 células (variação de 5 a 98 células). Os mastócitos encontravam-se, geralmente, dispersos por todo o tecido conjuntivo, exibindo, frequentemente, a degranulação (Figura 8).

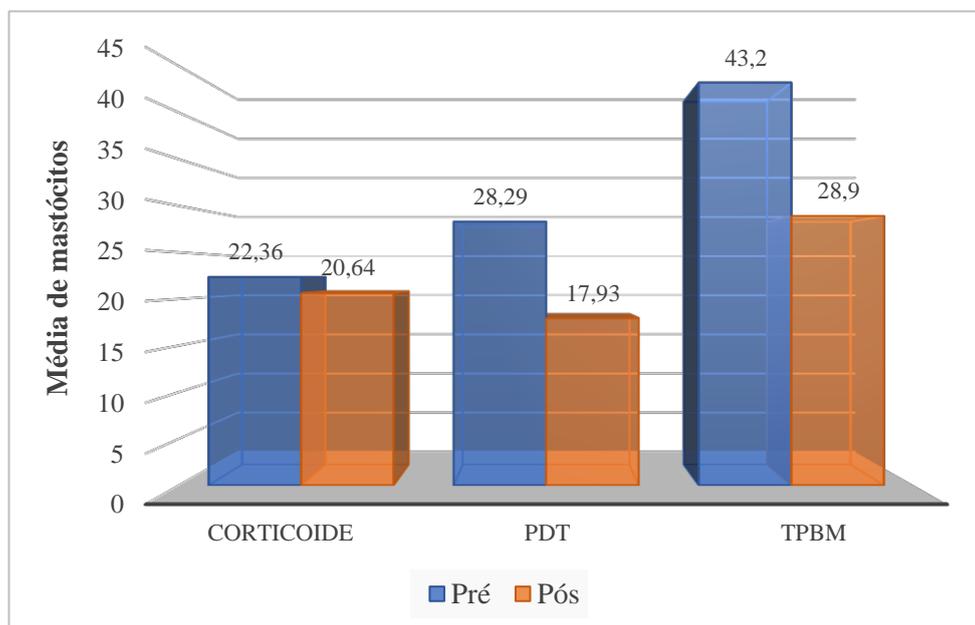
Comparando-se pré e pós terapias, em nenhum dos grupos ocorreu diferenças significativas. Entretanto, observou-se que houve tendência mais evidente na diminuição da média de mastócitos no grupo PDT, seguido do GC e TPBM, conforme Gráfico10.

Figura 8- Representação dos mastócitos com presença de degranulação.



Fonte: Departamento de Estomatologia da USP

Gráfico 10 - Análise comparativa pré e pós tratamentos da média de mastócitos pelo teste de associação linear.



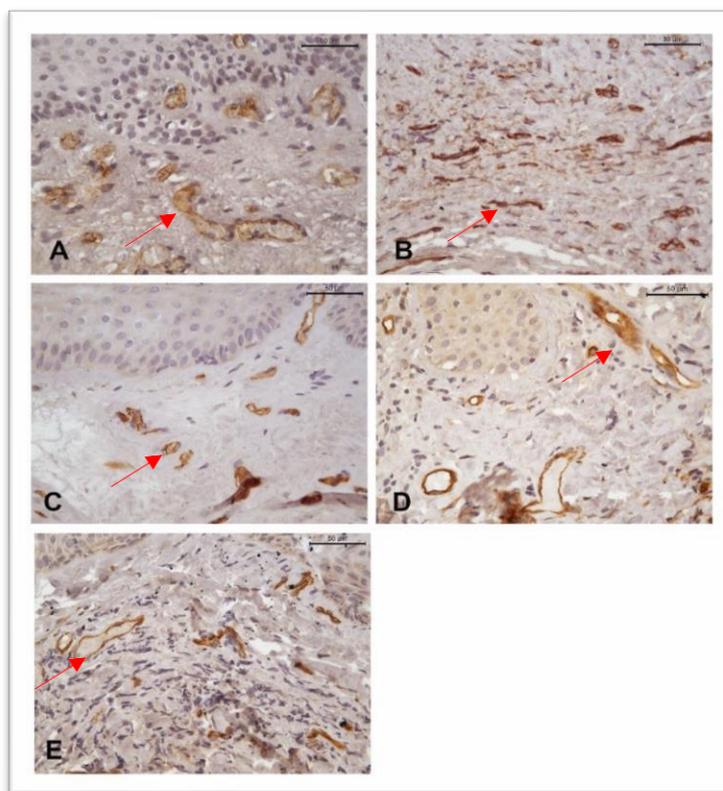
Fonte: CRSM.

5.7.3. ANÁLISE DA DENSIDADE DE VASOS DE PEQUENO CALIBRE(CD34).

Os casos de líquen escleroso exibiram menor densidade de vasos positivos para CD34 do que os casos de vulva normal ($p=0.001$). Os vasos nas vulvas normais, em geral, eram de pequeno calibre e estavam, por vezes, congestionados, com luz ampla. No LEV notavam-se poucos vasos, dispersos em uma matriz colagênica densa e sem remodelamento, conforme encontrado na Figura 9.

Comparando-se os períodos pré e pós em cada tratamento, não houve diferenças significativas entre os grupos (Tabela 3).

Figura 9 – Imagens representativas de campos histológicos exibindo estruturas vasculares positivas para CD34 (Estreptavidina-biotina, aumento original 400X).



Fonte: Departamento de Estomatologia da USP.

A: Vulva normal, com vasos congestionados e amplos. B: Vulva com líquen escleroso, com poucos vasos positivos para CD34 e matriz colagênica densa e sem remodelamento. C: Líquen escleroso tratado com corticoide, com vasos sanguíneos menores, porém apresentando luz ampla D: Líquen escleroso tratado com PDT, menor número de vasos com luz de diâmetro reduzido E: Líquen escleroso tratado com TPBM, mostrando aumento do número de vasos com luz de pequeno diâmetro.

Tabela 3- Análise comparativa pré e pós tratamentos da média de CD34.

CD 34 (Média)	Antes	Após	p-valor
Corticoide	3,98	3,19	0,400
PDT	5,00	3,25	0,866
TPBM	4,33	4,78	0,825

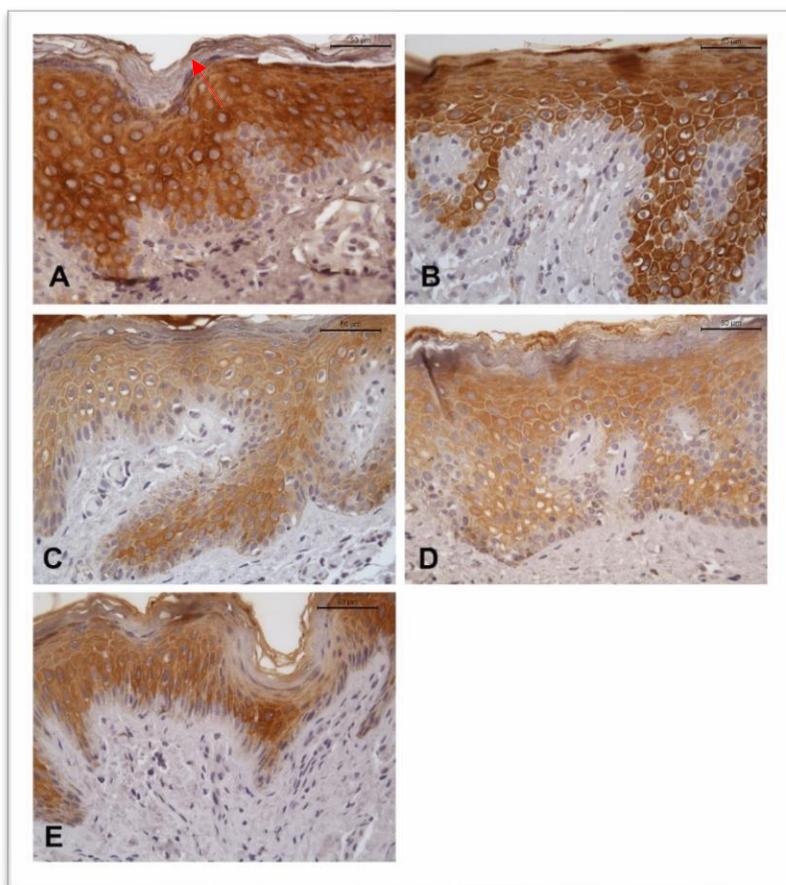
Fonte: CRSM

58 ANÁLISE DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À ESTRATIFICAÇÃO EPITELIAL

5.8.1. CITOQUERATINA 10

Nas vulvas com características de normalidade, a Ck10 foi expressa nas camadas supra basais e superficiais do epitélio, com intensidade homogênea variando de moderada (50% dos casos) a intensa (50%). Nos tecidos exibindo LEV antes dos tratamentos, em alguns casos (28.1) exibiram marcação discreta. As demais intensidades foram semelhantes à observada na vulva normal, representada pela Figura 10.

Figura 10 – Imagens representativas da expressão imuno-histoquímica da citoqueratina 10 (estreptavidina-biotina, aumento original de 400X).



:

Fonte: Departamento de Estomatologia da USP

A: Vulva normal, exibindo marcação nas camadas suprabasais e superficiais, com intensidade de moderada a intensa. B: Vulva com líquen escleroso, na qual a intensidade da marcação foi mais discreta. C: Grupo Corticóide pós tratamento, marcação discreta nas camadas mais superficiais. D: Grupo PDT pós tratamento, com padrão semelhante ao corticóide. E: TPBM pós tratamento, também sem diferenças nos padrões de marcação.

A Tabela 4 demonstra que não aconteceu diferenças significativas na comparação da CK 10 antes e depois, em cada grupo. As marcações mantiveram-se homogêneas, em todas as camadas do epitélio acima da basal e com intensidade, em geral, moderada.

Tabela 4- Expressão da CK10 pré e pós tratamento.

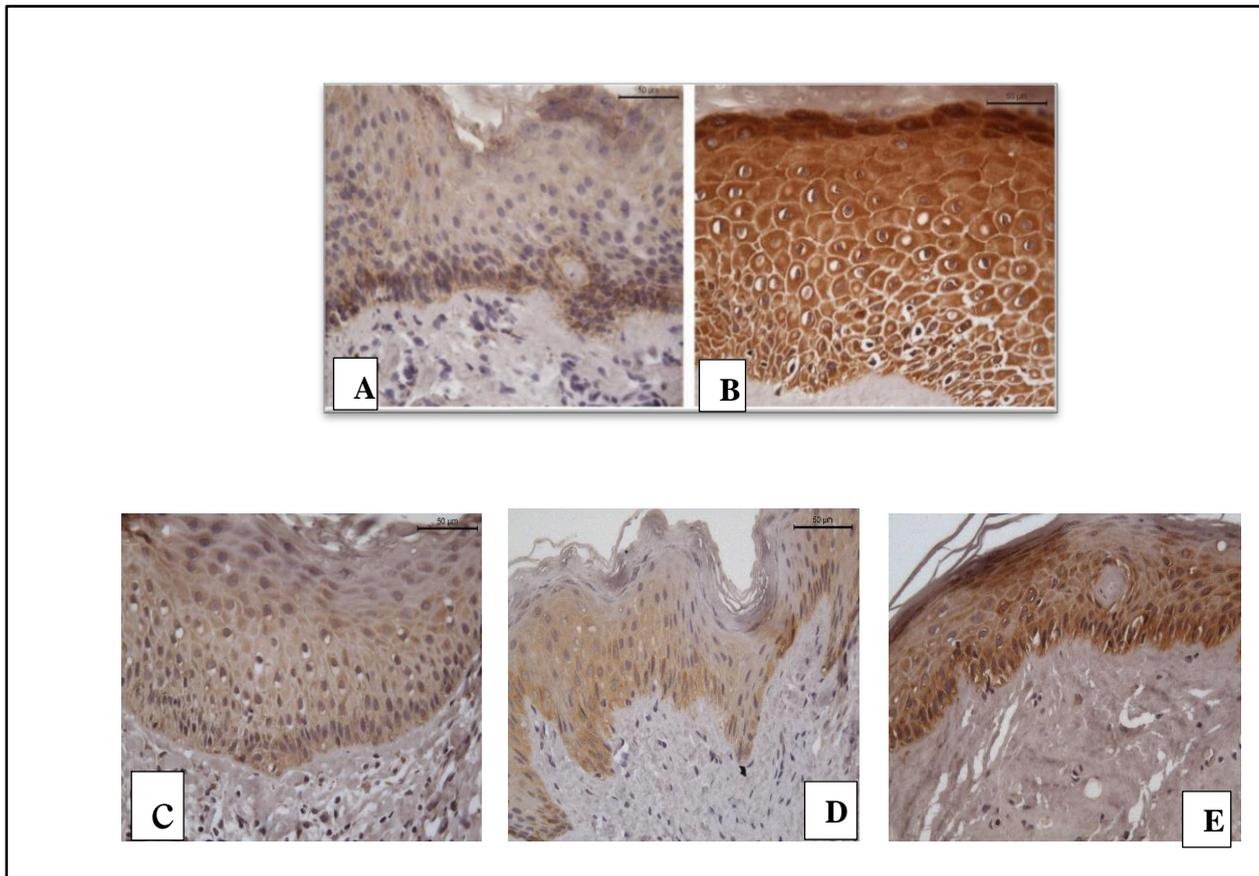
	Corticoide			PDT			TPBM		
CK10 (%)	Antes	Após	p-valor	Antes	Após	p-valor	Antes	Após	p-valor
Discreto	41,7	14,3	0,492	20	12,5	0,425	12,5	22,2	0,47
Moderado	16,7	42,9		40	62,5		37,5	44,4	
Intenso	41,7	42,9		40	25		50	33,3	

Fonte: CRSM

5.8.2. Citoqueratina 14

Nas vulvas normais, a expressão da Ck14 foi discreta e homogênea na camada basal e para basal do epitélio. Nos casos de LEV antes dos tratamentos, 67.4% dos casos exibiu a Ck14 em todas as camadas epiteliais. Comparando-se os períodos antes e depois dos tratamentos, não houve diferenças significativas entre as frequências de casos exibindo a expressão de Ck14 em todas as camadas epiteliais. Contudo, nota-se frequência alta de casos exibindo intensa marcação de Ck14 pós tratamento, principalmente, com PDT, fato observado com menos frequência nos demais tratamentos (Figura 11).

Figura 11 - Imagens representativas da expressão imuno-histoquímica da citoqueratina 14 (*estreptavidina-biotina, aumento original de 400X*).



Fonte: Departamento de Estomatologia da USP

A: Vulva normal exibindo marcação discreta nas camadas basais e parabasais, B: No LEV a intensidade da marcação foi intensa e esteve presente em todo o epitélio na maioria dos casos, C: Grupo Corticóide – pós tratamento sem modificações nos padrões de marcação, D: Grupo PDT, sem diferenças nos padrões de marcação, E: Grupo TPBM, também sem diferenças nos padrões de marcação.

Na comparação pré e pós dos tratamentos, a intensidade de marcação foi semelhante, sem diferenças estatísticas significativas. Destaca-se que, em 33,3% e 50,0% dos casos tratados com TPBM e PDT, respectivamente, houve aumento da expressão de Ck14 (marcação intensa) em relação ao período que antecedeu o tratamento. Comparando-se os tratamentos entre si, não houve diferenças significativas, todavia, nota-se uma mediana maior de intensidade imunohistoquímica de Ck14 para o grupo PDT em relação aos demais tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5- Teste de associação linear mostrando imunomarcação da CK14 após os tratamentos.

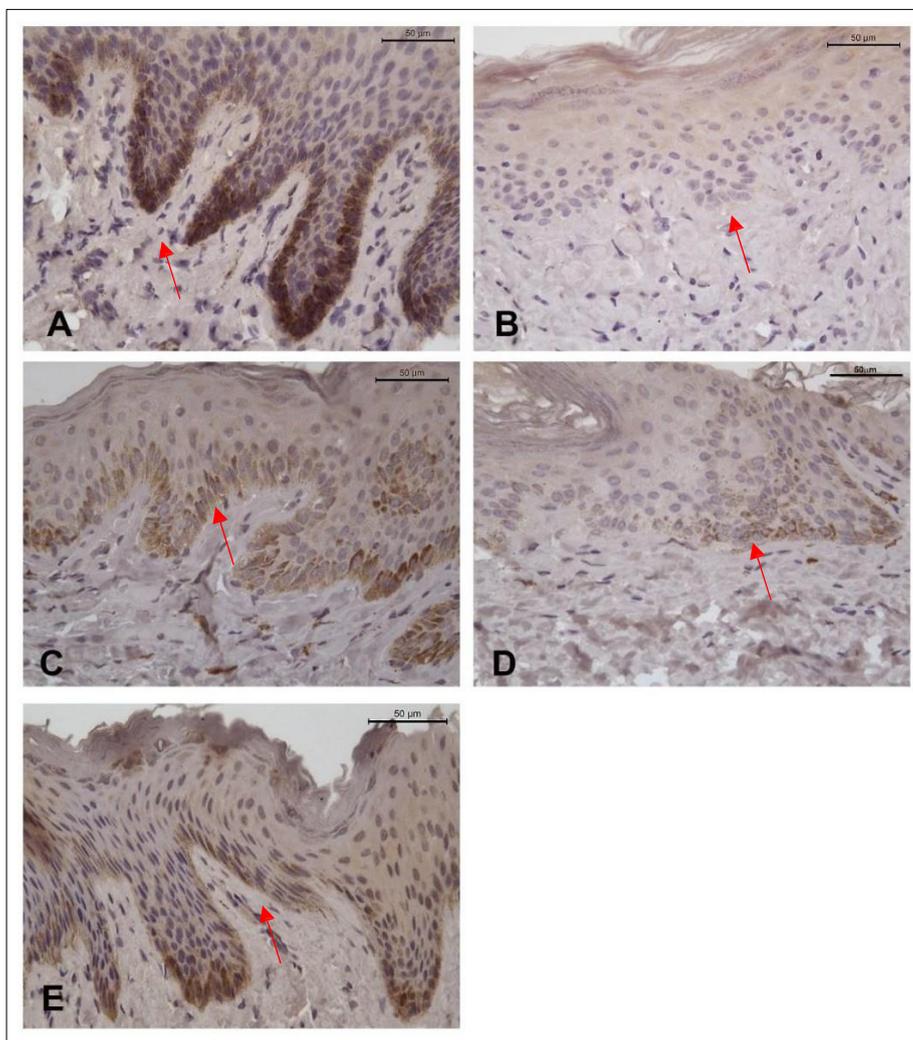
CK14(%)	Corticoide			PDT			TPBM		
	Antes	Após	p-valor	Antes	Após	p-valor	Antes	Após	p-valor
Ausente	10	0		9,1	0		10	0	
Discreto	40	28,6	0,724	36,4	37,5	0,174	40	33,3	0,212
Moderado	20	57,1		45,5	12,5		40	33,3	
Intenso	30	14,3		9,1	50		10	33,3	

Fonte: Departamento de Estomatologia da USP

5.8.3. LAMININA

Nas vulvas normais, a expressão da laminina foi intensa em 60%, moderada em 20% e negativa em 20% casos. Foi observada expressão contínua e homogênea na interface da camada basal do epitélio e o tecido conjuntivo. Nos casos de LEV antes dos tratamentos, 65.5% dos casos exibiram expressão negativa e 34.5%, fraca. Nenhum caso exibiu expressão moderada ou intensa. As lesões de LEV não expressam laminina (Figura 12).

Figura 12 - Imagens representativas da expressão imuno-histoquímica da laminina (estreptavidina-biotina, aumento original de 400X).



Fonte: Departamento de Estomatologia da USP.

A: Vulva normal exibindo marcação intensa na interface entre a camada basal e o tecido conjuntivo; B: líquen escleroso exibindo expressão da laminina ausente ou fraca. C: Grupo Corticoide - nota-se expressão moderada a intensa da laminina na maioria das situações. D: Grupo PDT – expressão fraca e descontínua da laminina. E: Grupo PBM– expressão discreta da laminina.

Os tratamentos geraram frequência alta de casos em que a expressão da laminina foi incrementada: no grupo PDT com 87,5%, Corticoide- 85,8% e TPBM- 75% casos. Houve diferença significativa na imunomarcção de laminina após os tratamentos, de acordo com o teste de associação linear (Tabela 6).

Tabela 6- Teste de associação linear mostrando que houve diferença estatística na imunomarcção da laminina após os tratamentos.

Laminina (%)	Corticoide			PDT			LBI		
	Antes	Após	p-valor	Antes	Após	p-valor	Antes	Após	p-valor
Ausente	40	14,3	0,019	70	12,5	0,018	70	25	0,098
Discreto	60	28,6		30	87,5		0	37,5	
Moderado	0	28,6		0	0		20	12,5	
Intenso	0	28,6		0	0		10	25	

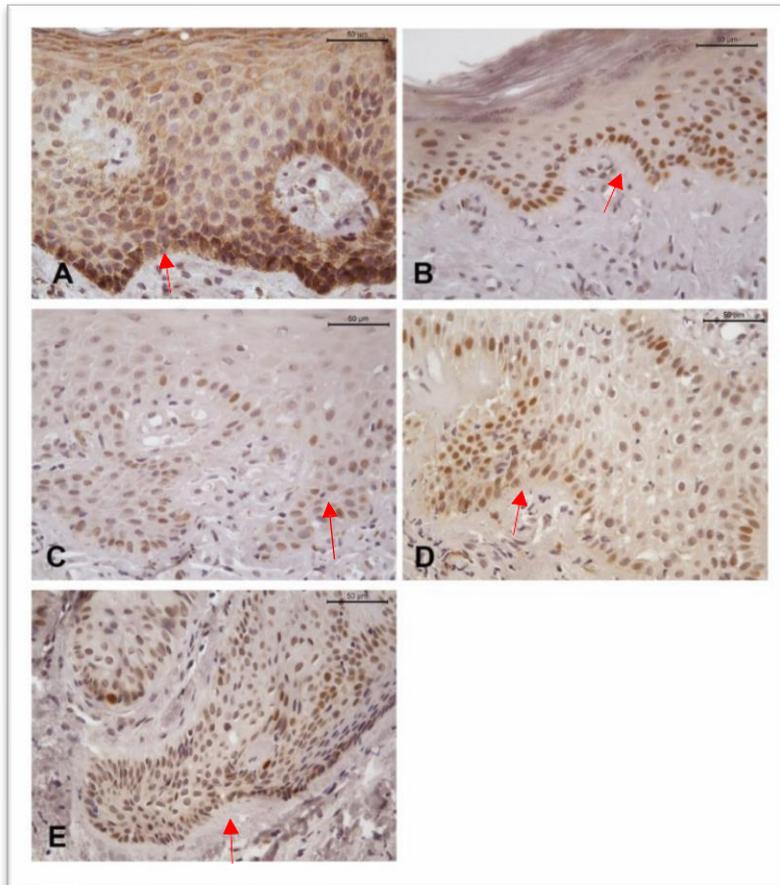
Fonte: Departamento de Estomatologia da USP.

5.9. ANÁLISE DE MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR:

5.9.1. P53

Na vulva normal, nenhum caso exibiu células positivas para P53 no núcleo. Todos os casos expressaram intensa positividade no citoplasma, principalmente, nas células da camada basal. Os casos de LEV exibiram frequência, significativamente, maior de células p53 positivas no núcleo em comparação às vulvas normais. As células positivas eram predominantemente basais e supra basais, com expressão nuclear homogênea e de intensidade variada de marcação (Figura 13).

Figura 13– Imagens representativas da expressão de p53 no epitélio (Estreptavidina-biotina, aumento original 400X).

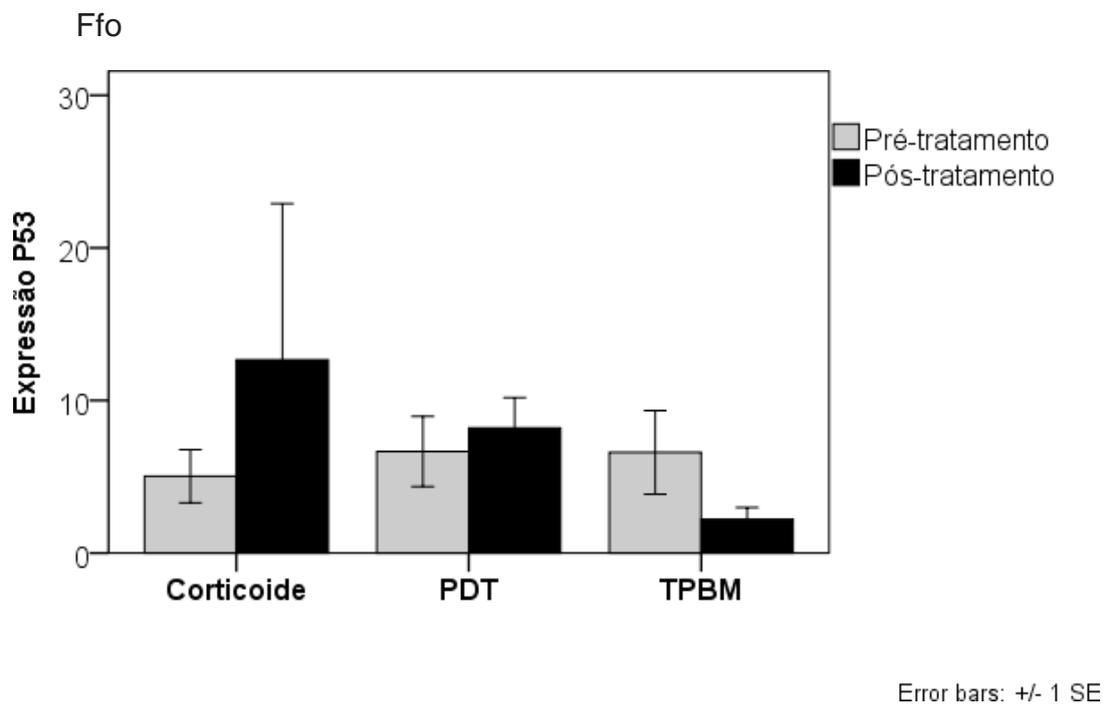


Fonte: Departamento de Estomatologia da USP.

A: Vulva normal, exibindo somente marcação intensa no citoplasma das células basais.
B: Vulva com líquen escleroso, exibindo maior frequência de células p53 positivas no núcleo.
C: Vulva com líquen tratada com corticosteroide, exibindo menor quantidade de células p53 positivas no núcleo. D: Vulva tratada com PDT, com maior frequência de células positivas para p53. E: Vulva tratada com PBM, com algumas células exibindo positividade para p53 tanto no núcleo quanto no citoplasma.

Na comparação dos casos pré e pós tratamentos, em nenhum grupo houve diferenças significativas. Somente o grupo PDT demonstrou certa tendência em aumento da porcentagem de células P53 positivas, porém a diferença em relação ao período antes do tratamento não foi significativa (Gráfico 11).

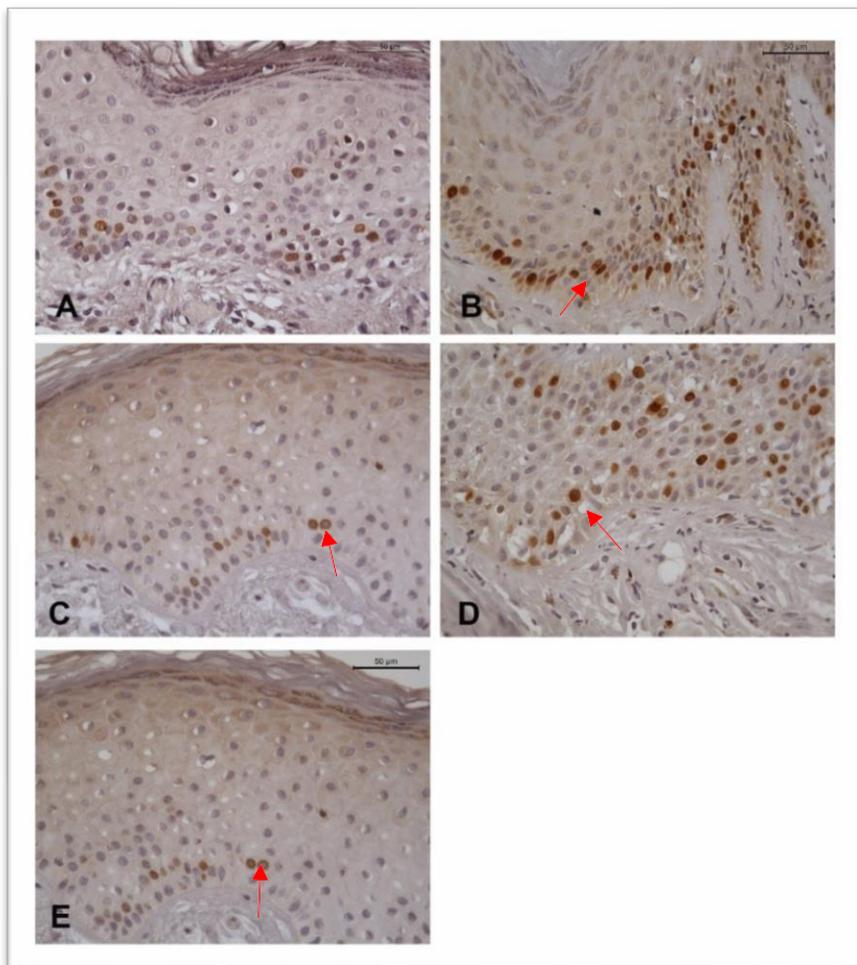
Gráfico 11- Imunomarcção da P53: Análise de expressão de amostras independentes antes e após cada tratamento.



5.9.2. Ki 67

Considerando-se todas as vulvas com líquen escleroso antes do tratamento e comparando-as com vulvas normais, as com líquen expressaram maior frequência de células positivas para Ki67. A marcação de Ki67 foi homogênea e nuclear, com variações na intensidade de marcação (Figura 14).

Figura 14 – Imagens representativas da expressão de Ki67 no epitélio (Estreptavidina-biotina, aumento original 400X).



Fonte: Departamento de Estomatologia da USP.

A: Vulva normal. B: Vulva com líquen escleroso, exibindo maior frequência de células Ki67 positivas. C: Vulva com líquen tratada com corticosteroide, exibindo redução da frequência de células Ki67 positivas. D: Vulva tratada com PDT, sem alteração significativa da frequência de células Ki67 positivas. E: Vulva tratada com TPBM, exibindo significativa redução da expressão desse marcador.

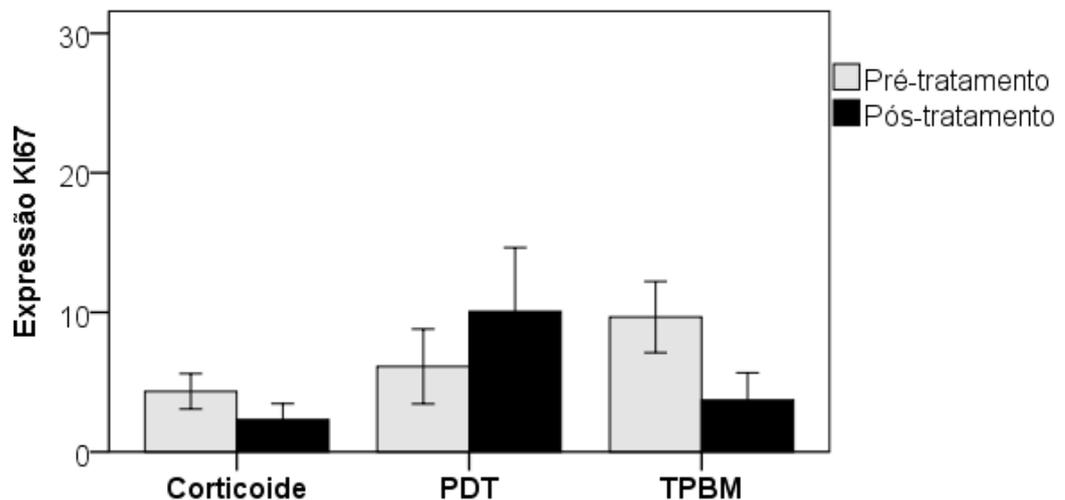
Comparando-se as vulvas com líquen pré e pós tratamentos, o grupo Corticoide reduziu, significativamente, a frequência de Ki 67 ($p=0.037$), assim como o grupo TPBM, porém esse sem diferença significante ($p=0,200$). O grupo PDT aumentou a expressão desse marcador, embora sem diferença significante ($p=0,234$) (Tabela 7). O Gráfico 12 demonstra a imunomarcação da Ki 67 pré e pós tratamento por grupos.

Tabela 7- Imunomarcação do Ki 67 pré e pós tratamentos.

Ki 67 (Média)	Antes	Após	p-valor
Corticoide	3,84	1,3	0,037
PDT	4,31	10,06	0,234
PBM	9,27	3,71	0,200

Fonte: Departamento de Estomatologia da USP.

Gráfico 12 – Imunomarcação de Ki 67 pré e pós tratamento: Análise de expressão de amostras independentes antes e após cada tratamento.



Error bars: +/- 1 SE

6. RECORRÊNCIAS

6.1. MÉDIA DE DIAS DE RECORRÊNCIA POR GRUPO DE TRATAMENTO

Observou-se que o grupo com menor número de recorrências, em seguimento de 18 meses, foi o de PDT, onde 7 pacientes mantiveram a resposta clínica (Tabela 8). As recorrências mais precoces foram com 7 dias pós tratamento nos grupos PDT e TPBM. A recorrência mais tardia ocorreu aos 330 dias pós tratamento no grupo de TPBM. A média de dias de recorrência está apresentada na Tabela 9.

Tabela 8- Número de casos de recorrência pós tratamentos

Grupos		Casos					
		Válidos		Não-avaliados		Total	
		N	Percentual	N	Percentual	N	Percentual
Recorrência (dias)	Corticoide	6	50,0%	6	50,0%	12	100,0%
	PDT	4	36,4%	7	63,6%	11	100,0%
	TPBM	7	63,6%	4	36,4%	11	100,0%

Fonte: CRSM

Tabela 9- Média de dias de recorrência pós tratamentos

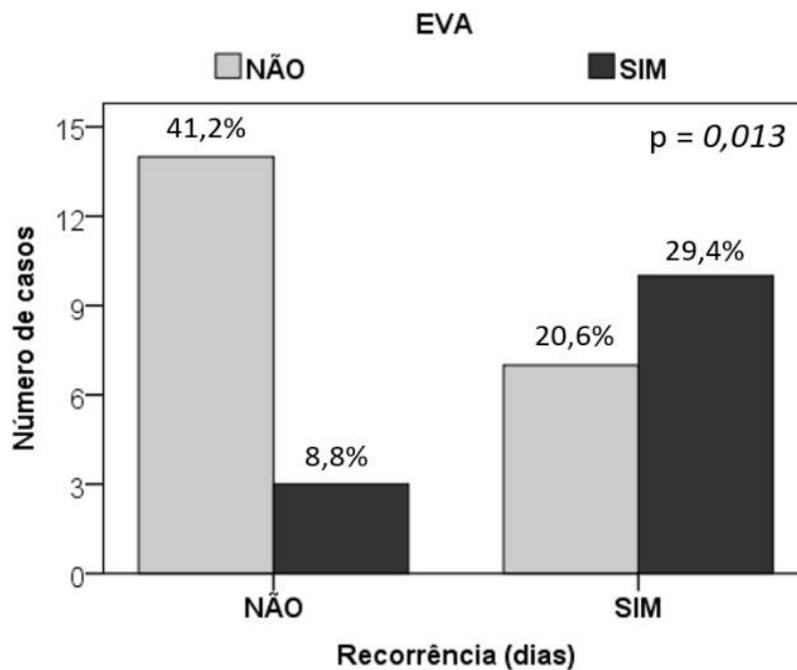
Valores	Corticoide	PDT	TPBM
Média	96,83	113,50	114,29
Erro-padrão	38,822	42,455	43,453
Mediana	72,50	118,50	101,00
Mínimo	15	7	7
Máximo	270	210	330

Fonte: CRSM.

6.2. RECORRÊNCIA E INTENSIDADE DE PRURIDO: SIM/NÃO

Há diferenças estatísticas significativas após análise de associação entre recorrência e prurido, independentemente do tipo de tratamento. Das 50% mulheres que não recorreram, 41,2% não relataram prurido ($p=0,013$), de acordo com o teste do Qui-quadrado. Por outro lado, das 50% dos casos de recorrência, 29,4% denotaram prurido ao diagnóstico (Gráfico 13).

Gráfico 13: Avaliação de recorrência associada à intensidade de prurido.



Fonte:CRSM.

6.3. RECORRÊNCIA, FOTOTIPO DE PELE E INTENSIDADE DE PRURIDO

O teste de associação linear aponta tendência de recorrência em pele fototipo IV com prurido presente ($p=0,196$), como observado na Tabela 10.

Tabela 10- Teste de associação linear avaliando fototipo de pele, intensidade de prurido e recorrência.

Pele (Fitzpatrick)		EVA			p-valor
		NÃO	SIM	TOTAL	
II e III	N	14	10	24	0,196
	% Total	41,2%	41,7%	100,0%	
IV	N	2	3	5	
	% Total	5,9%	8,8%	14,7%	
V e VI	N	5	0	5	
	% Total	14,7%	0,0%	14,7%	
TOTAL	N	21	13	34	
	% Total	61,8%	38,2%	100,0%	

Fonte:CRSM

6.4. RECORRÊNCIA E LAMININA

Houve diferença estatística significativa na imunomarcção de laminina pós tratamento com PDT, comparado aos demais tratamentos, conforme observado na tabela 11. Após PDT a totalidade dos casos apresentaram menor expressão significativa de laminina ($p=0,049$), comparado à corticoide (42,9%) e TPBM (62,5%), como demonstrado na figura 15.

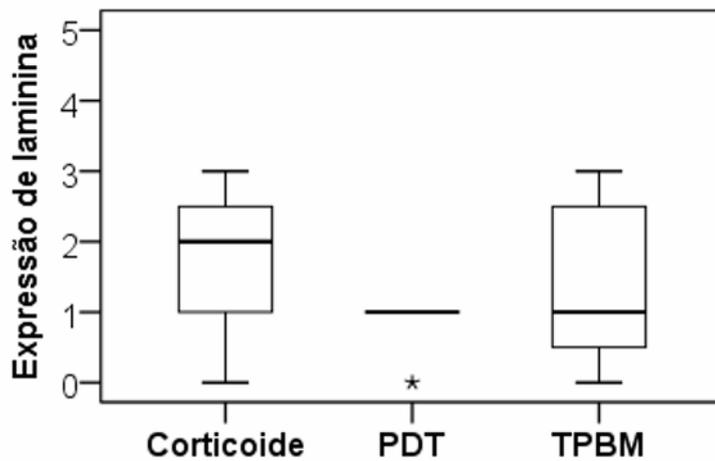
Tabela 11: Avaliação da recorrência em função da intensidade da imunomarcção da laminina, por grupo de tratamento.

Expressão de laminina		Grupo			Total
		Corticoide	PDT	TPBM	
Ausente	N	1	1	2	4
	% Laminina	25,0%	25,0%	50,0%	100,0%
	% grupo	14,3%	12,5%	25,0%	17,4%
	% of Total	4,3%	4,3%	8,7%	17,4%
Discreto	N	2	7	3	12
	% Laminina	16,7%	58,3%	25,0%	100,0%
	% grupo	28,6%	87,5%	37,5%	52,2%
	% of Total	8,7%	30,4%	13,0%	52,2%
Moderado	N	2	0	1	3
	% Laminina	66,7%	0,0%	33,3%	100,0%
	% grupo	28,6%	0,0%	12,5%	13,0%
	% of Total	8,7%	0,0%	4,3%	13,0%
intenso	N	2	0	2	4
	% Laminina	50,0%	0,0%	50,0%	100,0%
	% grupo	28,6%	0,0%	25,0%	17,4%
	% of Total	8,7%	0,0%	8,7%	17,4%
Total	N	7	8	8	23
	% Laminina	30,4%	34,8%	34,8%	100,0%
	% grupo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	% of Total	30,4%	34,8%	34,8%	100,0%

Fonte:CRSM

Após PDT a totalidade dos casos apresentaram menor expressão significativa de laminina ($p=0,049$), comparado à corticoide (42,9%) e TPBM (62,5%), como demonstrado na figura 15.

Figura 15: Análise da expressão de laminina após o tratamento com corticoide, PDT e TPBM. Diferenças estatísticas calculadas por teste não-paramétrico de medianas para amostras independentes.

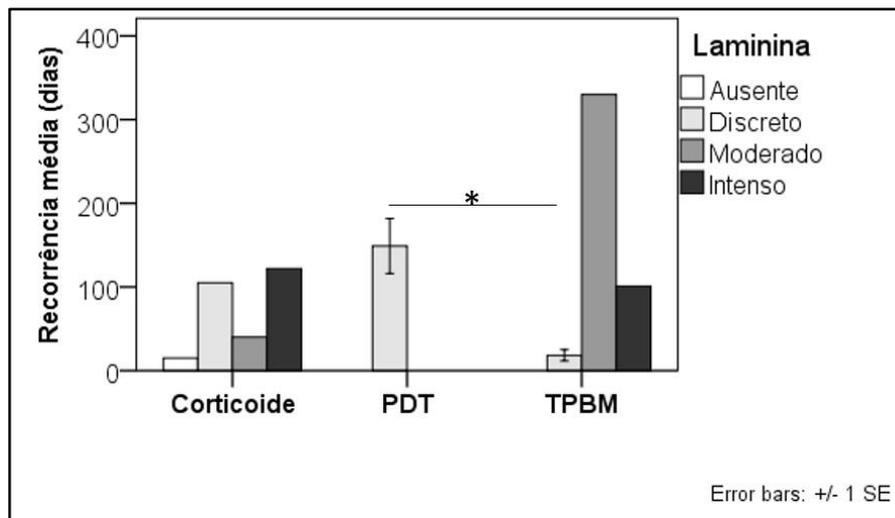


Laminina	Corticoide	PDT	TPBM	p-valor
> Mediana	4 (57,1%)	0 (0%)	3 (37,5%)	0,049
<= Mediana	3 (42,9%)	8 (100%)	5 (62,5%)	
Total	7 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	

Fonte:CRSM

Considerando-se as mulheres com expressão discreta de laminina e com recidiva, após PDT a recorrência foi observada em uma média de $149 \pm 32,9$ dias comparado a TPBM ($18,3 \pm 6,6$), diferença essa com significância estatística ($p=0,018$), conforme representado na Figura 16.

Figura 16: Análise da expressão de laminina, após o tratamento com corticoide, PDT e TPBM, segundo a recorrência em dias. Diferença estatística calculada por teste paramétrico *T-student* para amostras independentes.



Fonte:CRSM

7. AVALIAÇÃO DAS DIFERENÇAS DOS BIOMARCADORES NO PRÉ E PÓS TRATAMENTOS

Conforme pode-se observar na tabela 12, para todos os tratamentos há uma melhora significativa na histologia para todos os tratamentos, com alteração do padrão L2 para L1 ($p < 0,05$).

Após a corticoterapia há uma diminuição significativa na expressão de Ki67 ($p = 0,037$). Nota-se o mesmo padrão de resposta após TPBM, embora sem significância estatística. Contudo, para PDT observa-se um aumento na expressão de Ki67, embora não significativo.

Após TPBM há uma diminuição significativa na expressão de CK10 ($p = 0,046$). Nota-se o mesmo padrão de resposta após PDT, embora sem significância estatística. Contudo, após o corticoide não se observa nenhuma diferença na expressão de CK10.

Tabela 12: Análise das significâncias da comparação pré e pós-tratamento para os biomarcadores histologia, prurido (EVA), CK10, CK14, laminina, P53, Ki67, CD34 e mastócitos.

Biomarcador	Tratamento					
	Corticoide		PDT		TPBM	
	Teste	p-valor	Teste	p-valor	Teste	p-valor
Histologia	- 2,530 ^b	0,01 1	- 2,000 ^b	0,04 6	- 2,236 ^b	0,02 5
Prurido	- 1,546 ^b	0,12 2	- 1,195 ^b	0,23 2	- 1,357 ^b	0,17 5
CK10	0,000 ^d	1,00 0	- 1,342 ^b	0,18 0	- 2,000 ^b	0,04 6
CK14	- 1,089 ^c	0,27 6	- 1,134 ^c	0,25 7	- 1,186 ^c	0,23 6
Laminina	- 1,414 ^b	0,15 7	- 1,633 ^c	0,10 2	- 1,633 ^c	0,10 2
P53	- 0,314 ^b	0,75 3	- 3,390 ^a	0,26 6	2,819 ^a	0,40 8
Ki67	2,543 ^a	0,03 7	- 5,746 ^a	0,23 4	5,557 ^a	0,20 0
CD34	0,794 ^a	0,40 0	- 0,169 ^b	0,86 6	- 0,453 ^a	0,82 5
Mastócitos	1,714 ^a	0,79 6	10,35 7 ^a	0,41 5	14,30 0 ^a	0,46 4

Em verde aumento de expressão após o tratamento.

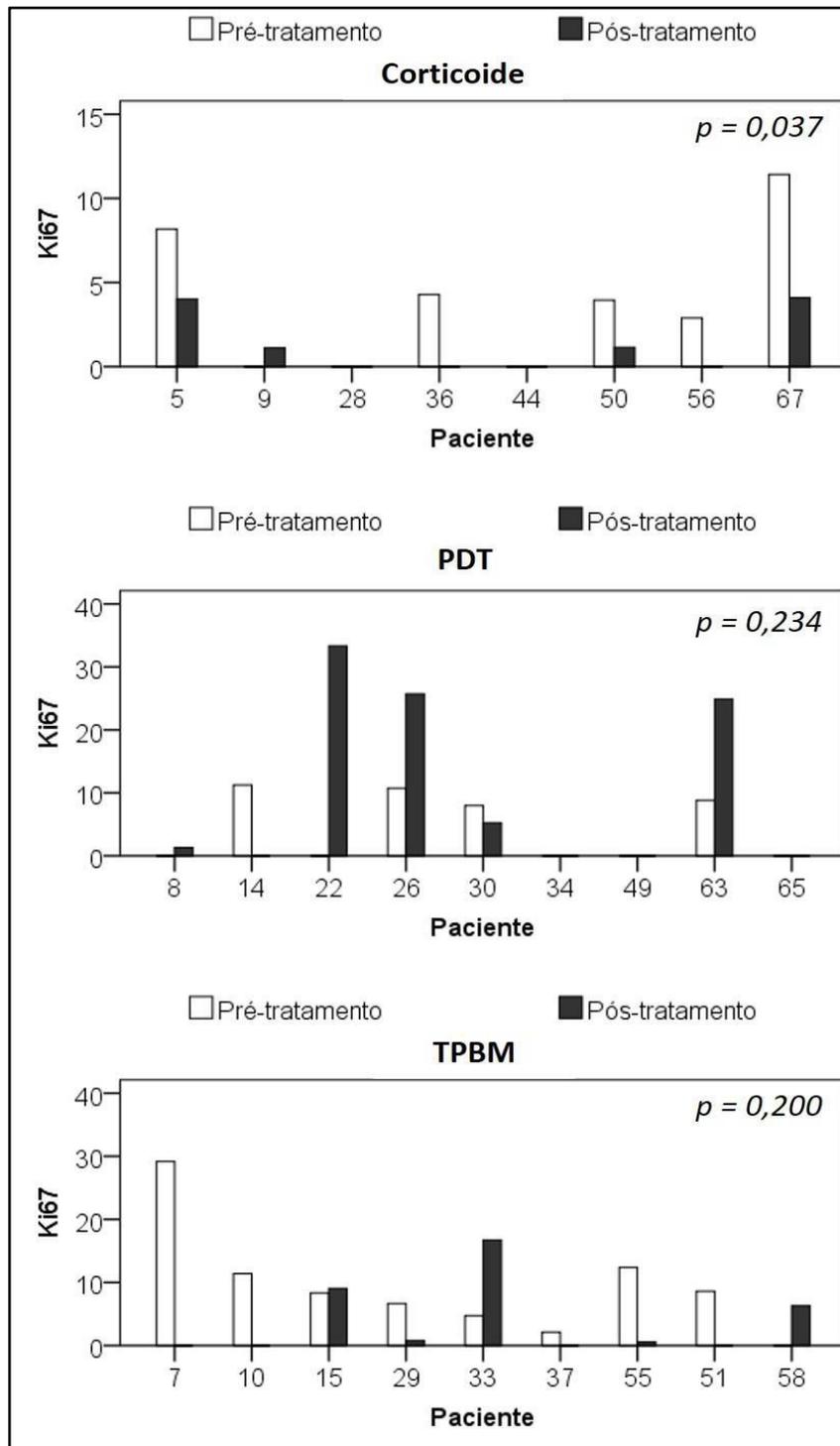
Em vermelho diminuição de expressão após o tratamento.

a Teste T-student pareado pré – pós.

b Teste Wilcoxon pós – pré baseado no rank positivo, c Teste Wilcoxon pós – pré baseado no rank negativo, d Teste Wilcoxon pós – pré baseado na soma do rank negativo iguala a soma do rank positivo.

A Figura 17, refere-se a expressão de Ki 67 pré e pós tratamentos, considerando amostras pareadas.

Figura 17 – Expressão Ki 67 pré e pós tratamentos



Fonte:CRSM

7.1 Histologia

Para todos os tratamentos a frequência de padrão inicial do líquen escleroso aumenta (Tabela 13). Contudo, há diferença estatística significativa no tipo de histologia somente após o tratamento com corticoide e PDT, segundo o teste de associação qui-quadrado.

Tabela 13: Análise do padrão histológico antes e após os tratamentos.

Histologia			Avaliação			
			Pré-tratamento	Pós-tratamento	total	p-valor
Corticoide	Líquen inicial	N	1	9	10	0,001
		%	8,3%	75,0%	41,7%	
	Líquen estabelecido	N	11	3	14	
		%	91,7%	25,0%	58,3%	
	Total	N	12	12	24	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	
PDT	Líquen inicial	N	1	5	6	0,022
		%	9,1%	45,5%	27,3%	
	Líquen estabelecido	N	10	6	16	
		%	90,9%	54,5%	72,7%	
	Total	N	11	11	22	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	
TPBM	Líquen inicial	N	1	6	7	0,056
		%	9,1%	54,5%	31,8%	
	Líquen estabelecido	N	10	5	15	
		%	90,9%	45,5%	68,2%	
	Total	N	11	11	22	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

Fonte:CRSM

7.2 Intensidade de Prurido

Em análise não-pareada, para todos os tratamentos, a frequência de ausência de prurido aumenta (Tabela 14). Contudo, há diferença estatística significativa de em torno 3 vezes somente após o tratamento com PDT, segundo o teste de associação qui-quadrado. Nota-se um padrão de resposta bem similar após corticoterapia e TPBM.

Tabela 14: Análise de ausência ou presença de prurido (**EVA**) antes e após os tratamentos.

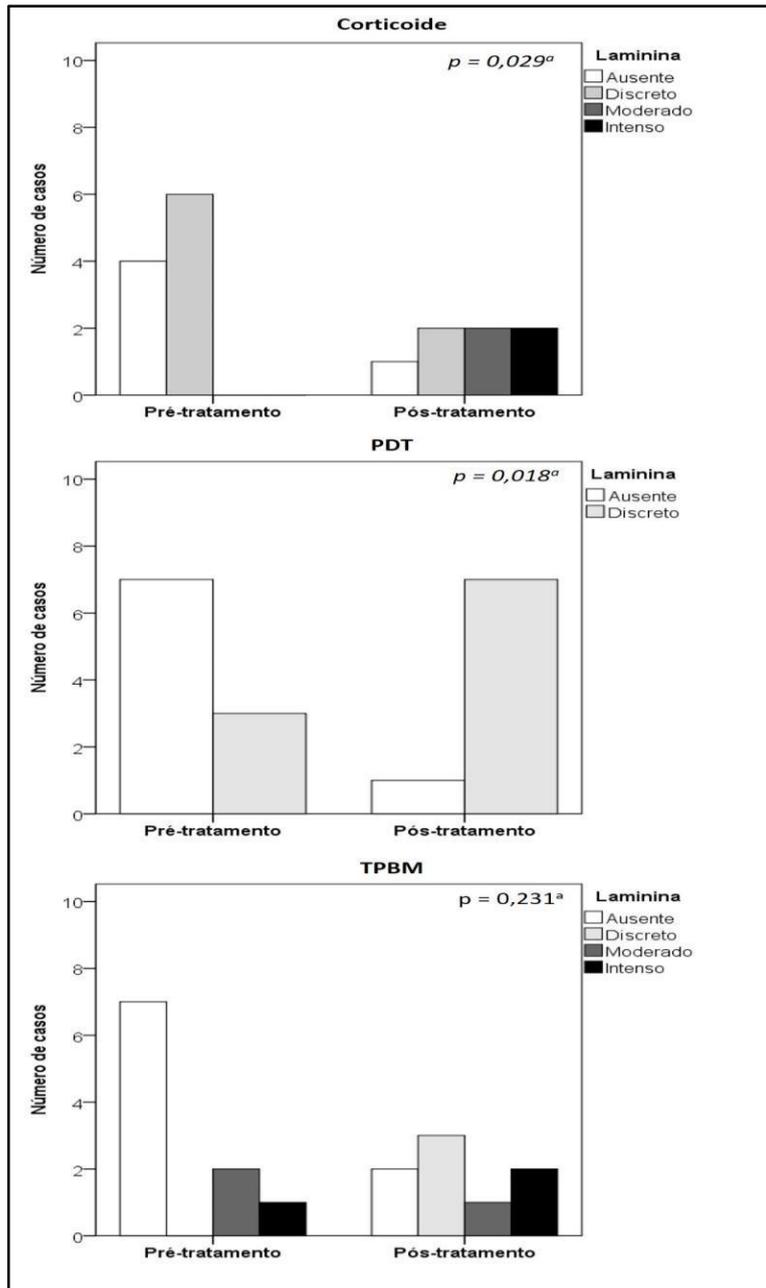
Prurido			Avaliação			
			Pré-tratamento	Pós-tratamento	total	p-valor
Corticoide	Ausente	N	3	7	10	0,098
		%	25%	58%	42%	
	Presente	N	9	5	14	
		%	75%	42%	58%	
	Total	N	12	12	24	
		%	100%	100%	100%	
PDT	Ausente	N	3	8	11	0,033
		%	27,3%	72,7%	50,0%	
	Presente	N	8	3	11	
		%	72,7%	27,3%	50,0%	
	Total	N	11	11	22	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	
TPBM	Ausente	N	3	6	9	0,387
		%	27,3%	54,5%	40,9%	
	Presente	N	8	5	13	
		%	72,7%	45,5%	59,1%	
	Total	N	11	11	22	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

Fonte:CRSM

7.3 Laminina

A Figura 18 demonstra a expressão de laminina, pré e pós tratamentos. Observa-se marcação intensa pós tratamento do grupo corticoide e TPBM, enquanto pós PDT essa marcação foi discreta.

Figura 18 – Marcação da Laminina pré e pós tratamentos.



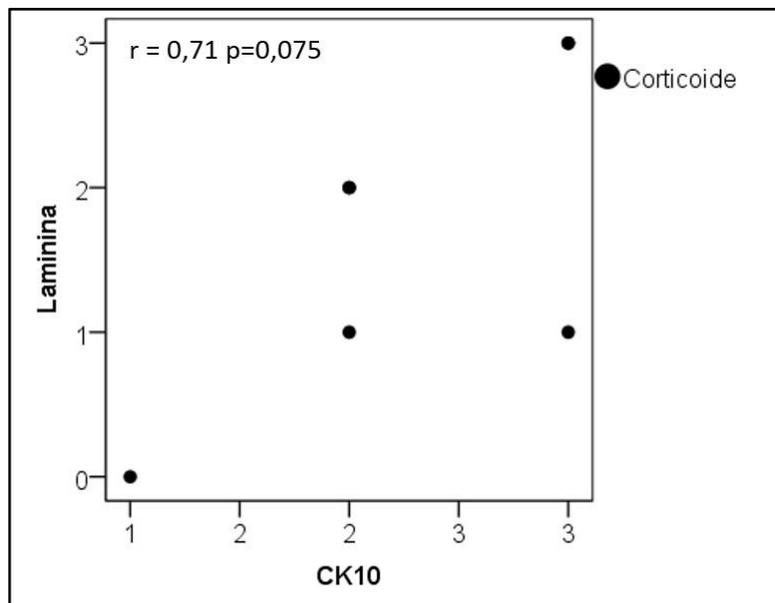
Fonte:CRSM

8- ANÁLISE DA CORRELAÇÃO DOS BIOMARCADORES PÓS TRATAMENTOS

8.1. LAMININA E CITOQUERATINA 10

Existe uma correlação moderada entre a laminina e CK10 nos pós tratamento com Corticoide ($r = 0,71$ e $p = 0,075$), como demonstrado na Figura 19.

Figura 19- Avaliação da Laminina e CK10 no pós tratamento do GC.

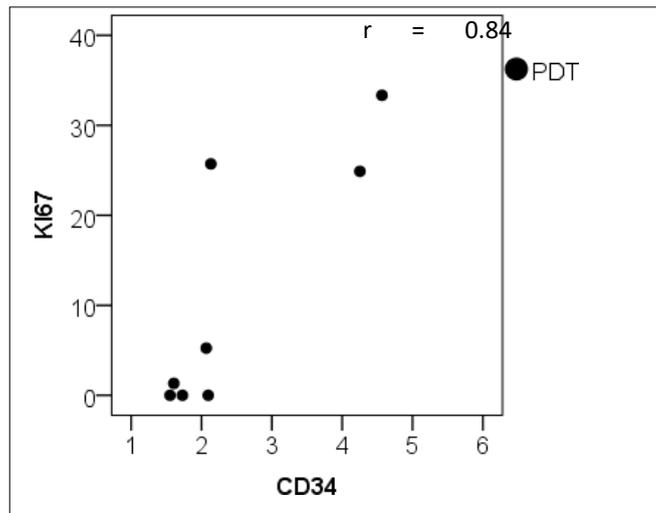


Fonte:CRSM

8.2. P53/ Ki 67/ CD34

Observou-se uma correlação forte e significativa entre Ki 67 e CD34 nos pós tratamento com PDT ($r = 0.84$ e $p = 0,009$), conforme representado pela Figura 20.

Figura 20- Avaliação de Ki 67 e CD 34 pós PDT, através de coeficiente de correlação linear.

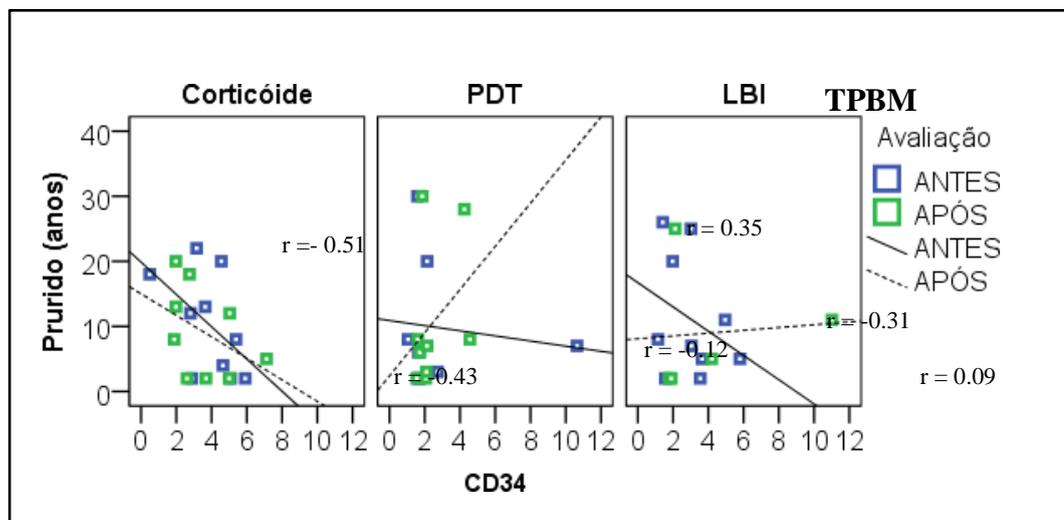


Fonte:CRSM

8.3. CD34 E INTENSIDADE DE PRURIDO

Houve correlação moderada entre prurido e CD34 pré tratamento no grupo corticoide ($r = -0,51$ $p=0,134$) e nos pós tratamento observou-se discreta alteração ($r = -0,43$ e $p = 0,25$). Ademais, houve alteração na correlação pós tratamento com PDT e TPBM, conforme Figura 21.

Figura 21- Correlação entre CD34 e prurido entre os grupos de tratamento.



Fonte:CRSM

8.4. Ki 67 e CD34

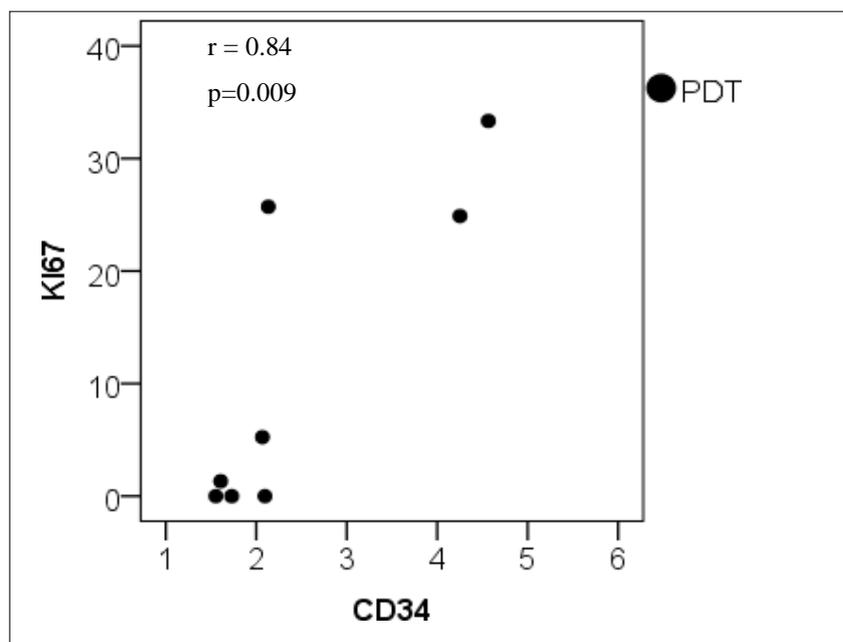
Houve correlação positiva e estatisticamente significativa entre Ki 67 e CD34 nos pós tratamento com PDT ($r=0,84$ $p=0,009$) conforme expresso no gráfico 14, sendo tal correlação inexistente antes do tratamento ($r=0,099$ $p=0,815$). Não há correlação relevante após o tratamento com corticoide ($r=0,009$ $p=0,984$) e TPBM ($r=0,436$ $p=0,463$), conforme observado na Tabela 15.

Tabela 15- Avaliação das correlações entre Ki 67 e CD34

(r)	Correlações	Corticóide	PDT	TPBM
i	Ki 67 x CD34	-0,14	0,099	-0,45
f	Ki 67 x CD34	0,009	0,84	0,44

Fonte:CRSM

Gráfico 14 – Correlação entre Ki 67 e CD34 pós PDT



Fonte:CRSM

8.5. P53 e CK14

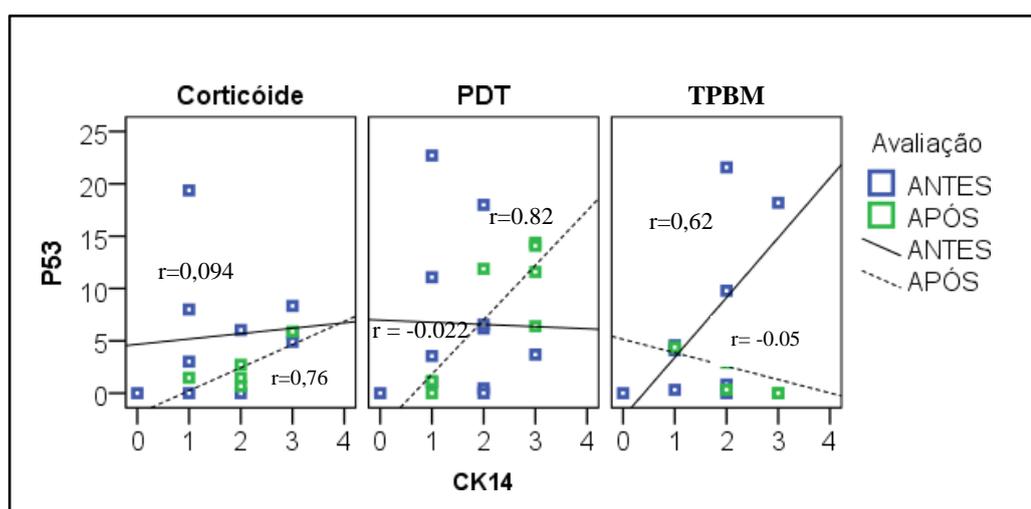
O CK14 e P53 aumentaram pós PDT, porém sem significância estatística, $p= 0,275$ e $p= 0,266$, respectivamente. Entretanto, o incremento da P53 mostrou-se forte e, significativamente, correlacionado com a elevação de CK14 após tratamento com PDT ($r= 0,82$ e $p= 0,023$), conforme demonstrado no Gráfico 15. Da mesma forma, pós tratamento com corticoide houve correlação significativa entre P53 e CK14 ($r= 0,76$ e $p= 0,138$), de acordo com a Tabela 16.

Tabela 16- Avaliação das correlações entre P53 e CK 14 pré e pós tratamento.

Correlações (r)	Corticoide	PDT	TPBM
P53 X CK 14 pré	0,094	-0,022	0,62
P53 X CK 14 pós	0,76	0,82	- 0,05

Fonte:CRSM

Gráfico 15- Correlação entre P53 e CK14 entre os tratamentos



Fonte:CRSM

8.6. RECORRÊNCIA X MASTÓCITOS

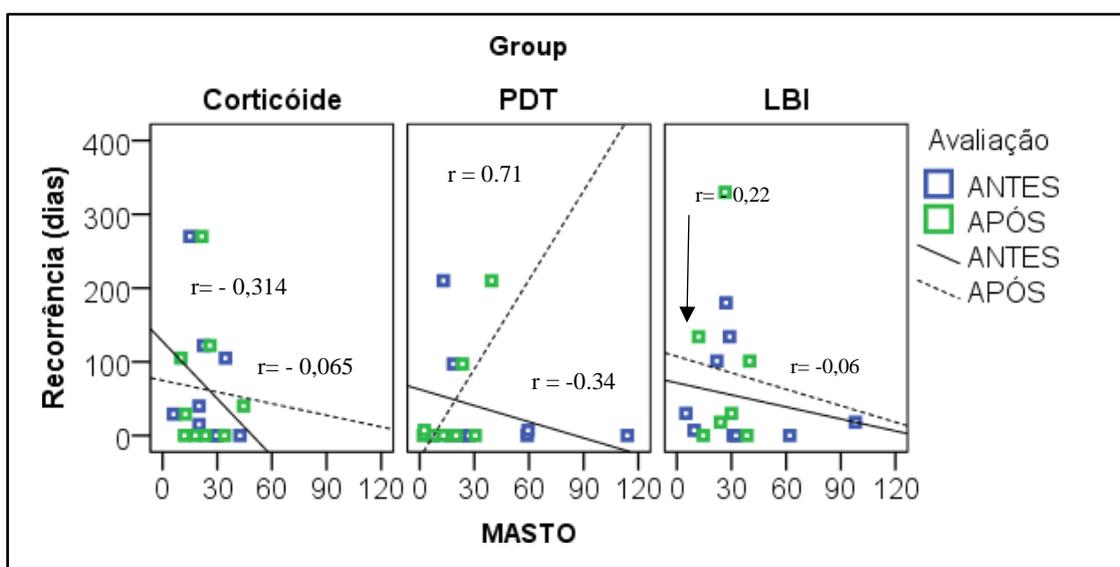
Os mastócitos diminuem em todos os tratamentos, porém sem significância estatística, entretanto, na avaliação pós PDT observou-se correlação forte significativa entre a diminuição de mastócitos, com consequente redução da recorrência ($r = 0,71$ e $p = 0,049$), de acordo com o Gráfico 16. Esse fato não foi observado nos pós tratamento com corticoide ($r = -0,065$ $p = 0,867$) e TLBI ($r = -0,068$ e $p = 0,886$), conforme demonstra a Tabela 17.

Tabela 17- Avaliação entre recorrência x mastócitos.

Correlações (r)		Corticoide	PDT	TPBM
Mastócitos X recorrência pré	X	- 0,314	- 0,344	- 0,228
Mastócitos X recorrência pós	X	- 0,065	0,71	- 0,068

Fonte:CRSM

Gráfico 16- Correlação entre recorrência e mastócitos pré e pós tratamentos



Fonte:CRSM

8.7. AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE MASTÓCITOS E CD34.

As correlações encontradas entre mastócitos e CD34 foram de $r=-0.058$ ($p=0.892$), $r=0,032$ ($p=0.946$) e $r=0.754$ ($p=0.141$) pós tratamento com corticoide, PDT e TPBM, respectivamente.

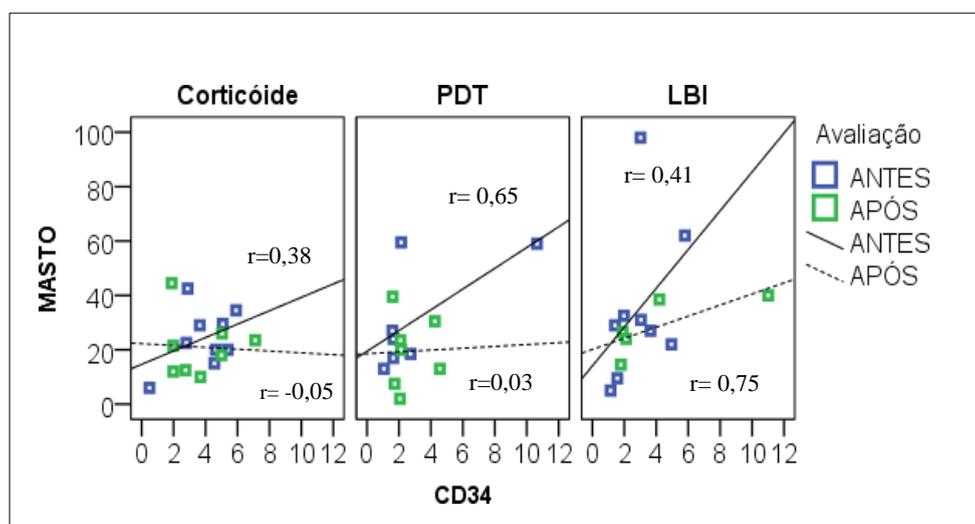
Embora, haja uma diminuição média em torno de 33% de mastócitos pós TPBM, comparado ao valor antes do tratamento, nota-se que o aumento médio de 10% de CD34 se correlaciona moderadamente e positivamente com a presença de mastócitos ($r=0.754$, $p=0.141$) em algumas mulheres, visto no Gráfico 17. Somente pós PDT há uma quebra de correlação clara entre a presença de mastócitos e CD34, conforme observado na Tabela 18.

Tabela 18– Avaliação da correlação entre mastócitos e CD34.

Correlações (r)	Corticoide	PDT	TPBM
Mastócitos x CD34 inicial	0.38	0.65	0.41
Mastócitos x CD34 final	-0.058	0.032	0.75

Fonte:CRSM

Gráfico 17- Avaliação da correlação entre mastócitos e CD34.



Fonte:CRSM

9. DISCUSSÃO

O Líquen Escleroso Vulvar é uma dermatose crônica inflamatória, não neoplásica, não infecciosa, provavelmente, de origem autoimune, que afeta a região anogenital, causando prurido intenso e estenose genital. Desta maneira, pode vir a limitar a vida sexual, sobretudo, devido à dispareunia (intensa dor às relações sexuais) por trauma local. LEV é considerada a causa mais frequente de doença crônica vulvar com reiteradas recorrências (BURROWS,2011; HAEFNER *et al*, 2014).

A doença é mais observada em mulheres caucasianas (FUNARO *et al*,2014). No presente estudo, 70,6% das pacientes eram caucasianas (Fitzpatrick II e III).

O LEV pode ocorrer em qualquer idade, no entanto, tende a ter uma distribuição bimodal na pré púbere e pós menopausa, sendo mais frequente em mulheres acima dos 50 anos (SCHLOSSER,2015). Em nosso resultado, a média de idade foi de 59,26 anos, evidenciando a faixa etária mais comum.

A patogênese do LEV é desconhecida, porém, a teoria mais aceita considera a enfermidade como autoimune, conforme apontado em recentes estudos (TERLOU *et al*, 2012). Há frequente associação com outros distúrbios autoimunes, tais como: tireoidite, alopecia areata, vitiligo e anemia perniciosa (SCHLOSSER,2015; SHAW,2011).

Em no nosso trabalho, a doença autoimune prevalente, foi o hipotireoidismo, como já foi mencionado na literatura. As doenças metabólicas associadas, como a Hipertensão Arterial Sistêmica e a Diabetes Mellitus, também foram observadas. O estudo realizado por Belotto já evidenciava as mesmas enfermidades do presente trabalho (BELOTTO,2015).

O principal sintoma clínico do LEV é o prurido vulvar crônico, que se relaciona com a doença ativa e, cujo tratamento padrão, baseia-se no uso de corticosteroide. O diagnóstico incorreto de LEV pode incorrer em sérios problemas nesta doença. Ademais, a manutenção dessa doença ativa, bem como a demora no tratamento do LEV resultará não apenas na progressão da enfermidade, mas irá ocasionar o desenvolvimento de cicatrizes, fusões / estenoses (JOENSEN *et al*, 2011; JOHNSON *et al*, 2012). Nossas enfermas mostraram fusão de terço superior de pequenos lábios, fimose clitoridiana e algumas com área de retração .

c. A dose total de pomada utilizada em 2 meses, foi de 45g/semana, razão pela qual não obtivemos efeitos colaterais sérios. Devido ao exposto, a proposta desse estudo foi considerar as terapias fotônicas, como alternativas ao tratamento *padrão ouro*, mostrando as alterações clínicas e imuno-histoquímicas, que favorecem sua aplicação, além do que, evitando efeitos colaterais e atrofia genital.

A fototerapia médica é reconhecida, desde o início do século passado, com a utilização de Luz para tratamento de várias afecções dermatológicas. A PDT e a TPBM são reconhecidas por sua ação fotofísico química, ou seja, atuação nos receptores exógeno e endógeno celulares, respectivamente. Estes resultam em efeitos locais, além de sistêmicos importantes.

Desde 1999, a PDT foi reconhecida e aprovada pelo FDA, para o tratamento da ceratose actínica com elevados índices de cura, também passou a ser aceita sua utilização nas lesões cutâneas não tumorais, devido à ação antiinflamatória e imunomoduladora. Já a TPBM atua no fotoacceptor mitocondrial, principalmente, no citocromo C oxidase (CCO), além de ação em membranas. Karu, ainda na década de 80, afirmava que o TPBM ocorre à níveis molecular, celular e sistêmico (KARU,1989). Os resultados da fotobiomodulação em várias patologias do sistema imunológico, em distintos órgãos, nos induziu a aplicar em nossas pacientes [91]. O presente estudo denota o pioneirismo ao utilizar a terapia de fotobiomodulação para tratamento do LEV.

Em nosso estudo, nos 3 grupos, pós tratamentos, houve modificação do padrão histológico de L2 (líquen antigo) para L1 (líquen inicial), com significância estatística. O GC foi o de maior relevância nesse quesito, seguido pela TPBM e PDT, denotando uma resposta de modulação epitelial relevante.

Na corticoterapia tópicas inúmeros estudos demonstram sua ação, na modificação e reestruturação do epitélio (KIRTSCHIG,2015; GUERRERO,2015).

Estudos avaliando a resposta histopatológica do LEV frente à PDT são descritos em literatura. Olejek et al., apontaram que o padrão histológico pós tratamento foi alterado em 62% (OLEJEK *et al*,2010). Mills et al descreveram o aumento de TGF- β 3, que facilitou a migração de queratinócitos, organizando a matriz dérmica pós PDT (MILLS *et al*, 2014).

No que se refere à TPBM, Zhang et al., relataram em seu estudo, que pós tratamento, houve redução do processo inflamatório e proliferação de fibroblastos (ZHANG,2018). Santos et al., por sua vez, observaram que a TPBM promove proliferação de queratinócitos, diminuição da inflamação (redução de IL-6), migração de fibroblastos, aumento da angiogênese e acréscimo na síntese de colágeno (SANTOS,2017). Chavantes refere que a TPBM reduz o edema, a inflamação, através da modulação de processos inflamatórios, ademais estimula a angiogênese, fagocitose, proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno, condições estas que facilitam cicatrização tissular (CHAVANTES,2008).

Avaliamos marcadores de morfologia epitelial, como degeneração hidrópica e hiperqueratose, além da hialinização do colágeno, que são encontrados no LEV ativo. Em nosso estudo, as vulvas normais, apresentaram epitélio pavimentoso estratificado, exibindo de 5 a 6

camadas epiteliais com discreta degeneração hidrópica, observada em áreas isoladas do epitélio. Nos casos de LEV houve grande quantidade de queratinócitos com degeneração hidrópica. Considerando os pós tratamento houve redução da degeneração hidrópica nos 3 grupos do estudo, sendo significativa na TPBM, seguida pelo GC e PDT. Segundo Karu, o Laser age nas bombas de Na^+/K^+ , facilitando, não só a drenagem linfática, como também a redução do edema local, conforme foi visto em nosso estudo.

A hiperqueratose, ocorre devido ao intenso processo inflamatório, resultando em espessamento do estrato córneo da epiderme. Ambas alterações são descritas na histologia do LEV (RAGAUER,2005; MOLLET,2007).

Em nosso estudo, a maioria das pacientes com vulvas normais não apresentaram hiperqueratose, ao contrário, as pacientes com LEV evidenciaram frequência moderada a intensa desse marcador. Todos os tratamentos reduziram a hiperqueratose, sendo que no GC essa diminuição foi de mais evidente, seguido da TPBM e PDT. O GC promoveu uma diminuição de 50% na hiperqueratose, na TPBM esse declínio foi de 33% e na PDT em 25%.

Em nosso trabalho, ainda observando os aspectos morfológicos da pele vulvar, a hialinização do colágeno foi avaliada. Nas vulvas normais o tecido conjuntivo era denso não-modelado, sem haver espessamento ou alteração da rede de fibras colágenas. No LEV, na grande maioria dos casos, houve moderada a intensa hialinização colagênica, no conjuntivo próximo ao epitélio. No presente estudo, pós tratamento, ocorreu a diminuição da hialinização do colágeno em 33,3% no TPBM, 16,7% no GC e 10% no PDT. Então, o decréscimo da hialinização do colágeno envolve uma melhora do processo reparativo, que se encontra prejudicado, no caso do LEV. Conforme estudo de prévio de Belotto, houve melhora no trofismo longitudinal da pele vulvar, em pacientes com LEV, local onde se depositam as fibras de colágeno, seguindo o sentido das linhas de Langer, auxiliando na disposição dessas fibras e melhorando, sobretudo, o aspecto da cicatrização vulvar (BELOTTO,2015). No presente trabalho também observamos uma melhora no aspecto da lesão vulvar com a TPBM.

A avaliação de vasos de pequeno calibre, expressa pelo marcador CD34, nos informou o impacto dos tratamentos sobre a angiogênese e a resposta clínica. Na observação de peles normais, os vasos sanguíneos demonstraram pequeno calibre, por vezes congestos e com luz ampla. No LEV foi observada uma densidade menor de vasos sanguíneos, com pouca marcação de CD34, quando comparado com a pele normal. Houve aumento da vascularização nos três tratamentos, facilitando a melhora da oxigenação e nutrição epitelial do tecido tratado.

Van der Avoort et al., mostraram em seu estudo com LEV hialinizado, que o número de vasos sanguíneos está reduzido. Fistarol et al., referiram a presença de vasos dilatados abaixo

da membrana basal, infiltrado liquenóide e retificação das cristas epidérmicas (“*rete ridge*”) no LEV (VAN DER AVOORT *et al*, 2010; FISTAROL, 2013). Evangelou et al., por sua vez, ao avaliarem o tratamento com PDT-ALA, demonstraram aumento de CD34 e CD8, 24 hs após o tratamento, portanto, melhora da vascularização dérmica (EVANGELOU *et al*, 2011).

Na avaliação sobre o infiltrado inflamatório, pudemos observar que em peles normais encontrava-se ausente, entretanto, situação diferente foi observada no LEV, onde sua presença foi de moderada a intensa e composto por células mononucleares. Após os tratamentos, houve redução do infiltrado inflamatório, sinalizando melhora clínica e, possivelmente, evitando a progressão da doença. A alteração sobre o infiltrado inflamatório após uso de corticosteroide e terapias fotônicas, foi descrito por inúmeros autores, que apontam sua diminuição (MILLS *et al*, 2014; REGAUER, 2005; SHI *et al*, 2016). É importante ressaltar que, as possíveis causas de progressão para doença invasora são alterações imunológicas locais, mutações da P53, persistência do processo inflamatório e a hiperqueratose (GREEN, 2009; CARLSON *et al*, 2013; BRODRICK, 2013), então a diminuição da inflamação no LEV é mandatório.

Em nosso estudo, quando avaliamos a quantificação dos mastócitos, pudemos observar que no LEV encontrava-se aumentado e, com frequência, degranulados. As terapias fotônicas evidenciaram uma redução do número de mastócitos, bem superior ao GC. Em nosso estudo, a redução do número de mastócitos, provavelmente, promoveu a melhora da fibrose, da hiperqueratose e inibiu a inflamação. Esta também impediu a infiltração intraepitelial por mastócitos imunorreativos, que liberam a triptase (enzima liberada por mastócitos degranulados), responsável pela relevante ação na angiogênese e desenvolvimento tumoral. (SOUZA *et al*, 2015).

Na análise dos marcadores de proliferação celular, avaliamos a imunomarcagem da P53 e observamos que a expressão dessa proteína reguladora em vulvas normais não foi positiva no núcleo, mas sim, no citoplasma das células, sendo encontrada, principalmente, na camada basal do epitélio, controlando o ciclo celular. Nos casos de LEV, houve frequência maior de P53 positiva no núcleo, nas camadas basais e supra basais, com intensidade variada de marcação, podendo relacionar-se ao estresse oxidativo/isquêmico e não a um processo mutagênico. Após os tratamentos, identificamos, que no GC houve frequência menor de P53 positiva no núcleo das células. Na PDT, houve elevação desse marcador, principalmente, no núcleo celular. A TPBM, entretanto, demonstrou uma redução da P53, com algumas células marcadas no núcleo e citoplasma.

Em nosso estudo, o grupo Corticoide mostrou imunomarcagem no núcleo, onde a P53 tem ação de reparo de DNA e regulação do ciclo celular. Schoepe et al., demonstraram em seu

trabalho, que os corticoides medeiam seus efeitos, através de diversos mecanismos genômico, por ligação do receptor intracelular de corticoide, que será transportado ao núcleo da célula. A via não genômica refere-se a receptores ligados a membrana e modula a resposta de células-alvo (monócitos, células T e plaquetas). Esses mecanismos explicam a ação antiinflamatória, antimitótica, apoptótica, vasoconstrictora e imunomoduladora associadas ao corticoide (SCHOEPE *et al*, 2006).

Em nosso estudo, no grupo de Terapia Fotodinâmica, a localização da P53 foi nuclear evidenciando um incremento em 50% nesse marcador, que pode estar traduzindo no reparo de DNA. Abrantes *et al*. referiram que a PTD, com Azul de Metileno, causa ativação citoplasmática da P53, que irá contribuir com a morte celular por apoptose. Cazaña *et al.*, também, observaram que em áreas tratadas com PDT, previamente, para lesão escamosa invasora, a expressão do P53 foi menor que o grupo controle (CEC não tratado), por mecanismo sobrevivência dependente (CAZAÑA *et al*, 2017; ABRANTES *et al*, 2018). Em estudo de Bagazgoitia *et al.*, a expressão de P53 foi reduzida pós PDT para tratar ceratose actínica (BAGAZGOITIA *et al*, 2011).

Em nosso trabalho, no TPBM, foi o que denotou a maior redução da P53, assim como o padrão inalterado dessa proteína comparado ao pré tratamento, ocorrendo imunomarcações em algumas células tanto no núcleo quanto no citoplasma. Esse padrão de redução de P53 é descrito em literatura e envolve de maneira mais efetiva, o processo de reparação tecidual, bem como a regulação do ciclo celular.

Em nosso estudo foi avaliada a proteína nuclear Ki 67, que é um importante marcador de proliferação, atuando na manutenção e/ou regulação do ciclo de divisão celular, além de estar relacionado com o curso clínico das lesões neoplásicas. Em nossas observações nos casos de LEV, a frequência de células que expressaram positividade para esse marcador, foi superior ao observado em vulvas normais e com distribuição homogênea nuclear. Alguns autores atribuem a presença do Ki 67, como sendo um marcador potencial para lesões pré-malignas e malignas (VAN DER AVOORT *et al*, 2010; CARLSON *et al*, 2013; CAZAÑA *et al*, 2017). Hoang *et al.*, ainda atribuem que a coloração da imunomarcação diferencia a lesão benigna daquelas com risco de progressão (HOANG *et al*, 2016).

O Ki 67 no GC demonstrou redução na imunomarcação pós tratamento, situação também observada em estudo de Gomes e col. (GOMES, 2005). Essa condição retrata a ação antiproliferativa e antimitótica epidérmica, associada ao corticoide tópico.

Na TPBM houve diminuição na imunomarcação do Ki 67, o que corrobora com o controle de proliferação celular, observada no LEV pré-tratamento, além da ação

antinflamatória e de reparo tecidual. Zhang et al., observaram que a proliferação celular associada à TPBM, pode ser dose-dependente, e que é um mecanismo, onde há ação de quinases reguladoras desse processo (ZHANG,2018). Em nosso estudo no LEV, houve controle da proliferação celular, de acordo com a nossa dose proposta, devido à redução do Ki 67.

O grupo PDT também mostrou redução da frequência de marcação do Ki 67, contudo, quando comparado aos demais grupos de tratamento, foi o que apresentou maior marcação dessa proteína. Assim, há uma sinalização de proliferação associada à PDT, secundária ao processo de morte celular fotoinduzida, porém, sem mostrar risco mitogênico, uma vez que as células em proliferação não demonstravam diferenciação na estratificação. Olejek et al., em seu trabalho observaram, ao término do tratamento com PDT em LEV, que a expressão do Ki 67 não mudou significativamente, demonstrando que a terapia fotodinâmica não conduziu à uma transformação neoplásica (OLEJEK *et al*,2010).

Avaliando as proteínas relacionadas à estratificação epitelial, as citoqueratinas fazem parte do citoesqueleto, conferindo a estabilidade mecânica e integridade das células epiteliais, particularmente, dos queratinócitos. Os queratinócitos indiferenciados são expressos pela CK14, enquanto a CK10 expressa queratinócitos diferenciados. Mutações em seus genes, alteram sua estrutura molecular, resultando em genodermatoses (epidermólise bolhosa). Segundo Almeida Jr., as citoqueratinas são considerados relevantes marcadores de diferenciação epitelial (ALMEIDA *et al*,2014).

Em nosso estudo em condição de vulva normal, a citoqueratina 14, teve representação discreta e homogênea nas camadas basal e parabasal. Já nos casos de LE houve incremento da marcação positiva para CK14 em todas as camadas do epitélio. Wei et al., mostraram em seu estudo, que a perda da expressão de CK14 foi encontrada em queratinócitos basais de pacientes, com líquen escleroso (WEI *et al*, 2016).

No GC incorreu um aumento não expressivo da imunomarcação de CK14 (marcação intensa), comparado ao pré tratamento. O corticosteroide possui efeito antiproliferativo e ação anti mitótica epidérmica, reduz a espessura epitelial, diminui o tamanho e a proliferação de queratinócitos, gerando a fibrose epidérmica (SCHOEPE *et al*, 2006). Essa explicação pode justificar a pouca expressão de CK14 num epitélio com pouca proliferação de queratinócitos, pela ação de esteroide tópico.

Na PDT, a imunomarcação positiva acentuada para CK14 ocorreu na metade dos casos, em todas as camadas do epitélio, representando o grupo com marcação intensa de maior expressão do estudo. Nesi-Reis et al., demonstraram em seu trabalho, que a PDT atua em vários estágios da cicatrização, acelerando o reparo através da ativação do sistema imunológico local,

resultando em homeostase tecidual (NESI-REIS *et al* ,2018). Para Megna et al., a PDT antitumoral, mostrou as atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, bem como a modulação imunológica, influenciando a produção de fibroblastos, queratinócitos, mastócitos, glândulas sebáceas e folículo piloso (MEGNA *et al*,2016).

Na TPBM, houve marcação intensa para CK14 em todas as camadas epiteliais, sugerindo proliferação celular e reparo. Sperandio et al., relataram em seu estudo, que a TPBM promoveu proliferação e maturação de queratinócitos durante cicatrização de ferida. Os autores ainda apontaram a redução da CK14 e aumento da CK10 nas camadas superficiais, indicando uma maturação do epitélio em proliferação (SPERANDIO *et al*,2015).

A citoqueratina 10, em nosso estudo, foi expressa nas camadas supra basal e superficial do epitélio, de forma homogênea e com intensidade moderada e intensa devido à renovação do epitélio, periódica, em períodos de 35 dias. Nos casos de LEV, houve marcação discreta e intensa de CK10. No GC, pós tratamento, observou-se a marcação intensa dessa proteína, assim como nas Terapias Fotônicas. Ao analisarmos as citoqueratinas 10 e 14 pós tratamentos, pode-se inferir que no GC, os queratinócitos mostraram-se mais diferenciados do que nos demais grupos. As terapias fotônicas, apesar de terem promovido proliferação de células epiteliais, não evidenciaram diferenciação destas, sendo apenas uma mera renovação celular, no momento da estratificação.

A laminina, é relevante componente da membrana basal (MB). Essa glicoproteína, está envolvida na ancoragem do epitélio, além de atuar como importante plataforma de sinalização, envolvendo adesão da superfície celular, ligação entre os componentes da MB e polimerização. A laminina é essencial nesse processo, sendo responsável, significativamente, para a conexão entre a MB e o citoesqueleto. A ruptura da laminina (citocinese ou anormalidades epiteliais) promoverá espaços, que serão preenchidos por bolhas de exsudato plasmático do tecido conjuntivo. Ademais, mutações nessa glicoproteína, podem gerar doenças genéticas ligadas aos constituintes da própria MB. Frances et al. relataram que no LEV há alteração da laminina linear na junção dermo-epidérmica, com diminuição da elastina e fibronectina (FRANCES *et al*, 1983). Marren et al., observaram que há uma expressão de antígenos na MB em líquen escleroso (MARREN *et al*, 1997). Essa condição leva à destruição da laminina, expondo a MB e permitindo que os queratinócitos fiquem em contato com a derme. Conseqüentemente, há uma alteração no mecanismo de suporte e reparo no alicerce epitelial. Ainda corroborando com a patologia, as células de Langerhans são ativadas, induzindo uma resposta célula T mediada, na derme. Ademais, há liberação de linfocinas, que irão gerar eventos inflamatórios, culminando

com a degradação de colágeno, apontando, desta maneira para um processo imune envolvido nesta doença, que tem início na MB.

Em nosso estudo, considerando a pele vulvar normal, a laminina demonstrou uma marcação moderada à intensa na grande maioria dos casos. Foi observada expressão contínua e homogênea na camada basal do epitélio e tecido conjuntivo. No LEV, por sua vez, a maioria dos casos não expressaram laminina. Nos pós tratamento, contudo, houve manifestação de laminina em todos os grupos estudados.

No LEV, há supressão desse marcador e, conseqüentemente, acúmulo de ácido hialurônico na derme, desestruturação do colágeno que está conectado à laminina, resultando, assim, no desequilíbrio da MB. Olejek et al., demonstraram em seu trabalho que a PDT incrementa a expressão de CD44, glicoproteína considerada molécula de adesão e receptora de ácido hialurônico dentre outras funções. A PDT tem ação positiva nesse sistema e na reordenação da MB. O grupo PDT obteve importante expressão de laminina, por ação do reparo tecidual, modulação imune, além da proliferação de fibroblastos e queratinócitos, resultando, assim, a homeostase tecidual.

O grupo TPBM, também expressou de forma significativa a laminina, envolvendo respostas de proliferação e regeneração tecidual, além de ação imunomoduladora atribuídas ao tratamento. Whelan et al., em estudo experimental com modelo de cicatrização de feridas cutâneas, observaram proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e pró colágeno, ademais produção de fatores de crescimento, estímulo de macrófagos e linfócitos pós terapia de Fotobiomodulação. Desta forma, foi relatado incremento de expressão na MB, relacionados a laminina, uma nova possibilidade terapêutica eficaz na cicatrização da área vulvar com LEV (WHELAN *et al*, 2003).

No seguimento de 18 meses pós tratamento, o grupo que apresentou menor número de recorrências foi o de PDT. No GC e TPBM as recidivas foram demonstradas em mais da metade dos casos. Em todos os grupos estudados, as recorrências foram mais frequentes em mulheres na faixa etária ≥ 50 e ≤ 70 anos. As recorrências mais tardias aconteceram em 330 dias pós TPBM, ou seja, houve uma manutenção da resposta clínica por 11 meses. A média do número de dias de recorrência por grupos mostrou que as terapias fotônicas tiveram recorrências mais tardias quando comparadas ao GC (“*gold standard treatment*”).

É fato que, a recorrência pode estar associada a variáveis como: dose, número de sessões e tempo de seguimento pós tratamento, afora as condições clínicas dessas pacientes. Shi et al., avaliaram em estudo comparando ALA-PDT e clobetasol para tratar o LEV que, a recorrência atribuída ao uso do clobetasol foi de 35%, enquanto do ALA-PDT foi de 7,1%, ambas

ocorreram 30 dias após término dos tratamentos (SHI *et al*,2016). Renaud-Vilmer *et al.*, observaram que em mulheres com idade < 50 anos, a remissão da doença ocorreu em 2/3 dos casos, entretanto, nas pacientes ≥ 50 e ≤ 70 anos essa redução foi de 23%, e ainda nas que tinham idade > 70 anos não houve melhora. Esses resultados demonstraram que a remissão da doença está relacionada com a idade. Esse mesmo estudo apontou que houve 50% de recorrência 16 meses após tratamento, e 84% de reativação em 4 anos, sendo que nessas não houve correlação com a idade (RENAUD-VILMER *et al*,2004). Em nosso estudo evidenciamos, que a recidiva tem como sinalizador clínico, o prurido vulvar. Avaliando-se a correlação entre recorrência e prurido constatamos que 50% das mulheres **não** apresentaram ativação da doença, e nessas **não** houve prurido em 41,2%. Então, o prurido vulvar pode ser considerado um relevante marcador de recorrências a ser observado.

Em nosso trabalho, o fototipo de pele, demonstrou correlação relevante com prurido e recorrência. Houve uma tendência de recorrência nas mulheres fototipo IV, com prurido presente. Essa associação pode estar relacionada à barreira de melanina, modificando a absorção da Luz no tecido cutâneo, e uma importante relação entre coeficiente de absorção e espalhamento (μ_a/μ_s), denotando alta captação, levando a relatos de queimação na pele vulvar. Pacientes com peles fototipos IV, V ou VI, podem ter diferentes respostas aos lasers e apresentam risco aumentado de potenciais eventos adversos epidérmicos, entre eles despigmentação, bolhas, crostas, edema, fibrose, cicatrizes hipertróficas, além de recorrências mais frequentes de tratamentos de pele. Nesses fototipos de pele deve-se considerar padrões de doses e tipo de laser (WOOLERY-LLOYD,2011).

No entendimento da recorrência associada à imunomarcagem de laminina, pudemos averiguar que nos pós tratamento, o grupo que apresentou a menor expressão desse marcador foi o de PDT. Nessas mulheres a recorrência aumentou significativamente, demonstrando que a redução da expressão da laminina resulta na fragilidade da ancoragem epitelial, e isso se reflete na presença maciça de infiltrado inflamatório na derme e, conseqüente, reativação do LEV.

Na análise de correlação de alguns biomarcadores pós tratamento pudemos ainda inferir, que no GC houve uma correlação forte positiva entre laminina e CK10. Essa observação mostra que o corticoide melhora a laminina, porém, não promove proliferação celular. A explicação se dá pela ação antiinflamatória do corticoide, além da inibição de proliferação celular e dos queratinócitos basais, demonstrando a ausência de maturação epitelial e, conseqüentemente, aumento da expressão de CK10 (BAGCI *et al*, 2017).

Outra correlação relevante ocorreu entre a P53 e CK14, ambos diminuídos pela ação imunossupressora do corticoide, com redução do tamanho e proliferação de queratinócitos, e com isso sem renovação epitelial. Ainda nesse grupo (GC), observamos correlação discreta negativa entre CD34 e intensidade de prurido, ou seja, a melhora da vascularização epitelial, reduziu a intensidade do prurido.

Na PDT, correlações interessantes também puderam ser observadas. Houve forte correlação entre a P53 e o CK14. Nesse grupo, a P53 foi mais expressa no núcleo. Corroborando com esse mecanismo o CK14, também, mostrou-se aumentado, sinalizando regeneração epitelial, já discutido anteriormente. Ainda associado a todo esse processo de reparação e proliferação de células endoteliais, observamos outra importante correlação na PDT: o CD34 e o Ki67. O aumento desses marcadores pós PDT, são interessantes, pois se referem ao incremento da vascularização, e conseqüente melhora da isquemia epitelial. O aumento da vascularização e proliferação de células endoteliais atribuídas ao tratamento com PDT já foi descrito em literatura (EVANGELOU *et al*,2011). Finalmente, colaborando para o impacto desse tratamento sobre o curso da doença, correlação forte foi observada entre mastócitos e recorrência. A redução da expressão de mastócitos, gera a contenção de mediadores do processo inflamatório, e do processo *per se*, da hiperqueratose. Devido à redução dessas células, encontramos uma diminuição da histamina, o que terá impacto direto no arrefecimento do prurido e, ademais, conforme exposto anteriormente, esse sintoma indica recorrência. Dessa forma, reduzindo os mastócitos e o prurido, ocasionará, possivelmente, a redução da recorrência.

Na Terapia de Fotobiomodulação, a correlação forte inversa ocorreu entre mastócitos e CD34. Houve diminuição dos mastócitos, pós tratamento com laser, demonstrando sua ação antiinflamatória, na reparação tecidual e angiogênese, entre outras, levando as células/tecidos para a homeostase.

10- CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Esse foi um importante estudo sobre o impacto das terapias fotônicas, no LEV, comparando com o tratamento padrão-ouro: corticoide ultra potente. Não foram apenas observações clínicas, mas uma busca de elucidação de mecanismos dessas terapias sobre o

tecido biológico comprometido por uma doença inflamatória, crônica e autoimune, o que acresceu o desafio desse trabalho.

A preocupação em obter dados de segurança, considerar as novas propostas terapêuticas do ponto de vista da eficácia, possibilidade de novo protocolo dosimétrico, cumprem a premissa de um estudo fase II.

Avaliamos o impacto dos tratamentos sobre as alterações morfológicas do epitélio comprometido pela doença, mostrando o comportamento desse processo inflamatório que leva a degeneração hidrópica, hiperqueratose, infiltrado inflamatório liquenoide entre outras, que culminam com uma enfermidade que limita a vida das pacientes.

Dentro desse contexto, conseguimos mostrar a importante ação antiinflamatória, regenerativa, das terapias fotônicas, que expressaram um verdadeiro *turnover* celular, como visto na PDT até a Fotobiomodulação (TPBM), em alguns aspectos, assemelhando-se ao tratamento convencional (corticoide).

Averiguamos, além do processo inflamatório, qual seria a resposta dessas terapias sobre marcadores de proliferação celular, mudanças na histopatológica, aspecto clínico e, finalmente, sobre o curso da doença, quando observamos o quesito recorrência.

Foi possível observar que entre as terapias fotônicas, assim como no tratamento com corticoide, a análise final sobre o principal sintoma clínico demonstrou uma redução considerável do prurido vulvar. Isso é relevante, uma vez que este sintoma indicou recorrência de forma significativa em nosso estudo. Salientamos a comparação de todos os marcadores com pele vulvar normal, o que aumentou nosso entendimento quanto ao impacto dos tratamentos nesse trabalho.

Entre os tratamentos, foi possível inferir que o corticoide cumpriu sua função imunossupressora, antiproliferativa, conforme avaliado pelos biomarcadores, ora estudados.

A PDT, no que lhe concerne, evidenciou sua ação na proliferação celular/tissular, por ativação do reparo do DNA através da atuação da P53, estímulo dos queratinócitos basais, redução dos mastócitos e, conseqüentemente, processo inflamatório, tendo impacto sobre o prurido.

A TPBM, foi a que menos expressão teve sobre o epitélio, sem interferir de forma muito significativa na proliferação e nem na estratificação epitelial.

As recorrências observadas no GC são esperadas, assim como descritas em literatura, entretanto, a principal preocupação desse tratamento a longo prazo são os efeitos deletérios ao epitélio, apesar de não ter sido demonstrado esse resultado, houveram casos de candidíase pela imunossupressão local da pele vulvar.

O grupo da PDT, foi a melhor proposta em vários quesitos, entretanto, em estudos futuros talvez avaliar um ajuste dos padrões dosimétricos, possibilidade de um sistema transcutâneo de entrega do azul de metileno, o que poderia dar uma tolerabilidade maior na aplicação e, talvez, pudesse decrescer ainda mais as recorrências.

A TPBM, sem dúvida, precisa ser reestruturada quanto aos padrões dosimétricos. A nossa sugestão de dose para este estudo, não conseguiu inibir o processo inflamatório de forma significativa, nem tampouco manter a resposta clínica eficiente, o que gerou o maior índice de recorrências entre os tratamentos. Pelo observado em outros estudos com pele, nossa dose foi muito elevada para a proposta desse tratamento. Todavia, nosso estudo é pioneiro em LEV tratado com TPBM, assim esses ajustes de parâmetros serão necessários, contudo, a proposta é válida para doenças autoimunes e crônicas de pele, o que nos anima no desenvolvimento de novos protocolos.

Corroborando com todos esses aspectos, seria necessário considerar um número mais expressivo de pacientes, manter a avaliação de alguns marcadores e, considerar outros, entre eles, o CD44. Este é um receptor de superfície celular para o ácido hialurônico e a supressão desse marcador no LEV, sugere acúmulo maciço desse biopolímero na derme. A ação das terapias fotônicas sobre o CD44 pode nos ajudar a compreender parte da gênese desta enfermidade.

Houve perda de expressão de derme em parte do preparo das amostras. Com isso, seria necessário mais controle na confecção do material histológico, já que as peças de biópsia foram muito exíguas e no preparo acabamos por perder uma parte no TMA.

Esse estudo abre novas perspectivas e considerações para a aplicação de terapias fotônicas no LEV, porém, a continuidade desse processo com novos estudos e seguimento das pacientes por período longo, é imprescindível.

11- CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo, mostraram impacto positivo sobre a histopatologia, modificando o padrão de L2 para L1, por redução do processo inflamatório, melhora da hiperqueratose e consequente modulação epitelial.

Na análise da morfologia epitelial, a degeneração hidrópica foi reduzida em todos os grupos de tratamento de forma similar.

A hiperqueratinização diminuiu em todos os tratamentos, correspondendo à diminuição do espessamento do estrato córneo na epiderme, que ocorreu pelo processo inflamatório.

A hialinização do colágeno foi diminuída em todas as terapias, significando melhora do processo reparativo.

Houve uma contenção do infiltrado inflamatório em todos os tratamentos realizados, conforme observado em estudo piloto, incorrendo em decréscimo no risco de progressão da doença, atribuído a presença da inflamação de longa data.

O número de mastócitos também, sofreu diminuição após os tratamentos, todavia a resposta mais intensa ocorreu nas terapias fotônicas. Esse resultado propõe a melhora da inflamação, inibição da fibrose, reparo tecidual, além da diminuição da histamina, que irá influenciar no alívio do prurido vulvar.

A proteína P53, se encontrava reduzida no citoplasma em todos os tratamentos, que traduz redução do processo inflamatório, atuando no stress oxidativo/isquêmico. Entretanto, na PDT, esse marcador denotou positividade, em metade dos casos, no núcleo da célula, expressando apoptose, reparo do DNA com regulação e proliferação do ciclo celular. O Ki67, na PDT estava aumentado, significando incremento da angiogênese, proliferação endotelial e reparo tecidual.

A citoqueratina 10, marcador de diferenciação celular, esteve elevada no GC e TPBM, sendo que se expressou em queratinócitos diferenciados nas camadas supra basal e superficial do epitélio, não representando proliferação. Já a citoqueratina 14, que marca queratinócitos basais, e que se relaciona com proliferação celular, encontrava-se aumentada nas terapias fotônicas, mais significativa na PDT, relacionado com a renovação do epitélio.

A laminina teve sua expressão elevada em todos os tratamentos, sinalizando recuperação do alicerce epitelial, regeneração e homeostase tecidual.

A angiogênese foi marcada através do CD34, que revelou acréscimo em todos os tratamentos, proporcionou melhora da nutrição e oxigenação tecidual, bem como restabeleceu o aspecto da pele normal no LEV.

O sintoma clínico foi reduzido na maioria das pacientes, levando a inibição do comprometimento da pele vulvar e, ademais, auxiliou na restrição de casos de recorrências.

O seguimento de 18 meses indicou que a PDT foi o tratamento que exibiu o menor número de recorrências dentre todas as pacientes. Clinicamente, ficou evidente que o prurido vulvar foi o sinalizador das recorrências. Algumas condições, também, favoreceram as recidivas nesse estudo, entre elas, o fototipo de pele. A perda ou a redução da expressão de laminina, assim como a diminuição do CD34 e aumento do número de mastócitos, também, são considerados relevantes em ativações desta doença.

Em linhas gerais, entre as terapias fotônicas, a PDT foi a que expressou mais significativamente o reparo tecidual. O corticoide manteve-se como importante imunossupressor e antiinflamatório, mas com risco aumentado de efeitos colaterais na pele vulvar. A TPBM, necessita ser adequada quanto aos padrões dosimétricos.

A PDT e TPBM sinalizam uma nova possibilidade no tratamento de dermatoses crônicas. Não obstante, novos estudos multicêntricos e com maior casuística, ainda se fazem necessários para se estabelecer protocolos de aplicação eficazes e seguros, particularmente, na terapia de Fotobiomodulação.

12- REFERÊNCIAS

1. Perez-Lopez FR, Ceausu I, Depypere H, Erel CT, Lambrinouadaki I, Rees M, Schenck-Gustafsson K, Tremollieres F, van der Schouw YT, Simoncini T. EMAS clinical guide: Vulvar lichen sclerosus in peri and postmenopausal women. *Maturitas*, 74(3):279-28, 2013.
2. Murphy R. Lichen Sclerosus. *Dermatol Clin*, 28(4):707,2010.
3. Bleeker MCG, Visser PJ., Overbeek LIH, van Beurden M, Berkhof J.- Lichen Sclerosus: Incidence and Risk of Vulvar Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 25(8):1224-30 ,2016.
4. Tasker GL, Wojnarowska F. Lichen sclerosus. *Clin Exp Dermatol*, 28(2):128–133, 2003.
5. Gomes, P.A. Líquen escleroso vulvar: Estudo de marcadores Ki 67 e P53 antes e após o tratamento com clobetasol a 0,055, testosterona a 2% e um placebo.2005. 139f.Dissertação (Doutorado em Medicina pela Universidade de São Paulo) - USP, 2005.
6. Lynch PJ,Moyal-Barracco M,Scurry J, Stockdale C. 2011 ISSVD Terminology and classification of vulvar dermatological disorders: an approach to clinical diagnosis. *J Low Genit Tract Dis* ,16(4):339-44(2012).
7. Monsalvez V, Rivera R, Vanaclocha F. Lichen sclerosus. *Actas Dermosifiliogr*, 101(1):31-38, 2010.
8. Raspollini MR, Asirelli G,Taddei GL. The role of angiogenesis and COX-2 expression in the evolution of vulvar lichen sclerosus to squamous cell carcinoma of the vulva *Gynecologic Oncology*, 106 :567–571,2007.
9. Kreuter A, Wischniewski J, Terras S, Altmeyer P, Stucker M, Gambichler T. Coexistence of lichen sclerosus and morphea: A retrospective analysis of 472 patients with localized scleroderma from a German tertiary referral center. *J Am Acad Dermatol*, 67(6):1157-1162 ,2012
10. Terlouw A, Santegoets LAM, van der Meijden WI, Heijmans-Antonissen C, Swagemakers SMA, van der Spek PJ, Ewing PC, van Beurden M, Helmerhorst TJM, Blok LJ. An Autoimmune Phenotype in Vulvar Lichen Sclerosus and Lichen Planus: A Th1 Response and High Levels of MicroRNA-155. *J Invest Dermatol*, 132(3):658-666, 2012.
11. Oyama N, Chan I, Neill SM, Hamada T, South AP, Wessagowit V, Wojnarowska F, D'Cruz D, Hughes GJ, Black MM, McGrath JA. Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosus. *Lancet*, 362(9378):118-123 ,2003.

12. Gambichler T, Kammann S, Tigges C, Kobus S, Skrygan M, Meier JJ, Kohler CU, Scola N, Stucker M, Bechara FG, Altmeyer P, Kreuter A. Cell cycle regulation and proliferation in lichen sclerosus. *Regul Peptides*, 167(2-3):209-214,2011.
13. Farrell AM, Dean D, Millard PR, Charnock FM, Wojnarowska F. Cytokine alterations in lichen sclerosus: an immunohistochemical study. *Brit J Dermatol*, 155(5):931-940, 2006.
14. Fistarol D, Fistarol SK, Itin P.H. Diagnosis and Treatment of Lichen Sclerosus. *Am J Clin Dermatol*, 14:27-47,2013.
15. Belotto, R.A. Líquen escleroso vulvar: fotobiomodulação e terapia fotodinâmica como alternativas à corticoterapia.2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde) - UNINOVE, 2015.
16. Gambichler T, Terras S, Kreuter A, Skrygan M. Altered global methylation and hydroxymethylation status in vulvar lichen sclerosus: further support for epigenetic mechanisms. *Brit J Dermatol*, 170(3):687-693,2014.
17. Robboy J.S. Robboy's Pathology of the female reproductive tract..Elsevier ,2nd ed, 2009.
18. Balbino CA,Pereira LM,Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização:uma revisão.RBCF , 41(1):28-51, 2005.
19. Robbins e Cotran. Patologia: Bases patológicas das doenças. 8^a ed. Elsevier,2010.
20. Godoy CAP, Teodoro WR,Velosa APP, Garippo AL, Eher EM, Parra ER, Sotto MN, Capelozzi VL.Unusual remodeling of the hyalinization band in vulval lichen sclerosus by type V collagen and EMC1 Balbino protein. *Clinics*,70(5):356-362, 2015.
21. Almeida Jr. HL,Rossi G,Karan OR,Rocha NM, Marques e Silva R. Genética Molecular das Epidermólises Bolhosas. *An Bras Dermatol*, 89(2):347-59,2014.
22. Almeida Jr HL, Bicca EBC, Breunig JA, Rocha NM, Marques e Silva R. Microscopia eletrônica de varredura do líquen escleroso. *An. Bras. Dermatol*,88(2):247-9,2014.
23. Chi CC,Dphil MMS, Kirtschig G, Baldo M, Lewis F, Wang SS, Wojnarowska DM. Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on topical interventions for genital lichen sclerosus.*J Am Acad Dermatol*, 67:305-312, 2012.
24. Cattaneo A, De Marco A, Sonni L, Bracco GL, Carli P, Taddei GL.Clobetasol vs testosterone in the treatment of lichen sclerosus of the vulvar region. *Minerva Ginecol*, 44(11):567-71, 1992.
25. Pérez-López FR, Vieira-Baptista P. Lichen sclerosus in women: a review. *Climateric*, 20(4): 339-347, 2017.
26. Olejek A, Stepiewska K, Gabriel A, Kozak-Darmas I, Jarek A, Kellas-Slecicka S, Bydlinski F, Sieron-Stoltny K, Horak S, Chelmicki A, Sieron A. Efficacy of

- Photodynamic Therapy in Vulvar Lichen Sclerosus Treatment Based on Immunohistochemical Analysis of CD34, CD44, Myelin Basic Protein, and Ki67 Antibodies. *Int J Gynecol Cancer*, 20(5):879-887 ,2010.
27. Kim M, Jung HY, Park HJ. Topical PDT in the treatment of Benign Skin Diseases: Principles and New Applications. *Int J Mol Sci*, 16: 23259-23278, 2015.
 28. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, Hamblin MR. Low-Level Laser (Light) Therapy (LLLT) in Skin: Stimulating, Healing, Restoring. *Semin Cutan Med Surg*, 32(1):41-52 ,2013.
 29. Fiorio FB, Santos SA, de Melo Rambo CS, Dalbosco CG, Serra AJ, de Melo BL, Leal-Junior ECP, de Carvalho PTC. Photobiomodulation therapy action in wound repair skin induced in aged rats old: time course of biomarkers inflammatory and repair. *Lasers Med Sci*, 32(8):1769-1782 ,2017.
 30. Nieuwenhof HP, Hebeda KM, Bulten J, Otte-Holler I, Massuger LFAG, e Hullu JA, Kempen LCLT. Specific intraepithelial localization of mast cells in differentiated vulvar intraepithelial neoplasia and its possible contribution to vulvar squamous cell carcinoma development. *Histopathology*, 57: 351–362, 2010.
 31. Maluf LC, Barros JA, Macahdo Filho CD. Mastocytosis. *Na Bras Dermatol*, 84(3):213-25, 2009.
 32. van der Avoort IA, van der Laak JA, Otte-Höller I, van de Nieuwenhof HP, Massuger LF, de Hullu JA, van Kempen LC. The prognostic value of blood and lymph vessel parameters in lichen sclerosus for vulvar squamous cell carcinoma development: an immunohistochemical and electron microscopy study. *Am J Obstet Gynecol*, 203(2):167, 2010.
 - 33 Hantschmann P, sonja Sterzer S, udo Jeschke U, Friese K. P53 expression in Vulvar Carcinoma, Vulvar Intraepithelial Neoplasia, Squamous Cell Hyperplasia and Lichen Sclerosus. *Anticancer research*, 25: 1739-1746 ,2005.
 34. Carlson BC, Hofer MD, Ballek N, Yang XJ, Meeks JJ, Gonzalez CM. Protein markers of malignant potential in penile and vulvar lichen sclerosus. *J Urol*. 190(2):399-406, 2013.
 35. Abrantes ABP, Dias GC, Souza-Pinto NC, Baptista MS. p53-Dependent and p53-Independent Responses of Cells Challenged by Photosensitization. *Photochem Photobiol*, doi: 10.1111/php.13019, 2018.
 36. McFadden JP, Kimber I. A Review on the Potential Role of Basement Membrane Laminin in the Pathogenesis of Psoriasis. *Scand J Immunol*, 83(1):3-9, 2016.
 37. Ambra Pozzia, Peter D. Yurchencob, and Renato V. Iozzo. The nature and biology of basement membrane. *Matrix Biol*, 57-58: 1–11, 2017.

38. Lipkin D, Kwon Y. Therapies and Nursing Care of Women with Vulvar Dermatologic Disorders. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*, 43(2):246-252 ,2014.
39. Burrows LJ, Creasey A, Goldstein AT. "The Treatment of Vulvar Lichen Sclerosus and Female Sexual Dysfunction". *J Sex Med*; 8(1):219-222, 2011.
40. Brodrick B, Belkin ZR, Goldstein AT. Influence of treatments on prognosis for vulvar lichen sclerosus: facts and controversies. *Clin Dermatol*, 31(6):780-6, 2013
41. Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Antunes Cruz, Ferreira J, Filipe P. Mechanism of Action of Topical Corticosteroids in psoriasis. *Intern J Endocrinol*, 1-16, 2012.
42. Schoepe S.; Schake H.; May E.; Asadullah K. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. *Experimental Dermatology.*,15(6):406-420, 2006.
43. Radoja N, Komine M, Jho SH, Blumenberg M, Tomic-Canic M. Novel Mechanism of Steroid Action in Skin through Glucocorticoid Receptor Monomers. *Molecular and Cellular Biology*,20(12):4328-4339, 2000.
44. Slominsk AT, Manna PR, Robert C, Tuckey RC. Cutaneous glucocorticosteroidogenesis: securing local homeostasis and the skin integrity. *Exp Dermatol*, 23(6): 369–374,2014.
45. Thorstensen KA, Birenbaum DL. Recognition and management of vulvar dermatologic conditions: lichen sclerosus, lichen planus and lichen simplex chronicus. *J Midwifery Womens Health*, 57(3): 260-275, 2012.
46. Andrew Lee M.B.B.S.;Bradford J. , Fischer G .Long term management of adult vulvar lichen sclerosus : a prospective cohort study of 507 women. *JAMA Dermatol*, 151(10):1061-7, 2015.
47. Weindl G, Castello F, Schaefer-Korting M. Evaluation of anti-inflammatory and atrophogenic effects of glucocorticoids on reconstructed human skin. *Altern Lab Anim*, 39(2):173-187, 2011.
48. Dey V.K. Misuse of topical corticosteroids: A clinical study of adverse effects.*Indian Dermatol online J.*,5(4):436-440, 2014.
49. Virgili A, Borghi A, Toni G, Minghetti S, Corazza M. First randomized trial on clobetasol propionate and mometasone furoate in the treatment of vulvar lichen sclerosus: results of efficacy and tolerability. *Br J Dermatol*, 171(2):388-96,2014.
50. Chavantes, M.C. *Laser em Bio-Medicina Princípios e prática*. 1ª ed. Atheneu, 2008.281p.
51. Karu T.I. Photobiology of low power laser effects. *Health Physics*, 56(5):691-704, 1989.
52. Ascencio M, Collinet P, Cosson M, Vinatier D, Mordon S. The place of photodynamic therapy in gynecology, *Gynecol Obstet Ferti*, 35(11):1155-1165,2007.

53. Hillemanns P, Untch M, Prove F, Baumgartner R, Hillemanns M, Korell M. Photodynamic therapy of vulvar lichen sclerosus with 5-aminolevulinic acid. *Obstet Gynecol*, 93(1):71-74, 1999.
54. Prodromidou A, Chatziioannou E, Daskalakis G, Stergios K, Pergialiotis V. Photodynamic Therapy for Vulvar Lichen Sclerosus-A Systematic Review. *J Low Genit Tract Dis*, 22(1):58-65, 2018.
55. Osiecka BJ, Nockowski P, Jurczyszyn K, Ziolkowski P. Photodynamic therapy of vulvar lichen sclerosus et atrophicus in a woman with hypothyreosis - Case report. *Photodiagn Photodyn*, 9(2):186-188, 2012.
56. Sotiriou E, Panagiotidou D, Ioannidis D. An open trial of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for vulvar lichen sclerosus. *Eur J Obstet Gyn R B*; 141(2):187-188, 2008.
57. Biniszkiewicz T, Olejek A, Kozak-Darmas I, Sieron A. Therapeutic effects of 5-ALA-induced photodynamic therapy in vulvar lichen sclerosus. *Photodiagn Photodyn*, 2(2):157-160, 2005.
58. Taub AF. Photodynamic therapy: Other uses. *Dermatol Clin*; 25(1):101, 2007.
59. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc*, 46(1):24-29, 2013.
60. Romero A, Hernandez-Nunez A, Cordoba-Guijarro S, Arias-Palomo D, Borbujo-Martinez J. Treatment of recalcitrant erosive vulvar lichen sclerosus with photodynamic therapy. *J Am Acad Dermatol*; 57(2): S46-S47, 2007.
61. Korbelik M. Cancer vaccines generate by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*, 10(5):664-669, 2011.
62. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin M.R. Photodynamic Therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med*, 43(7):755-767, 2011
63. Nayak C.S. Photodynamic therapy in dermatology. *Indian J Dermatol. Venereol. Leprol.*, 71(3):155-160, 2005.
64. Sharma KS, Mroz P, Dai T, Huang Y.Y.; St Denis T.G.; Hamblin M.R. Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What is the difference? *Isr J Chem.* ,52(8-9):691-705, 2012.
65. Vano-Galvan S, Fernandez-Guarino M, Bea-Ardebol S, Perez B, Harto A, Jaen P. Successful treatment of erosive vulvar lichen sclerosus with methylaminolaevulinic acid and laser-mediated photodynamic therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 23(1):71-2, 2009.

66. Khanal A, Bui MPN, Seo SS. Microgel-Encapsulated Methylene Blue for the Treatment of Breast Cancer Cells by Photodynamic Therapy. *J Breast Cancer*, 17(1):18-24, 2014.
67. Caetano W, Haddad PS, Itri R, Severino D, Vieira VC, Baptista MS, Schroder AP, Marques CM. Photo-induced destruction of giant vesicles in methylene blue solutions. *Langmuir*, 23(3):1307-1314, 2007.
68. Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, Severino D, Turchiello RDF, Baptista MS. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagn Photodyn*, 2(3):175-191, 2005.
69. Uchoa A.;Baptista S.M. Terapia fotodinâmica : mecanismos e perspectivas de desenvolvimento de novos fotossensibilizadores . *J Bras Laser*,1(4):10-22, 2007.
70. Wainwright M. The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2(4):263-72, 2005.
71. Gáspar L. Professor Endre Mester, the father of photobiomodulation. *J Laser Dent.*, 17(3):146-148, 2009.
72. Karu T.I. Photobiological fundamental of low power laser therapy. *Quantum Electron*, 23:1703-1717, 1987.
73. Holanda VM, Chavantes MC, Wu X, Anders JJ. The mechanistic basis for photobiomodulation therapy of neuropathic pain by near infrared laser light. *Lasers Surg Med*. 49(5):516-524, 2017.
74. Piva JAAC, Abreu EMC, Silva VC, Nicolau RA. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(5):947-54, 2011.
75. Trajano LASN, Trajano ETL, Silva SLP, Teixeira AF, Mencialha AL, Stumbo AC, Souza AF. Photobiomodulation effects on mRNA levels from genomic and chromosome stabilization genes in injured muscle. *Lasers Med Sci*, 33(7):1513-1519, 2018.
76. Haefner H.K.; Aldrich N.Z.; Dalton V.K.; Gagné H.M.; Marcus S.B.; Patel D.A.; Berger MB. The impact of vulvar lichen sclerosus on sexual dysfunction. *J Women's Health*. 2014;23(9):765-770.
77. Funaro D, Lovett A, Leroux N, Powell JA. double –blind, randomized prospective study evaluating topical clobetasol propionate 0.05% versus topical tacrolimus 0.1% in patients with vulvar lichen sclerosus. *JAAD*, 84-91, 2014.
78. Schlosser BJ, Ginat W, Mirowski GW. Lichen Sclerosus and Lichen Planus in Women and Girls. *Clin Obst Gynecol*, 58(1): 125-142, 2015.

79. Shaw PJ, McDermott MF, Kanneganti TD. Inflammasomes and autoimmunity. *Trends Mol Med*, 17(2):57-64, 2011.
80. Hoang LN, Kay J, Park KJ, Soslow RA, Murali R. Squamous precursor lesions of the vulva: current classification and diagnostic challenges. *Pathology*, 48(4): 291–302, 2016.
81. Kirtschig G. et al. Evidence-based (S3) Guideline on (anogenital) Lichen sclerosus JEADV, 29: e1–e43, 2015
82. Guerrero ABS, Venkatesan A. Inflammatory Vulvar Dermatoses clinical obstetrics and gynecology, 58 (3), 464–475, 2015.
83. Johnson E, Groben P, Eanes A, Iyer P, Joseph Ugoeke J, and Denniz Zolnoun. Vulvar Skin Atrophy Induced by Topical Glucocorticoids. *J Midwifery Womens Health*. 57(3): 296–299, 2012.
84. Joensen J, Demmink JH, Johnson MI, Iversen VV, Lopes-Martins RAB, Bjordal JM. The Thermal Effects of Therapeutic Lasers with 810 and 904 nm Wavelengths on Human Skin. *Photomed Laser Surg*, 29(3):145-153,2011.
85. Zhang P, Wu MX. A clinical review of phototherapy for psoriasis. *Lasers Med Sci*, 33:173–180, 2018.
86. Mills SJ, Farrar MD, Ashcroft GS, Griffiths CEM, Hardman MJ, Rhodes LE. Topical photodynamic therapy following excisional wounding of human skin increases production of transforming growth factor- β 3 and matrix metalloproteinases 1 and 9, with associated improvement in dermal matrix organization*. *British Journal of Dermatology*, 171: 55–62, 2014
87. Santos SA, Serra AJ, Stancker TG, Simões MCB, Dos Santos Vieira MA Leal-Junior EC, Prokic M, Vasconsuelo A, Santos SS, de Carvalho PTC. Effects of Photobiomodulation Therapy on Oxidative Stress in Muscle Injury Animal Models: A Systematic Review, 5273403, 2017
88. Regauer S, Liegl B, Reich O. Early vulvar lichen sclerosus: a histopathological challenge. *Histopathology*, 47: 340–347, 2005.
89. Mollet I, Ongenaes K, Naeyart JM. Origin, Clinical Presentation, and Diagnosis of Hypomelanotic Skin Disorders. *Dermatol Clin.*, 25: 363-371, 2007.
90. Evangelou G, Farrar MD, White RD, Sorefan NB, Wright KP, McLean K, Andrew S, REB, Rhodes LE. Topical aminolaevulinic acid–photodynamic therapy produces an inflammatory infiltrate but reduces Langerhans cells in healthy human skin in vivo *British Association of Dermatologists* 165: 513–519,2011.
91. Shi I, Miao F, Zhang LL, Zhang GL, Wang PR, Jie JI, Wang XI, Huang Z, Wang HW, Wang XL. Comparison of 5-Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy and Clobetasol Propionate in Treatment of Vulvar Lichen Sclerosus. *Acta Derm Venereol*, 96: 684–688, 2016

92. Souza Jr DA, Santana AC, Silva EZM, Oliver C, Jamur MC. The role of Mast Cell Specific Chymases and Tryptases in Tumor Angiogenesis. *BioMed Res International*, 142359, 2015.
93. Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic Functions of the Tumor Suppressor p53. *Nature*, 30; 458(7242): 1127, 2009.
94. Pinto AP, Degen M, Barron P, Crum CP, Rheinwald JG. Phosphorylated S6 as an immunohistochemical biomarker of vulvar intraepithelial neoplasia. *Modern Pathology*, 26, 1498–1507, 2013.
95. Cazaña TG, Salazar N, Álvarez VJ, Gonzalez S, Juarranz A, Gilaberte Y. Comparative study of the clinical, histological, and biological characteristics of squamous cell carcinomas in areas previously treated with photodynamic therapy. *Eur J Dermatol*, 27(6); 627-34, 2017
96. Bagazgoitia, L, Cuevas Santos J, Juarranz A, Jaén P. Photodynamic therapy reduces the histological features of actinic damage and the expression of early oncogenic markers. *British Association of Dermatologists* 165: 144–151, 2011.
97. Shefer G, Partridge AT, Heslop L, Gross JGG, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science*, 115:1461-1469, 2002.
98. Wei X, Fricker K, Enk AH, Hadaschik EN. Altered expression of keratin 14 in lesional epidermis of autoimmune skin diseases. *International Journal of Dermatology* 55: 620–628, 2016.
99. Nesi-Reis V, Lera-Nonose DSSL, Oyama J, Silva-Lalucci MPP, Demarchi IG, Aristides SMA, Teixeira JJV, Silveira TGV, Lonardoní MVC. Contribution of photodynamic therapy in wound healing: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 21:294-305, 2018.
100. Megna M, Fabbrocini G, Marasca C, Monfrecola G. Photodynamic Therapy and Skin Appendage Disorders: A Review. *Skin Appendage Disord*, 2:166–176, 2016.
101. Sperandio FF, Simões A, Corrêa L, Aranha AC, Giudice FS, Hamblin MR, Sousa SC. Low-level laser irradiation promotes the proliferation and maturation of keratinocytes during epithelial wound repair. *J Biophotonics*. 8 (10):795-803, 2015.
102. Frances C, Wechsler J, Meimon G, Labat-Robert J, Grimaud JA, Hewitt J. Investigation of intercellular matrix macromolecules involved in lichen sclerosus. *Acta Derm Venereol*. 63(6):483-90, 1983.
103. Marren P, Dean D, Charnock M, Wojnarowska F. The basement membrane zone in lichen sclerosus: an immunohistochemical study. *Br J Dermatol*. 136(4):508-14, 1997.

104. Bağcı IS, Horváth ON, Ruzicka T, Sárdy M. Bullous pemphigoid. *Autoimmun Rev.*16 (5):445-455, 2017.
105. Whelan HT et al. Effect of NASA Light-Emitting Diode Irradiation on Molecular Changes for Wound Healing in Diabetic Mice. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, 21 (2), 2003.
106. Renaud-Vilmer C, Cavelier-Balloy B, Porcher R, Dubertret L. Vulvar Lichen Sclerosus-Effect of Long-term Topical Application of a Potent Steroid on the Course of the Disease. *Arch Dermatol*, 140:709-712, 2004.
107. Woolery-Lloyd H, Viera MH, Valins W. Laser therapy in black skin. *Facial Plast Surg Clin North Am.* , 19(2):405-16, 2011.

13. APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome _____ do
voluntário: _____

Endereço: _____

_____, Cidade: _____ CEP: _____

Telefone _____ para contato: (____)

e-
mail: _____

1. Título do Trabalho: Avaliação Clínica, Histopatológica e Imunohistoquímica do Líquen Escleroso Vulvar tratado com Terapias Fotônicas.

2. Objetivos: A senhora está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa com objetivo de comparar os efeitos da aplicação do corticoide, da terapia fotodinâmica ou do laser em baixa intensidade no líquen escleroso.

3. Justificativa: O líquen escleroso é uma doença da pele vulvar, crônica, que promove várias alterações locais, entre elas a modificação de cor de pele, coceira intensa, ardor, dor, podendo levar a dificuldades de urinar, evacuar, como também limitar a vida sexual. A terapia fotodinâmica é um tratamento que associa uma luz e um corante e trata diversas doenças da pele podendo ser utilizado também na pele da vulva e o laser em baixa intensidade é um tratamento que utiliza uma luz sem corante e que visa melhorar a inflamação da pele. Esse estudo tem o objetivo de comparar a terapia convencional (pomada) com a terapia fotodinâmica e o laser em baixa intensidade para obter resposta satisfatória no tratamento do líquen escleroso da vulva.

4. Procedimento Clínico: A pesquisa acontecerá às quartas-feiras, semanalmente. A senhora será sorteada em um dos grupos de estudo e terá a definição do seu tratamento que poderá ser pomada, terapia fotodinâmica ou laser em baixa intensidade. Terminado o tratamento semanal, a senhora deverá retornar após 30, 60, 90 dias do término das aplicações. A senhora realizará a coleta de sangue e biópsia da pele vulvar antes do início do tratamento, para confirmar a doença, e ao final do tratamento os mesmos exames serão repetidos. Nessa pesquisa, um grupo fará medicação em casa e os outros dois grupos aqui mesmo no ambulatório.

Antes de iniciar a pesquisa será aplicado um questionário, onde serão perguntados dados importantes, como por exemplo, nome completo, idade, se a senhora é fumante, se tem problemas de saúde, há quanto tempo apresenta a doença e se procurou atendimento médico. A senhora terá 20 minutos para preencher o questionário, caso tenha dificuldade para leitura e escrita, ajudaremos permitindo que leve este documento para algum familiar que a ajude a preencher ou ajudaremos lendo e explicando o que está escrito. Somente após o preenchimento deste documento que a senhora será aceita para a pesquisa e, por sorteio, informaremos qual será o seu grupo de tratamento.

A senhora será selecionada em um dos três grupos. O primeiro grupo constará pacientes que receberão o tratamento convencional com pomada local (propionato de clobetasol 0,05%). As pacientes selecionadas no segundo grupo serão submetidas à aplicação somente do laser em baixa intensidade e não receberão o corante azul de metileno. O terceiro grupo constará de pacientes que receberão laser com o corante azul de metileno (terapia fotodinâmica). Todas as pacientes farão exames de sangue e biópsia (retirada de um pequeno pedaço de pele para diagnóstico que será realizada com pinça específica) no início e no final do tratamento. A biópsia pode gerar uma pequena dor, pois iremos injetar no local um anestésico chamado lidocaína que pode arder um pouco, mas após um minuto será possível realizar a biópsia sem dor.

Após o resultado da biópsia confirmando o líquen escleroso, o grupo que irá aplicar a pomada será orientado e receberá 30 sachês com pomada (propionato de clobetasol 0,05%) que será aplicado pela pele vulvar uma vez ao dia por 30 dias. O grupo que irá receber apenas o laser fará uma aplicação semanal no ambulatório. O grupo laser e corante (PDT) fará uma aplicação semanal, também, onde receberá a

injeção local azul de metileno sobre a área doente e será aplicado o laser logo a seguir.

5. Desconfortos ou Riscos Esperados: Esse estudo busca uma forma de tratamento que consiga deixar a paciente livre dos sintomas e ainda melhorar o aspecto da pele. Dos efeitos adversos poderemos encontrar alguns sintomas durante e minutos após a aplicação da luz, como por exemplo: dor tipo queimação, sensação de ardência ou coceira somente na área tratada (apenas durante a aplicação do laser), além de inchaço local principalmente no grupo laser com corante que pode durar até 7 dias. Esta pesquisa poderá lhe trazer os riscos e desconfortos citados, mas espera-se que o conjunto de benefícios ultrapasse os riscos. Ao término da pesquisa a senhora será informada dos resultados e benefícios do estudo (melhora do aspecto da pele e dos sintomas) e todo seu acompanhamento continuará a ser realizado no ambulatório de Ginecologia-Laserterapia do Centro de Referência e Saúde a Mulher.

6. Métodos Alternativos Existentes: Atualmente, o tratamento convencional é realizado com pomada no local da lesão (propionato de clobetasol 0,05%), causando afinamento da pele e deixando-a frágil.

7. Retirada do Consentimento: É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento, podendo a senhora deixar de participar do estudo sem qualquer prejuízo a continuidade do seu tratamento na instituição.

8. Garantia do sigilo: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com os resultados das outras pacientes, porém não será divulgada a identificação de nenhuma paciente. A senhora terá o direito de ser mantida informada sobre os resultados parciais das pesquisas, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores. Os resultados serão publicados e apresentados na comunidade científica, mas jamais sua identidade será revelada.

9. Formas de Ressarcimento das Despesas Decorrentes da Participação na Pesquisa: Não há despesas pessoais para a participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será

absorvida pelo orçamento da pesquisa. Haverá o compromisso de pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente na pesquisa.

10. Local da Pesquisa: Todas as pacientes serão atendidas no ambulatório de Ginecologia-Laserterapia do Centro de Referência e Saúde da Mulher- Hospital Pérola Byington, localizado à Rua Santo Antônio 630- 4º andar, Telefone (11) 3292-9026, pela médica ginecologista Renata Ap. Belotto, CRM 59284.

11. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos participantes de pesquisas em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento das pesquisas dentro dos padrões éticos (Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa envolvendo Seres Humanos – Res. CNS nº 466/12). O Comitê de Ética é responsável pela avaliação e acompanhamento dos protocolos de pesquisa no que corresponde aos aspectos éticos.

Endereço do Comitê de Ética da UNINOVE: Rua. Vergueiro nº235/249- 1º andar- Liberdade- São Paulo-SP, CEP: 01504-001, Fone: 3385-9197, comitedeetica@uninove.br

12. Nome Completo e telefones dos Pesquisadores (Alunos e Orientador) para contato: Em qualquer etapa do estudo a senhora terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é Profa Dra Maria Cristina Chavantes, que pode ser encontrada no campus Vergueiro da UNINOVE, situado na Rua Vergueiro nº 235, São Paulo, fone: 11 3385-9222. A médica responsável é a ginecologista e doutoranda Dra. Renata Ap. Belotto, CRM 59284, fone 11 3292- 9026

13. Eventuais intercorrências que vieram a surgir no decorrer da pesquisa poderão ser discutidas pelos meios próprios.

14. Consentimento pós-informação:

Eu, _____, após leitura e compreensão deste termo de informação e consentimento, entendo que minha participação é voluntária, e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem

prejuízo algum. Confirmando que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo no meio científico.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador

Assinatura da Testemunha

14. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Eventos	2016			2017			2018
	J an- Abr	A br- Jul	A go- Dez	J an- Abr	M ai- Ago	S et- Dez	J an- Abr
Aquisição de equipamentos e material de consumo	X						
Recrutamento das pacientes	X						
Biópsia inicial + Preparo das lâminas	X						
Análise histológica para confirmação do LEV	X						
Aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido		x					
Início dos tratamentos			x				
Análise clínica		x					
Término dos tratamentos			x				

Biópsia final + Preparo das lâminas				X			
Análise histológica				X			
Análise imuno-histoquímica				X			
1º Relatório científico					x		
Organização dos dados					x		
Análise estatística					x		
Participação em congressos e publicação de artigos					x	x	
Relatório Final							x

