CLARA MARINO ESPRICIGO BOTARI

ANÁLISE DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS NO INFILTRADO SUBEPITELIAL DA DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO CRÔNICA DE MUCOSA BUCAL

BOTUCATU
2012

CLARA MARINO ESPRICIGO BOTARI

ANÁLISE DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS NO INFILTRADO SUBEPITELIAL DA DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO CRÔNICA DE MUCOSA BUCAL

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista – Unesp, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação: Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Dra. Ana Gabriela Sálvio

BOTUCATU
2012

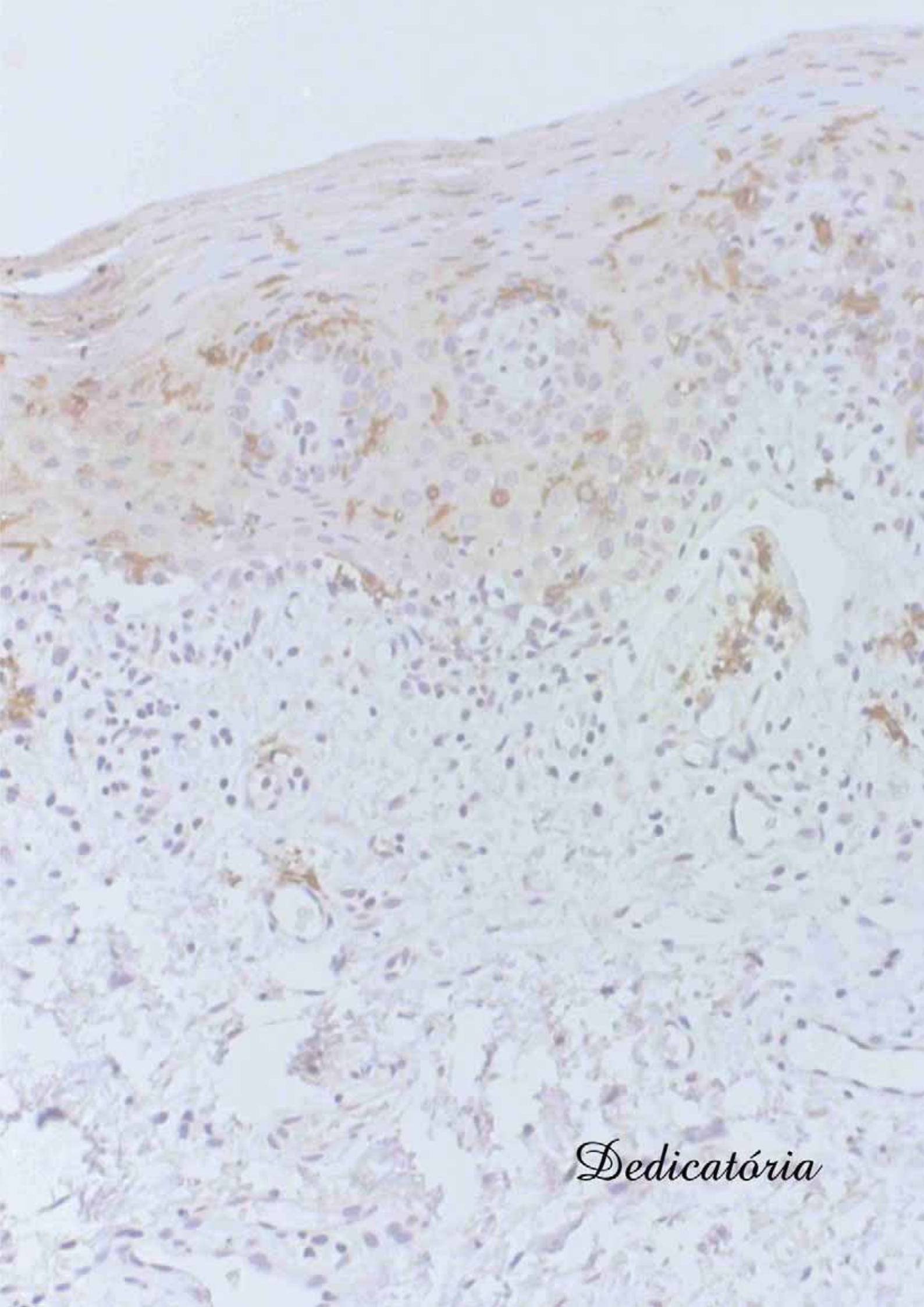
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ***ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE***

Botari, Clara Marino Espricigo.
Análise das subpopulações de células dendríticas no infiltrado subepitelial da doença exerto contra hospedeiro crônica de mucosa bucal / Clara Marino Espricigo Botari. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Ana Gabriela Salvio
Capes: 21102007

1. Células-tronco – Transplante. 2. Mucosa bucal. 3. Células hematopoiéticas primitivas.

Palavras-chave: Células dendríticas; Doença enxerto contra hospedeiro; Transplante de células tronco hematopoiéticas.

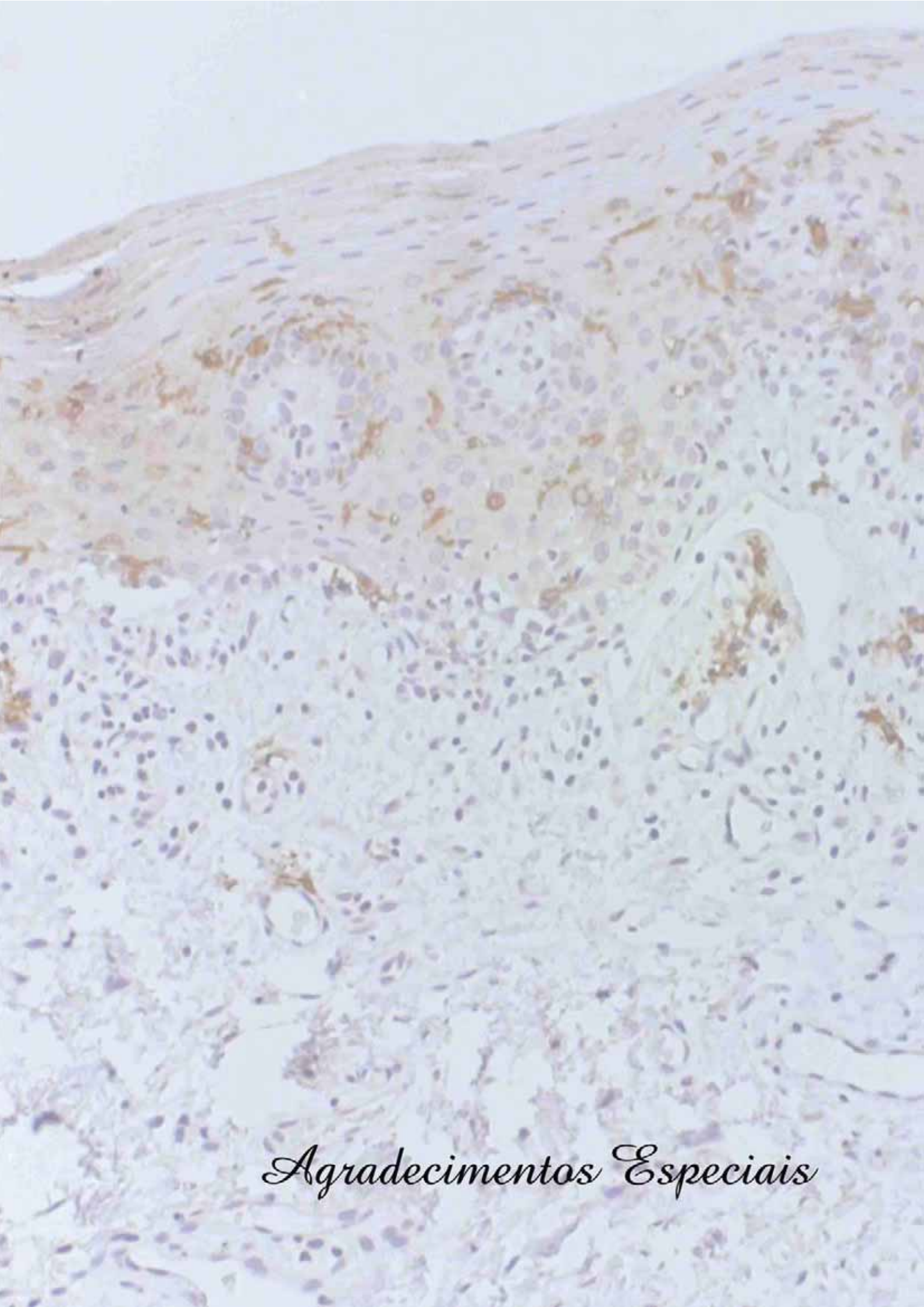


Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família:

Ao meu esposo, David Luiz Botari, aos meus pais Eliseu José Espricigo e Regina Célia Marino Espricigo, à minha irmã Ana Elisa Marino Espricigo.

A vocês todo o meu amor!



Agradecimentos Especiais

Ao meu esposo, David Luiz Botari, por estar ao meu lado em todos os momentos. Por sua paciência e cumplicidade que me ajudaram a chegar até aqui.

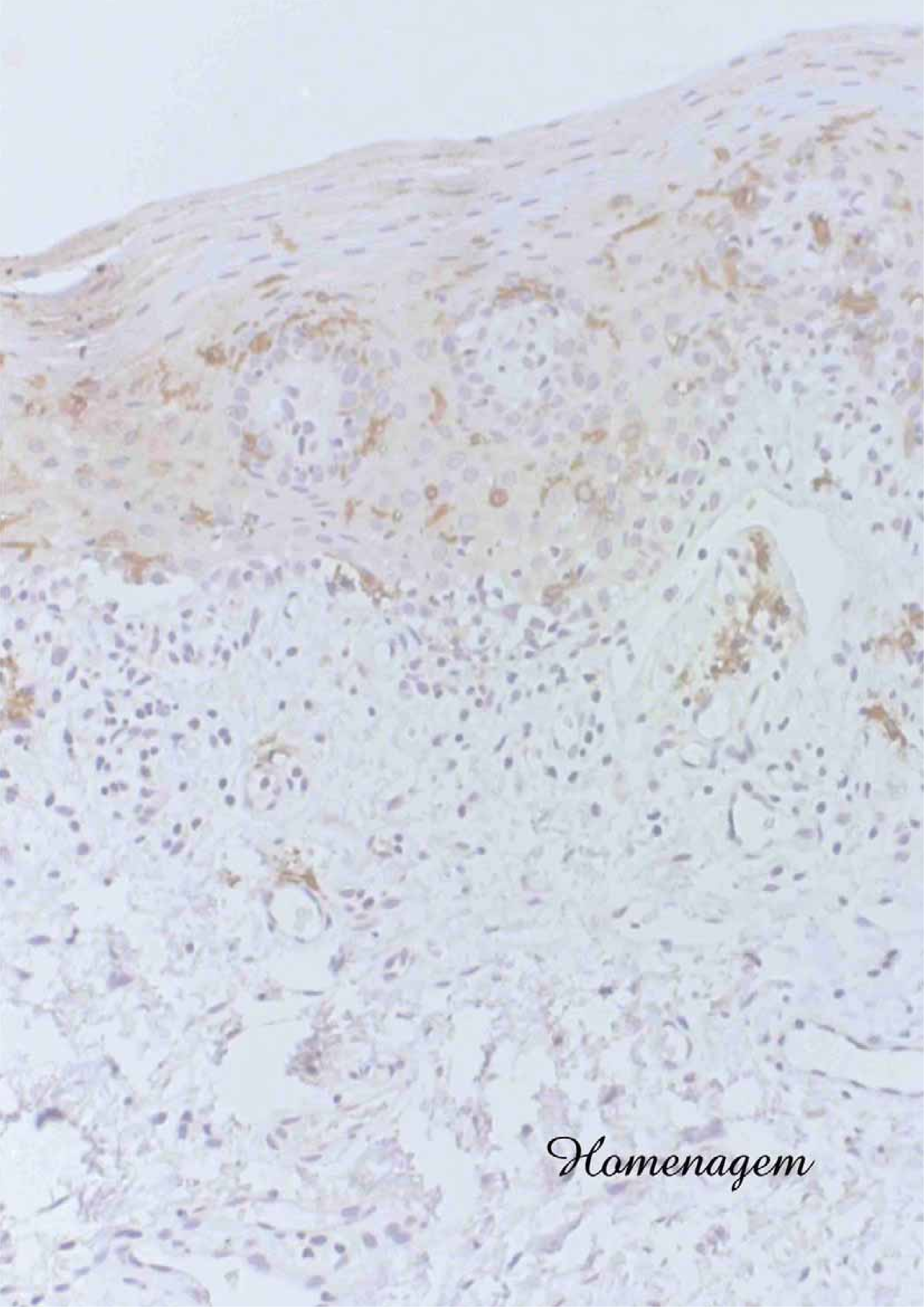
Aos meus pais, Eliseu e Regina, meus maiores exemplos de vida, tudo o que sou é devido aos seus ensinamentos, essa conquista divido com vocês.

À minha irmã Ana Elisa, pelo apoio, amizade e carinho.

Ao meu Tio Dr. Celso Luiz Marino, que como Biólogo que apresentou a esta fascinante profissão.

Aos meus sogros Edméia e José Luiz, pelo respeito e carinho que sempre tiveram comigo.

Agradeço a DEUS,

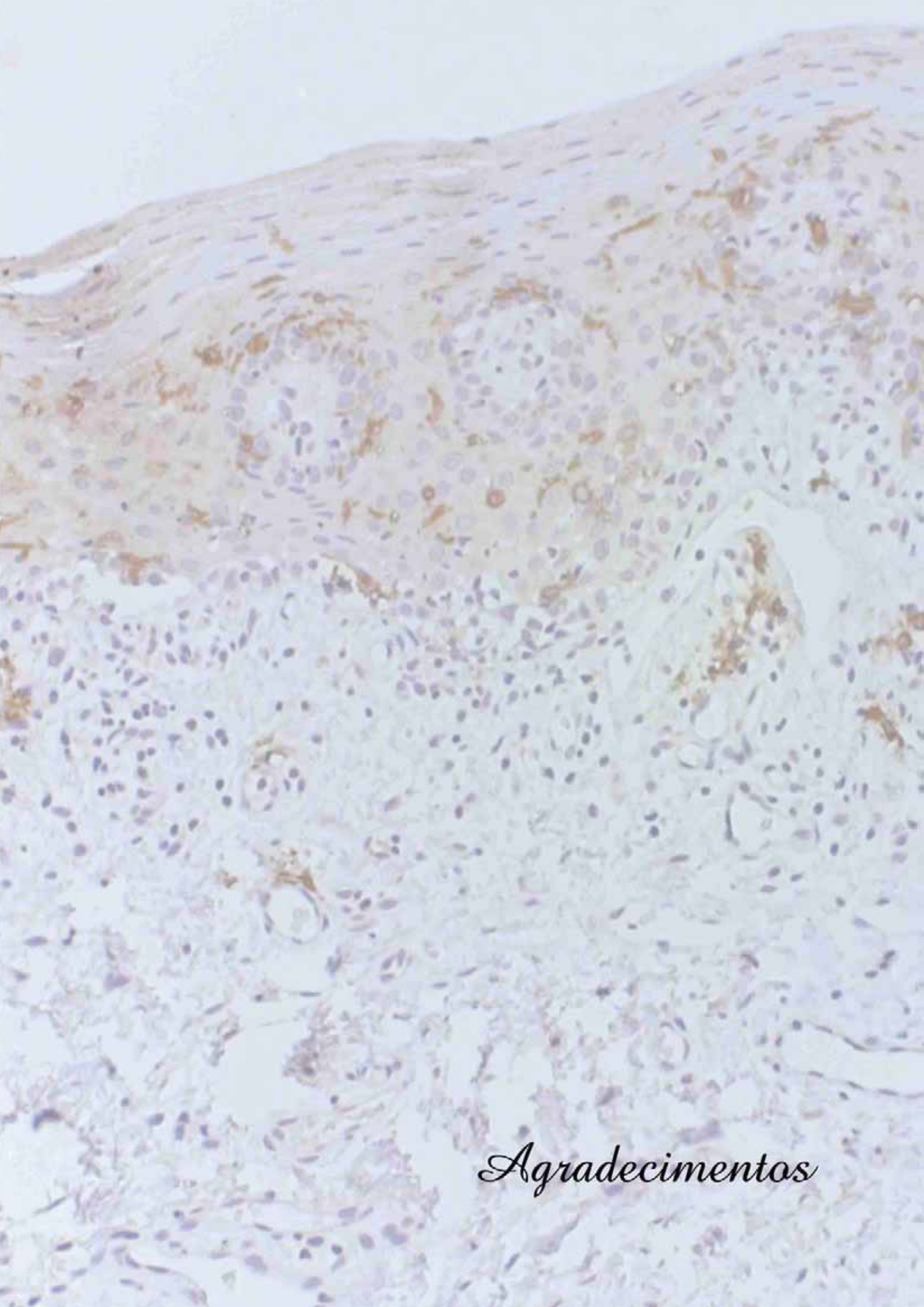


Homenagem

À minha orientadora, Dra. Ana Gabriela Sálvio,

Por toda sua simpatia, compreensão, prontidão e gentileza. E por todo ensinamento, dedicação e apoio nas orientações deste trabalho.

Obrigada!

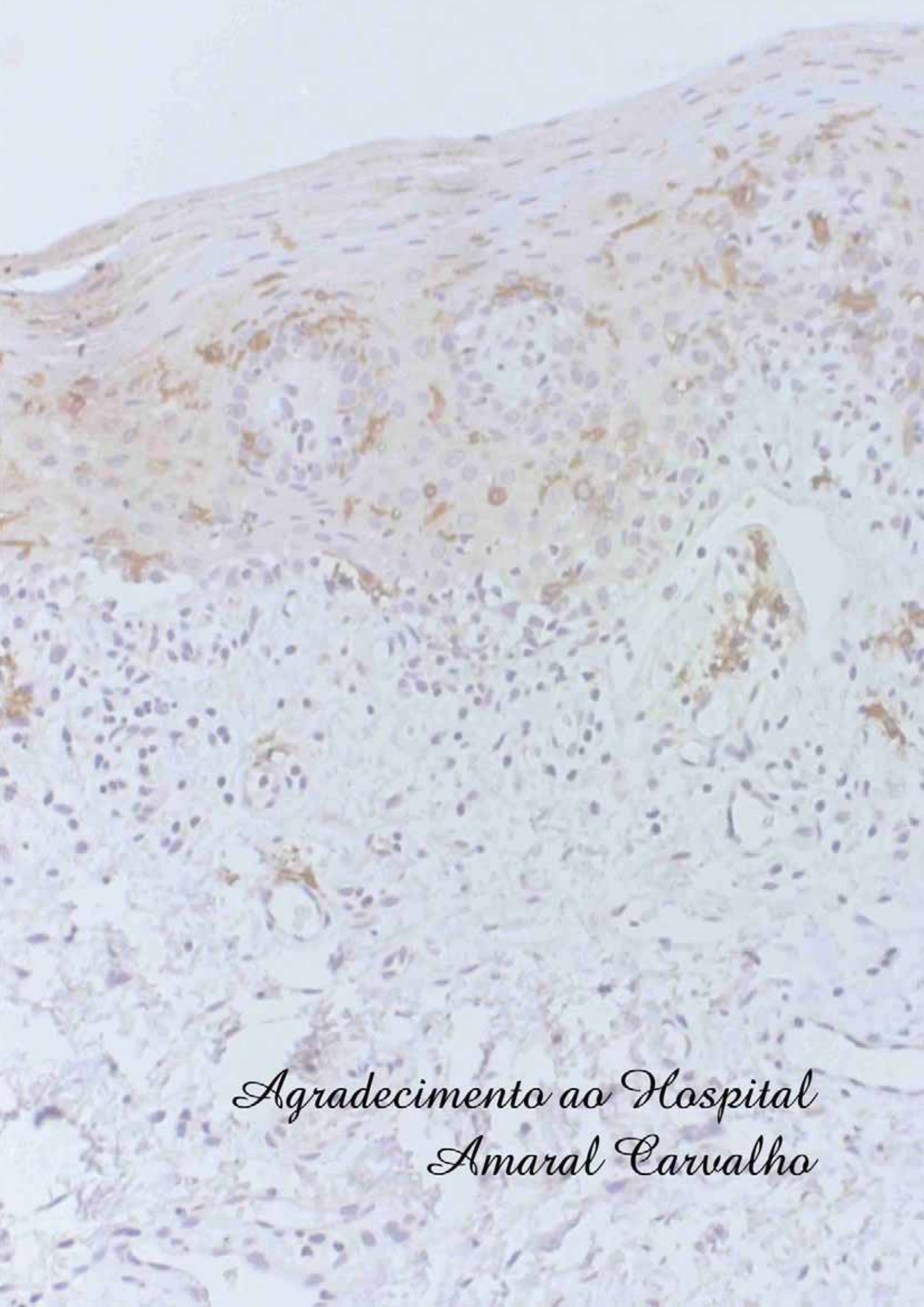


Agradecimentos

Ao Dr. Adauto José Ferreira Nunes por participar na realização e no desenvolvimento deste trabalho. Muito Obrigada!

Ao Técnico do Hospital Amaral Carvalho, José Adalberto Campanha, pela disponibilidade na realização da técnica imuno-histoquímica. Muito Obrigada!

À Dra. Érika Sinara Lenharo Orti Raduan e Alessandra Codato dos Santos, amigas que sempre estiveram prontas a me auxiliar neste trabalho.



Agradecimento ao Hospital Amaral Carvalho

Ao Diretor Reitor da Universidade Corporativa do Hospital Amaral Carvalho, na pessoa do Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado, pela oportunidade do meu egresso ao Mestrado.

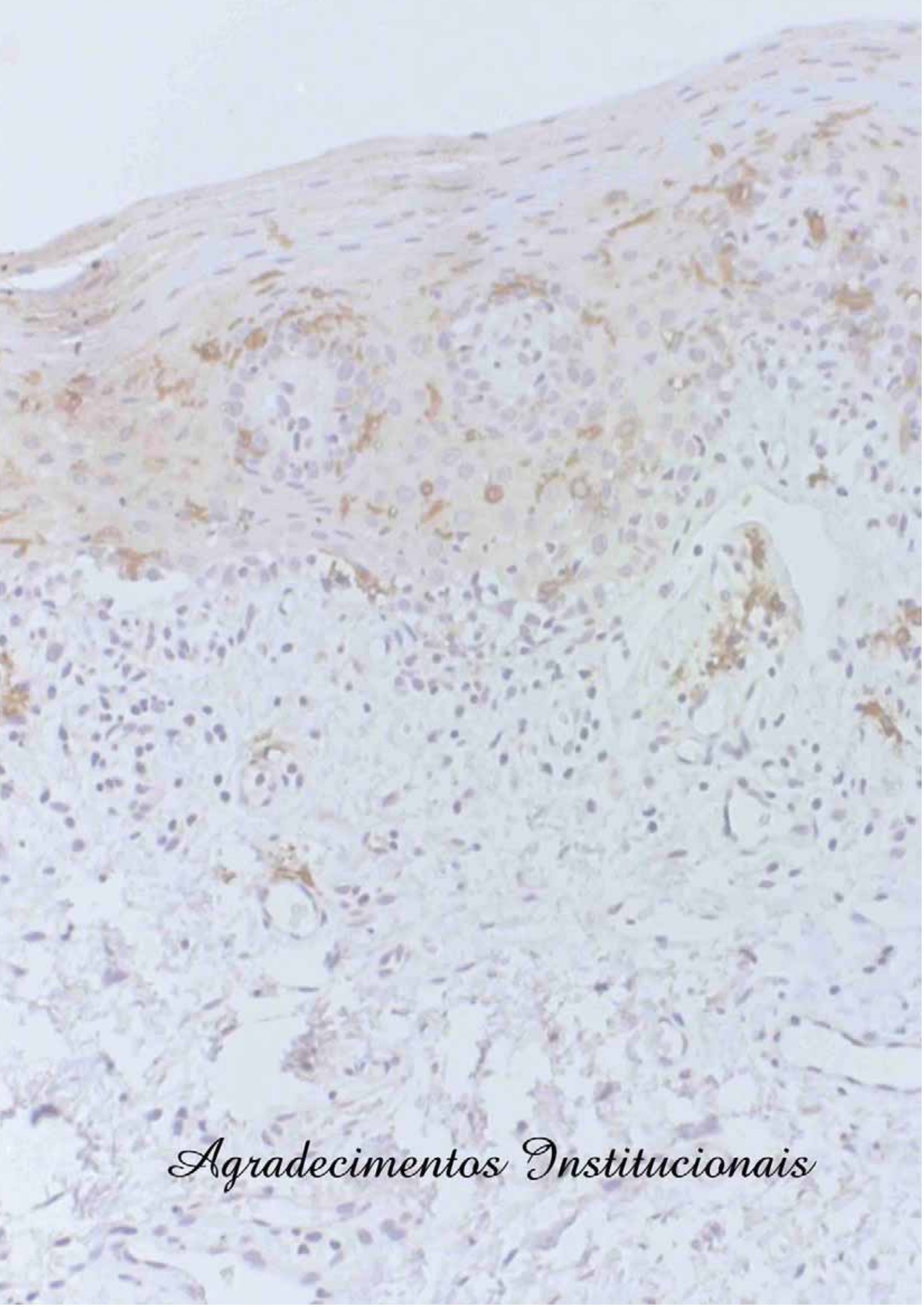
Ao Dr. Vergílio Antônio Rensi Colturado, Dr. Mair Pedro de Souza e Dr. Marcos Augusto Mauad, responsáveis pela Unidade de Transplante de Medula Óssea, pela oportunidade para a realização desta pesquisa.

Ao chefe do serviço de Anatomia Patológica do Hospital Amaral Carvalho, Jaú – SP, Dr. Francisco Carlos Quevedo e aos demais médicos Dr. Adauto José Ferreira Nunes e Dr. Francisco Alves Moraes Neto, pela oportunidade a mim concedida para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Hospital Amaral Carvalho do Serviço de Anatomia Patológica: Adriana, Alessandra, Carla, Daniela, Fernanda, Joice, José Adalberto, Lílian, Mayara, Paulo, Silvana, Telma, Vanessa, pela ajuda essencial na realização deste trabalho, cada um à sua maneira contribuiu para a realização deste trabalho.

Aos pacientes do Hospital Amaral Carvalho que a cada dia me ensinam o verdadeiro valor da vida.

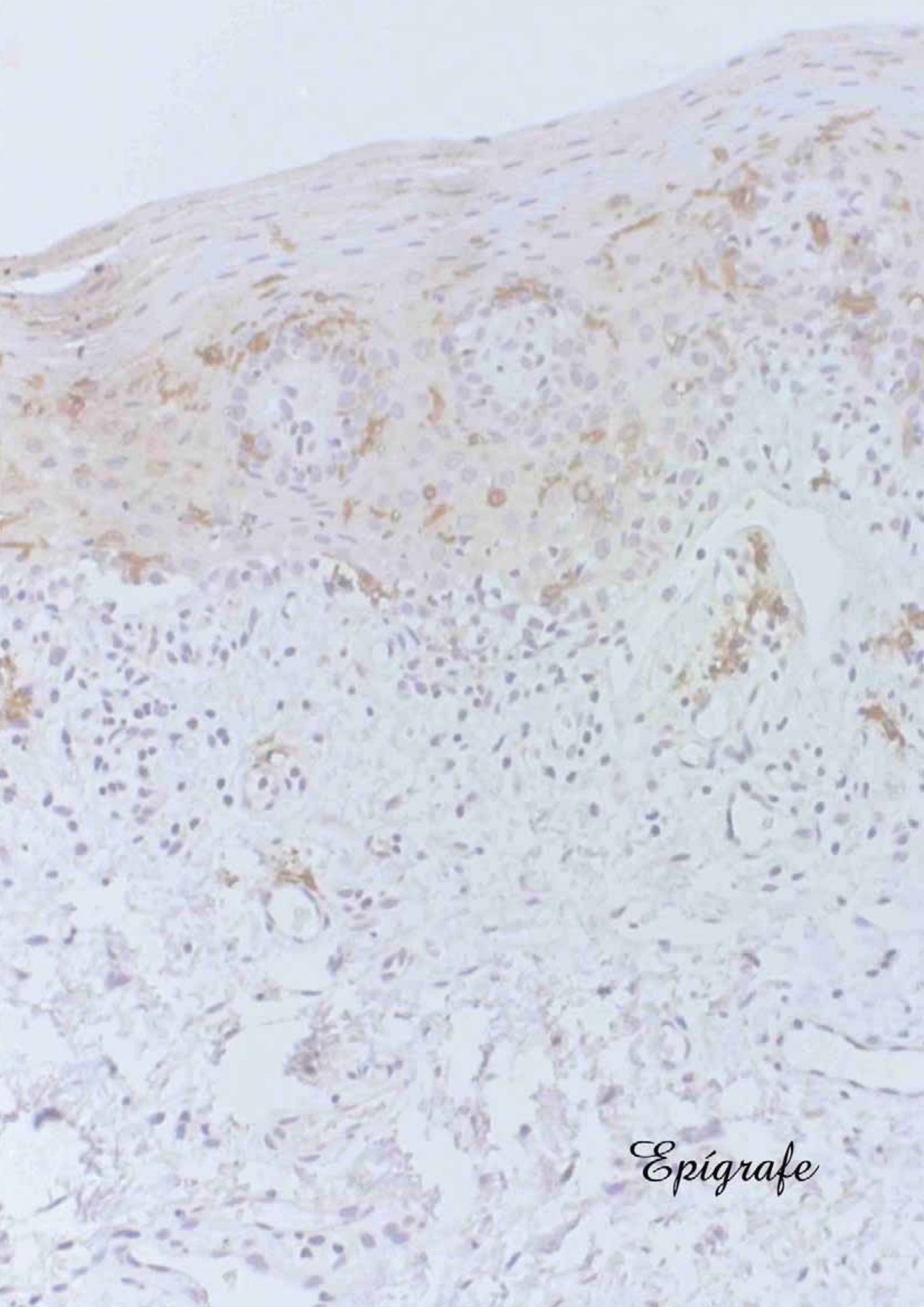
Muito Obrigada!



Agradecimentos Institucionais

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu – SP.

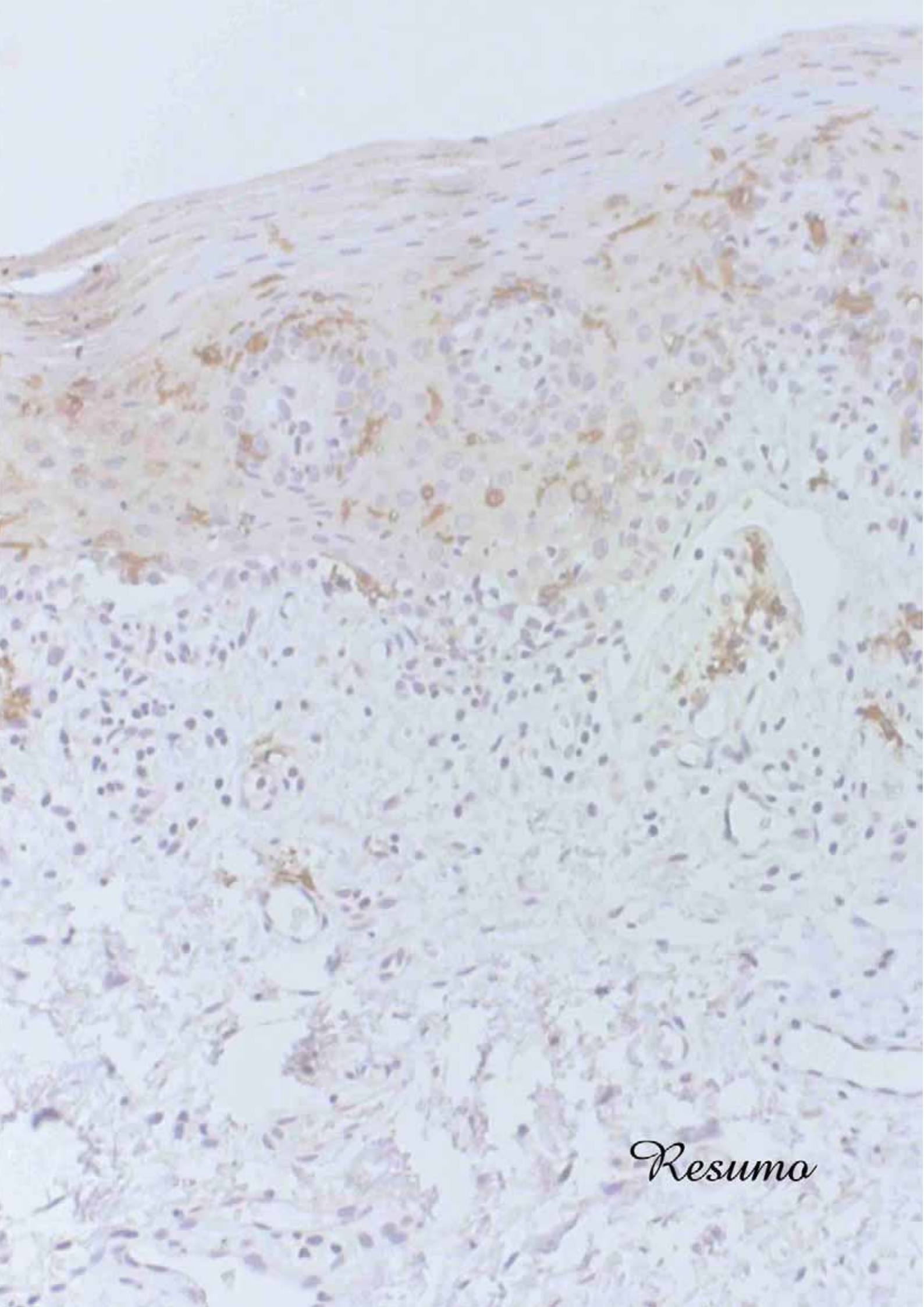
Ao Programa de Pós-graduação: Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica), na pessoa da Coordenadora Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini, vice-coordenadora Dra. Valéria Nogueira Dias Paes Secco e a todos os professores do programa.



Epígrafe

Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado.

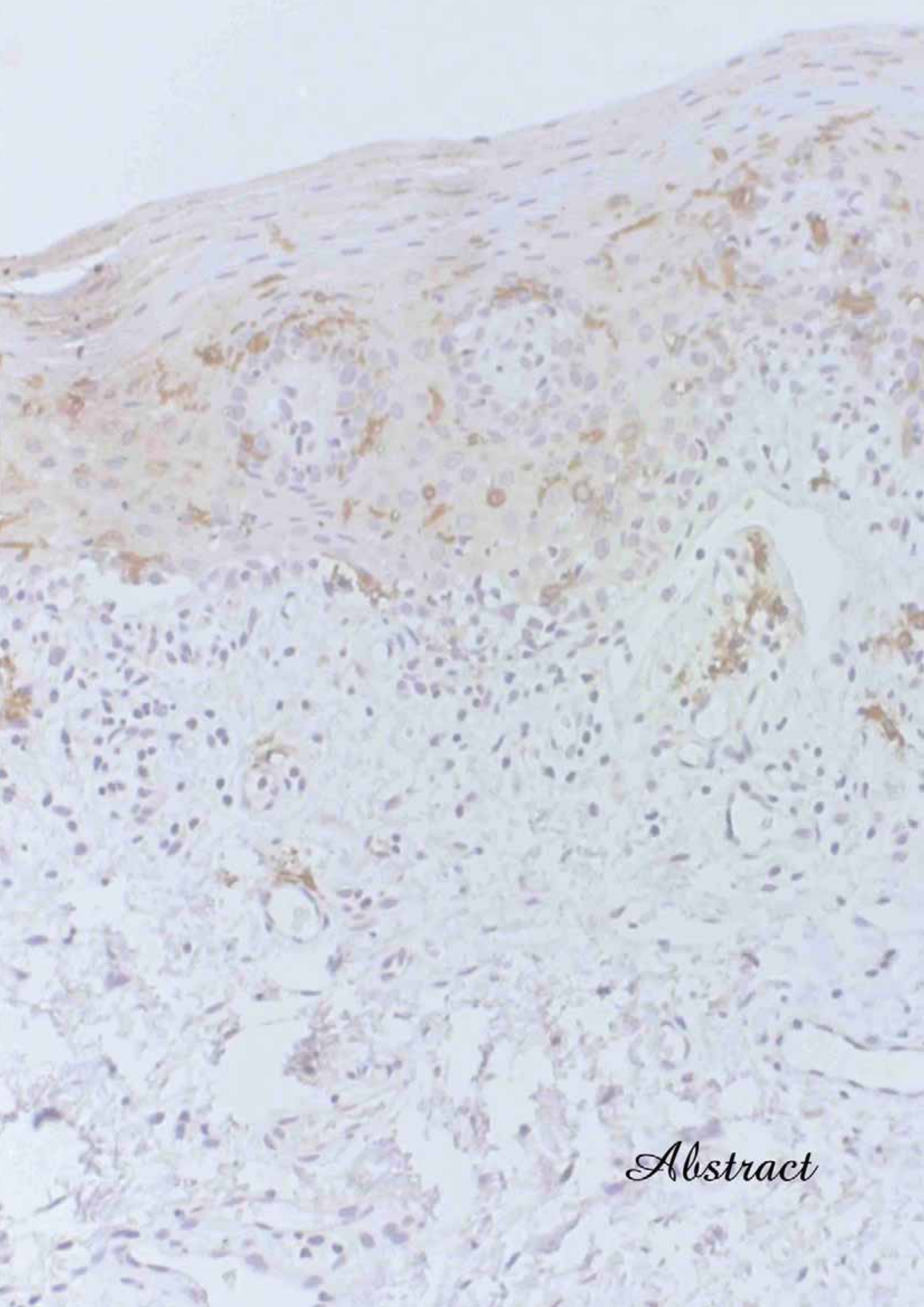
Albert Einstein



Resumo

A doença enxerto contra hospedeiro (DECH) ou *graft-versus-host-disease* (GVHD) é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes que foram submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). É uma síndrome com várias manifestações clínicas, patológicas e imunológicas. Com o objetivo de contribuir para o esclarecimento da participação das células dendríticas Mielóides, Plasmocitóides e Células NK (*natural killer*) na doença enxerto contra hospedeiro crônica (DECHc) e esclarecer os mecanismos envolvidos, foram analisados cortes microscópicos de mucosa jugal de 26 pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (LMA), que realizaram o transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas no Hospital Amaral Carvalho, Jaú – SP, onde 13 pacientes desenvolveram DECHc em mucosa bucal e 13 não desenvolveram DECHc. Cortes microscópicos foram submetidos à técnica imuno-histoquímica, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD1a, anti-CD123 e anti-CD56. O número de células imunomarcadas no córion ($CD1a^+$, $CD123^+$ $CD56^+$) por milímetro quadrado foi calculado dividindo-se a média das células dendríticas presentes nos 10 campos examinados pela área percorrida em cada espécime. Os dados foram avaliados pelo método de Mann-Witney Os resultados demonstraram um aumento estatisticamente significativo das células dendríticas mielóides $CD1a^+$ *(p=0,02)* e das células NK $CD56^+$*(p=0,04)* em pacientes com DECHc quando comparados àqueles sem DECHc. A análise da imunomarcação de $CD123^+$ não demonstrou diferença estatística entre os grupos. Conclui-se através deste estudo que no desenvolvimento da DECH crônica há participação das células dendríticas mielóides e céulas NK no córion de mucosa bucal.

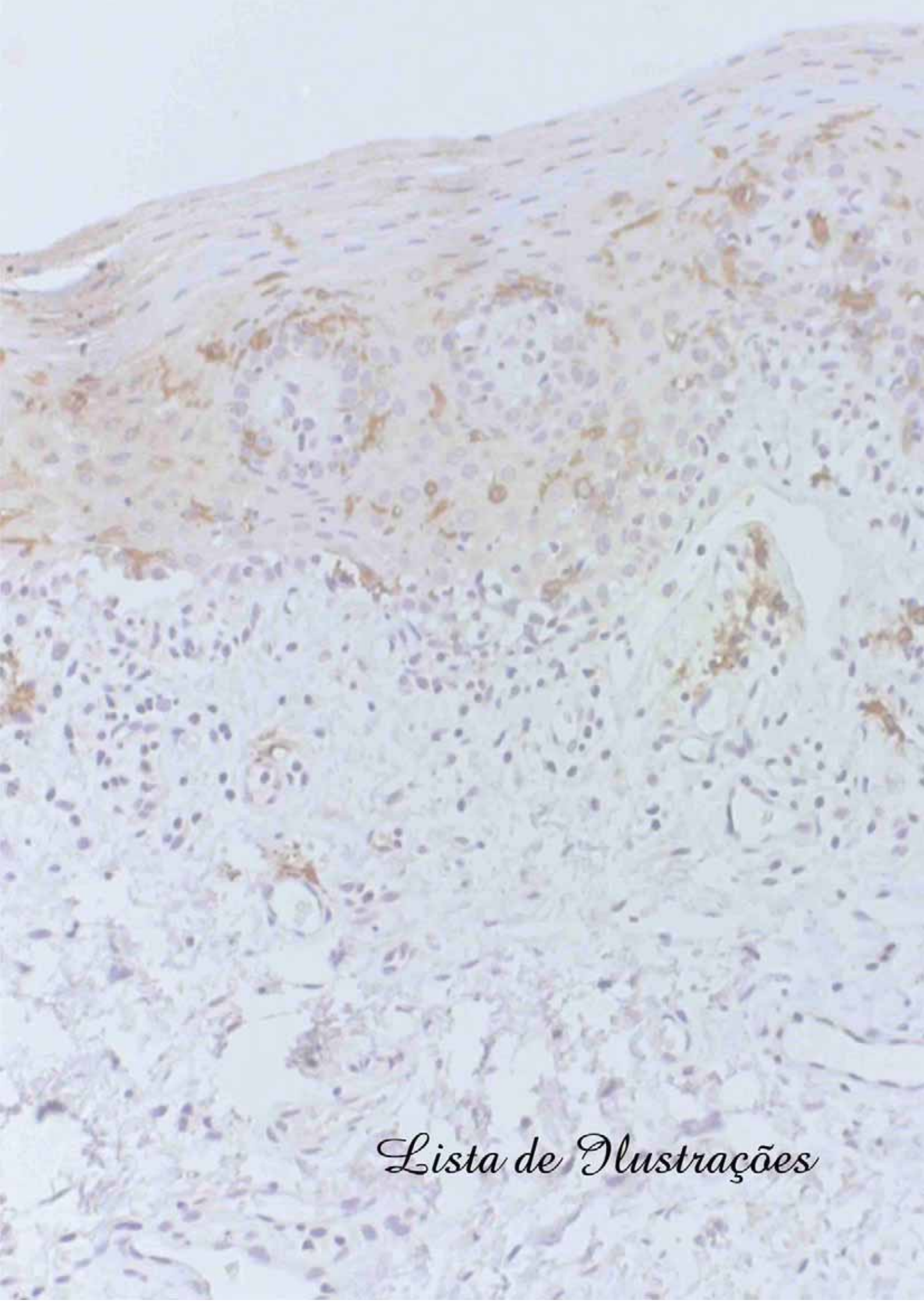
Palavras-chave: Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas. Doença enxerto contra hospedeiro. Células Dendríticas



Abstract

The graft versus host disease (GVHD) or graft-versus-host-disease(GVHD) is a major cause of morbidity and mortality in patients who underwent hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). It is a syndrome with various clinical, pathological and immunological. Aiming to contribute to clarifying the role of Myeloid dendritic cells, plasmacytoid cells and NK (natural killer) in chronic graft versus host disease (GVHD) and to clarify the mechanisms involved were examined microscopic sections of the oral mucosa of 26 patients with leukemia Acute Myeloid (AML) who underwent allogeneic hematopoietic stem cell in the Hospital Amaral Carvalho, Jau - SP, where 13 patients develop GVHDc oral mucosa and 13 did not develop GVHD. Microscopic sections were submitted to immunohistochemistry staining using monoclonal antibodies anti-CD1a, anti-CD56 and anti-CD123. The number of immunostained cells in the chorion (CD1a, CD123 and CD56) per square millimeter was calculated by dividing the mean of dendritic cells present in the 10 fields examined area covered by each specimen. The data were evaluated by Mann-Whitney. Results showed a statistically significant increase of myeloid dendritic cells CD1a ($p = 0.02$) and NK cells CD56 ($p = 0.04$) in patients with GVHDc compared with those without GVHDc. Analysis of CD123 immunostaining of no statistical difference between groups. It is concluded from this study that the development of chronic GVHD is participation of myeloid dendritic cells and NK cells in the chorion of oral mucosa.

Keywords: Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Graft versus host disease. Dendritic Cells



Lista de Ilustrações

Figuras 1, 2 e 3 - Lesão Liquenóide; Placa Hiperqueratótica e Restrição da abertura bucal..... **34**

Figura 4 - Características histológicas da DECHc (40x)..... **35**

Figura 5 - Aspecto microscópico da mucosa bucal de pacientes transplantado com DECHc 20X (infiltrado inflamatório)..... **52**

Figura 6 - Aspecto microscópico da mucosa bucal de pacientes transplantado com DECHc 40X (áreas de apoptose)..... **52**

Figura 7 - Células $CD1a^{+}$ em mucosa bucal de paciente transplantado com DECHc 20X..... **53**

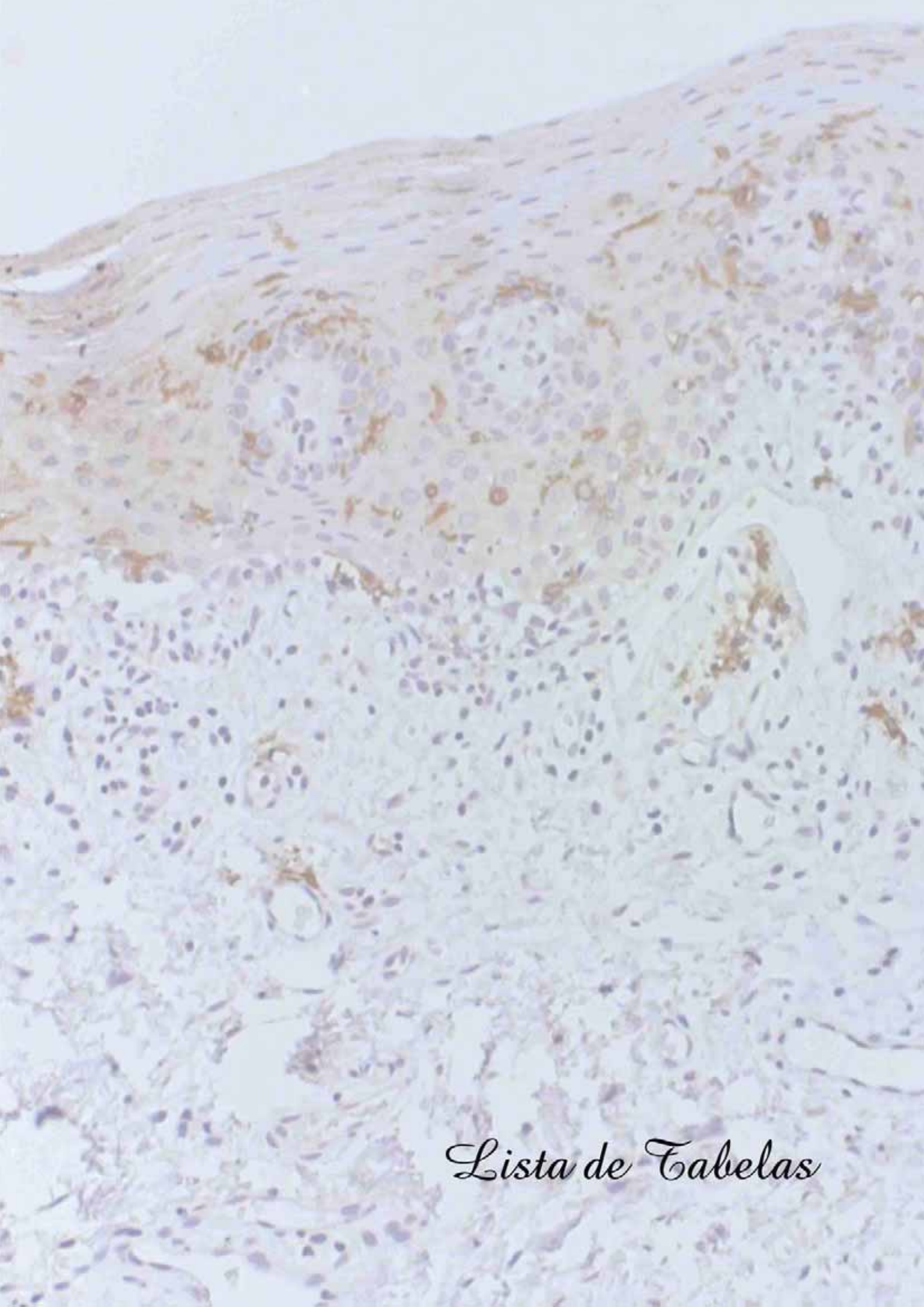
Figura 8 - Células $CD1a^{+}$ em mucosa bucal de paciente transplantado com DECHc 40X..... **53**

Figura 9 - Ausência de imunomarcação para o anticorpo anti-CD123 em mucosa bucal de pacientes com DECHc 20X..... **54**

Figura 10 - Ausência de imunomarcação para o anticorpo anti-CD123 em mucosa bucal de pacientes com DECHc 20X..... **54**

Figura 11 - Células $CD56^{+}$ em mucosa bucal de paciente transplantado com DECHc 20X..... **55**

Figura 12 - Figura 12: Células $CD56^{+}$ em mucosa bucal de paciente transplantado com DECHc 40X..... **55**

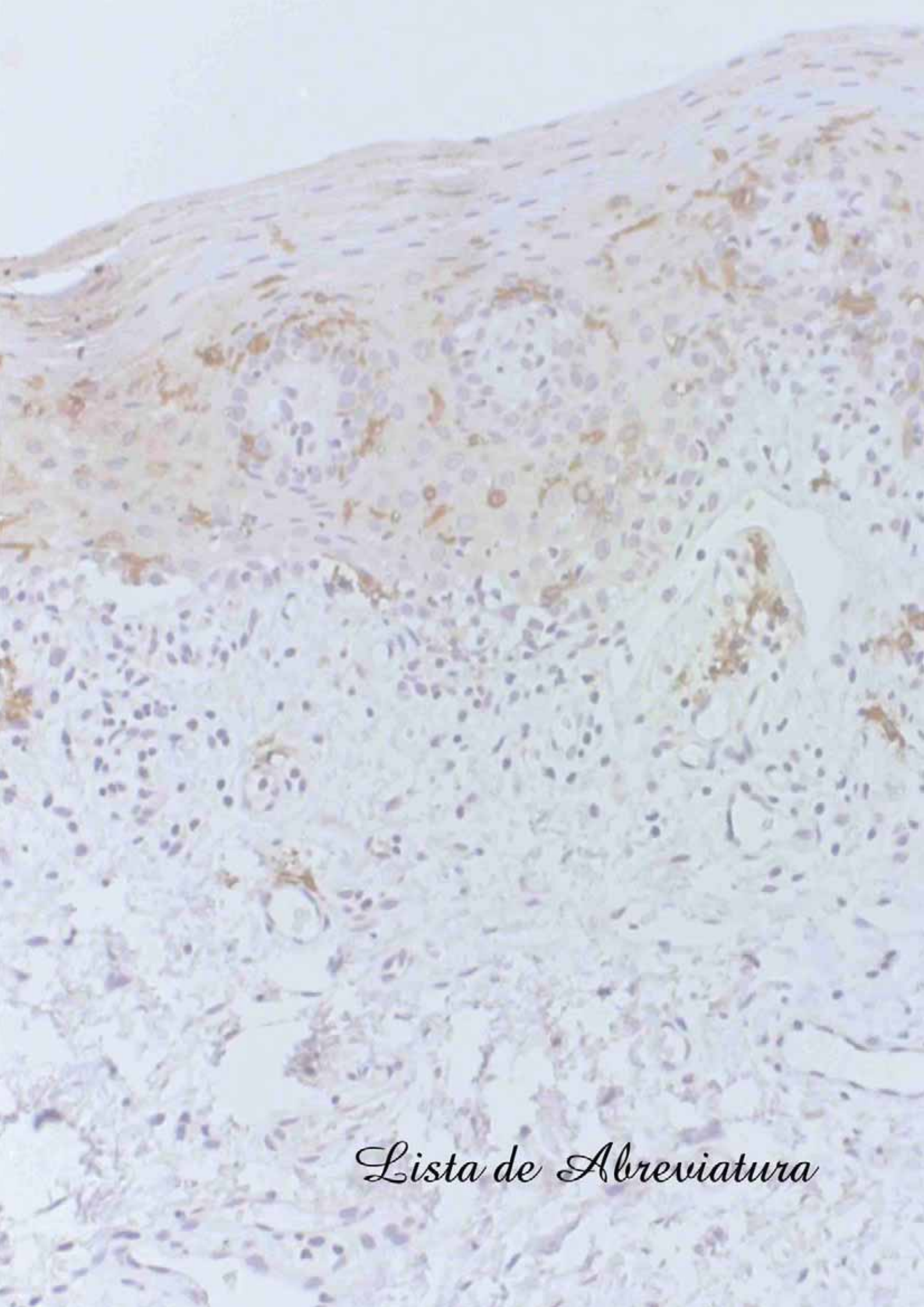


Lista de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes com e sem DECHc de acordo com o sexo e a idade..... **49**

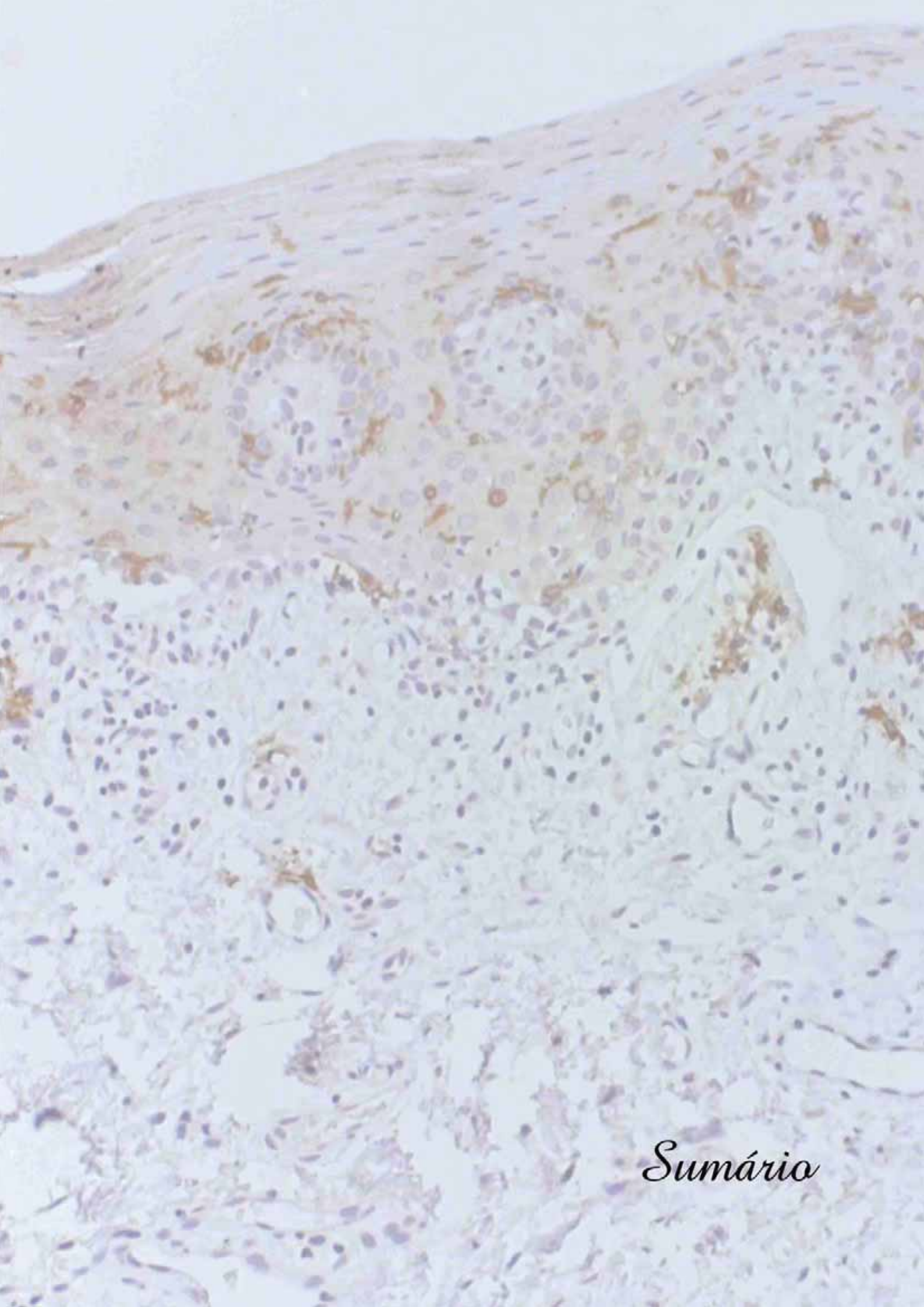
Tabela 2 - Distribuição dos pacientes com e sem DECHc de acordo com o diagnóstico da doença; D+, a data da biópsia em relação ao dia do transplante e terapia imunossupressora atual..... **50**

Tabela 3 - Distribuição dos Grupos com e sem DECHc indicando a relação do sexo entre receptor/doador..... **51**



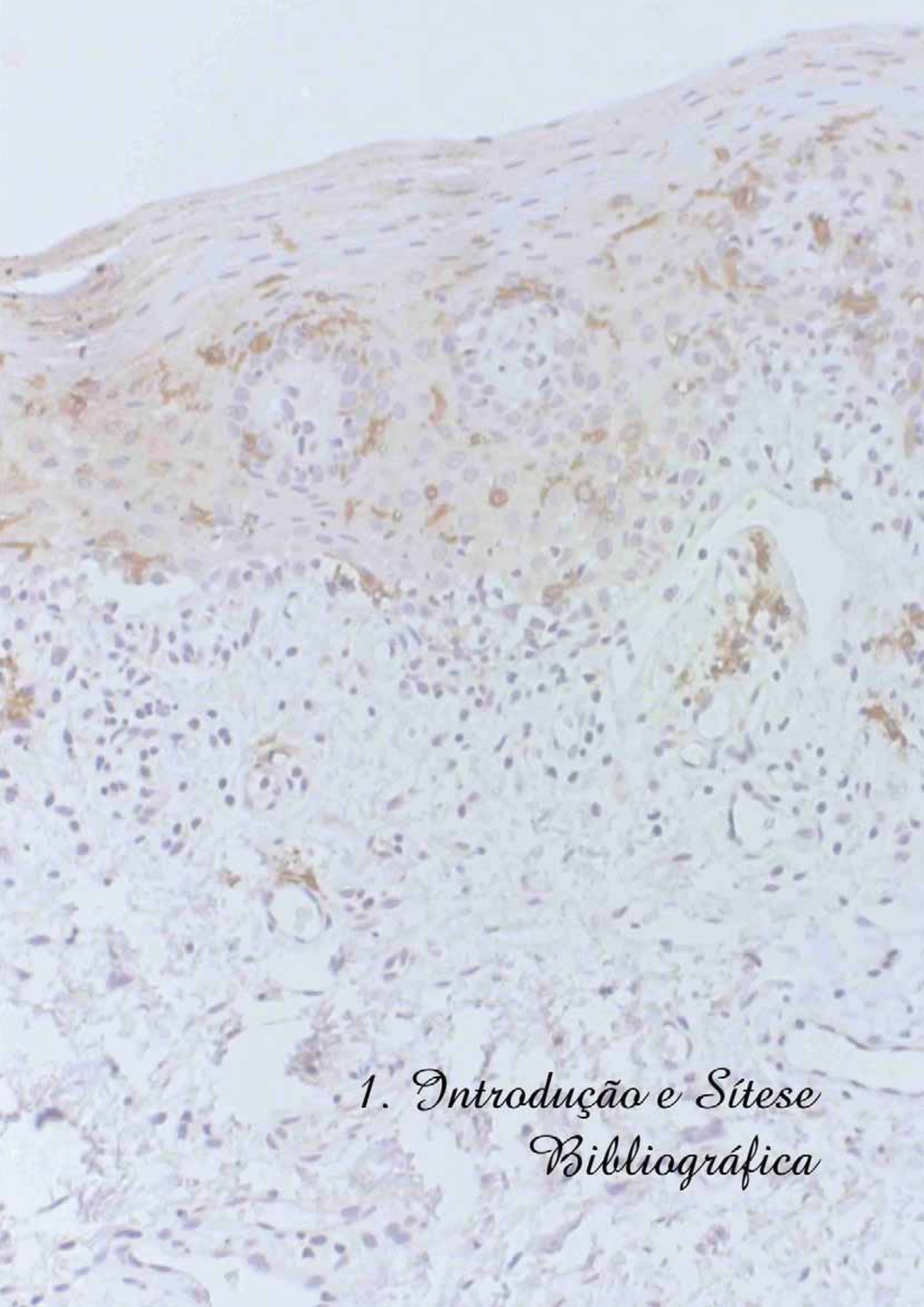
Lista de Abreviatura

APCs	Células apresentadoras de antígenos
DECH	Doença enxerto contra hospedeiro
GVHD	Graft versus host disease
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IFN	Interferon
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
NIH	National Institutes of Health
TCTH	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas
TNF	Fator de necrose tumoral



Sumário

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA..... 29
1.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (TCTH)..... 30
1.2 DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO (DECH)..... 31
1.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS..... 35
1.4 CÉLULAS NK (*natural killer*)..... 38
REFERÊNCIAS..... 40
ARTIGO..... 45
INTRODUÇÃO..... 45
OBJETIVO..... 47
MÉTODOS..... 47
RESULTADOS..... 49
DISCUSSÃO..... 56
CONCLUSÃO..... 58
REFERÊNCIAS..... 59
ANEXOS..... 63



1. Introdução e Sítese Bibliográfica

1.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (TCTH)

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é utilizado no tratamento de diversas doenças onco-hematológicas, como leucemias e linfomas; em tumores sólidos de diversos órgãos e na aplasia de medula óssea (GRATWOHL. A, 1990; HASSEUS et al., 2001; MERAD. M, 2005; NICOLAU-GALITIS et al., 2001; PERREAULT et al., 1985; SATO et al., 2006; SOARES et al., 2005).

O transplante de células-tronco hematopoiéticas é, hoje, reconhecidamente, um tratamento efetivo para doenças neoplásicas, hematológicas ou não e deficiências imunológicas. Ele é classificado em três tipos, dependendo da origem das células progenitoras:

1. Autólogo: quando as células progenitoras hematopoiéticas ou células tronco, utilizadas são do próprio paciente. Este procedimento é indicado principalmente em doenças neoplásicas, tanto hematológicas, quanto em alguns tipos de tumores sólidos. Este tipo de transplante tem menos risco que o alogênico por não existir nenhum tipo de reação imunológica entre receptor e doador. Entretanto, como o efeito antitumoral é menor, o índice de recidivas é maior.

2. Alogênico: quando é um doador geneticamente distinto, seja HLA **(***Human Leukocyte Antigen* - Antígeno Leucocitário Humano) compatível ou não. Quando o transplante ocorre entre indivíduos da mesma família, denomina-se aparentado e no caso de doador sem relação biológica familiar, denomina-se "não aparentado". Este tipo de transplante apresenta complicações relacionadas à reações imunológicas entre receptor e doador, desde a rejeição até a doença do enxerto contra hospedeiro (DECH),

3. Singênico: quando realizado entre gêmeos idênticos. A identidade antigênica entre doador e receptor é absoluta e não se produz, portanto, nenhuma complicação imunológica (SHARON. J, 1998; ABBAS et al., 2005).

As células progenitoras hematopoiéticas classicamente são obtidas da medula óssea, mas também podem ser coletadas do sangue periférico e do sangue de cordão (ABBAS et al., 2005).

A preparação do paciente, com radiação e quimioterapia, tem o objetivo de depletar suas células medulares, permitindo o estabelecimento das células transplantadas em um meio apropriado. Os aloenxertos de tecido linfóide são particularmente imunogênicos, em virtude do elevado conteúdo de células que expressam moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) de classe II. As células doadas atingem a medula óssea do receptor, a repovoam e passam a cumprir suas funções fisiológicas no hospedeiro (SHARON. J, 1998). Desta forma, o hospedeiro e o doador devem ter sua compatibilidade cuidadosamente testada para todos os loci polimórficos do MHC (ABBAS et al., 2005).

Gradativamente, espera-se que em cerca de 3 semanas se inicie a nova hematopoiese e a recomposição de um novo sistema imune. A partir deste momento existe a possibilidade de reações imunes mediadas por células do doador contra o receptor. Mesmo que doador e receptor sejam compatíveis no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e no sistema antígeno leucocitário humano (HLA), pode ocorrer a doença do enxerto contra hospedeiro (DECH). Esta, associada às infecções são consideradas as principais complicações do transplante.

1.2 DOENÇA ENXERTO CONTA HOSPEDEIRO (DECH)

A doença enxerto contra hospedeiro (DECH) ou *graft-versus-host-disease* (GVHD) é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes que foram submetidos ao transplante alogênico de medula óssea (LAMPERT et al., 1982). É uma síndrome com várias manifestações clínicas, patológicas e imunológicas (NICOLAU-GALITIS et al., 2001, MATTSSON, T. et al., 1992). A DECH ocorre quando os linfócitos T da medula transplantada reconhecem como estranhos os antígenos do complexo de histocompatibilidade do hospedeiro, proliferando e atacando os tecidos do mesmo (MATTSSON et al., 1992; MERAD, M, 2002).

A falha na “pega” do enxerto e a doença enxerto contra hospedeiro são as principais razões para que o TCTH fosse descontinuado até que técnicas

para definir precisamente a histocompatibilidade humana fossem criadas, sendo esta última a principal barreira para o sucesso do transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (CLARK, F.J., 2002; CHAKRAVERTY, R., 2002; SATO, M., 2006).

Segundo Billinghan et al. (1966) há alguns pré-requisitos para o desenvolvimento da DECH. Primeiro, o enxerto deve conter células imunologicamente competentes; segundo, o hospedeiro deve ser incapaz de apresentar resposta efetiva para destruir as células transplantadas; terceiro, o hospedeiro deve expressar antígenos teciduais que não estão presentes no doador.

Assim, de acordo com esses critérios, a DECH pode ocorrer em qualquer situação em que o tecido contendo células imunocompetentes (componentes sanguíneos, medula óssea, órgãos sólidos) sejam transferidos entre indivíduos. A idade avançada do receptor, uso de células tronco de sangue periférico, o alotransplante, a disparidade de sexo entre doador e receptor (doador feminino para receptor masculino), o uso de radiação no condicionamento e a dose necessária de drogas imunossupressoras, aumentam o risco para o desenvolvimento de DECH (CLARK, F.J. 2002; CHAKRAVERTY, R. 2002).

Hasseus et al. (2001) descreveram duas formas de DECH: aguda (DECHa) e crônica (DECHc). No passado, eram definidas de acordo com a época de aparecimento dos sinais clínicos. Na forma aguda as manifestações surgem antes dos 100 dias pós-transplante sendo caracterizada pelo envolvimento de pele, como um rash maculo papular, fígado e trato gastrintestinal. A forma crônica é caracterizada pela persistência das manifestações ou aparecimento dos sinais após este período.

Nos últimos anos, estudos na prática do transplante modificaram as definições para a DECH. Sendo assim, novos critérios para o diagnóstico da DECH foram estabelecidos, onde se leva em conta características clínicas, independentemente do tempo de aparecimento dos simtomas. (FILIPOVICH et al., 2005)

De acordo com o último consenso do *National Institute of Health*, (NIH) para dar-se o diagnóstico da DECH são necessários estar presentes:

1. a ausência da forma aguda da DECH;
2. presença de pelo menos 1 critério clínico diagnóstico da DECH ou presença ao menos de 1 manifestação distintiva associada ao exame anatomopatológico,
3. a exclusão de outros diagnósticos possíveis (FILIPOVICH et al., 2005).

As manifestações diagnósticas da DECHc são aquelas que quando observadas são suficientes para estabelecer o diagnóstico, sem a necessidade do anatomopatológico. Por exemplo, a presença de lesões cutâneas poiquilodérmicas, lesões líquen plano like, esclerodermiformes, líquen escleroso like na pele já confirmam o diagnóstico de DECHc. Já as manifestações distintivas não são encontradas na DECH aguda, mas não são consideradas suficientes para dar um diagnóstico de DECH sem a realização de exames adicionais como o anatomopatológico ou outros testes relevantes (FILIPOVICH, et al., 2005)

Portanto, este último consenso é baseado não mais na data de início dos sintomas, mas no tipo de manifestações clínicas.

Após os critérios de confirmação do diagnóstico, foi proposto um escore global da DECHc, com base no número de órgãos ou locais envolvidos e na gravidade de cada órgão afetado, com graduação em leve, moderada e grave. Esta classificação reflete o grau da doença e implica a terapêutica recomendada. (FILIPOVICH, et al., 2005)

A cavidade bucal é afetada em ambas as formas de DECH, sendo a morbidade oral altamente significativa (SALE, G.E. 1984).

As lesões liquenoides, afetando mucosa bucal, língua, palato ou lábios, placas hiperqueratóticas e restrição a abertura bucal são características diagnósticas de DECHc, sendo suficientes para estabelecer o gisgnóstico. As características distintivas da DECHc oral incluem xerostomia, mucocele, atrofia e úlceras requerendo o exame anatomopatológico complementar (FILIPOVICH et al., 2005).

Figuras 1,2,3: Lesão Liquenóide; Placa Hiperqueratótica e Restrição da abertura bucal.

Fonte: http://www.atlasdermatologico.com.br

As características histológicas do GVHD podem variar, especialmente, na dependência do órgão acometido. Na boca, o GVHD exibe alterações histológicas em epitélio e glândula salivar menor. No epitélio as alterações podem ser generalizadas ou localizadas e incluem inflamação liquenóide, exocitose e apoptose. Nas glândulas salivares menores nota-se desde a presença de linfócitos com ou sem plasmócitos periductais e intralobulares, e exocitose de linfócitos dentro dos ductos intralobulares e ácinos e fibrose intralobular (SHULMAN, et, al. 2006).

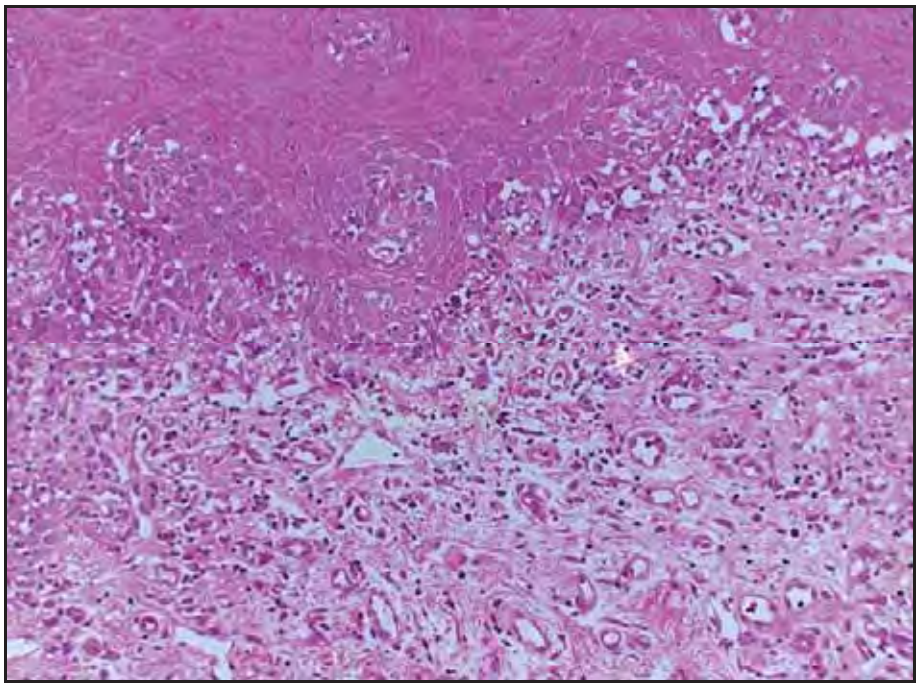


Figura 4 : Características histológicas da DECHc (40x).

A fisiopatologia da DECH é pouco esclarecida e estudos posteriores são necessários para se tentar reaver o equilíbrio que traria benefícios ao portador de DECHc, limitando o dano tecidual e, portanto, aumentando a sobrevida destes pacientes.

1.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS

As células dendríticas constituem uma família de células apresentadoras de antígeno oriundas de progenitores hematoipoéticos da medula óssea com capacidade para interagir com linfócitos T e B e modular suas respostas. Foram descritas em 1973 por Steinman e Cohn a partir de células isoladas no baço, sendo denominadas dendríticas devido a sua morfologia (SOUZA et al., 1999; STEINMAN, R.M; COHN A.A, 1973).

A manipulação das células apresentadoras de antígeno oferece uma ferramenta potencial para a modulação da resposta imune após o transplante (CLARK, F.J; CHAKRAVERTY, R. 2002).

As células dendríticas são células do sistema imune que têm como principal função processar e apresentar antígenos para outras células. Neste contexto, são consideradas as mais importantes células apresentadoras de antígeno do organismo (SOUZA, et al., 2009).

Estudos realizados em modelos experimentais foram importantes para definir a participação de células dendríticas na patogênese da DECH (SHLOMCHIK et al., 1999)

Duas linhagens distintas de células dendríticas têm sido referidas em humanos: células dendríticas mielóides, que expressam CD1a e células dendríticas plasmocitóides, que não expressam estes antígenos e têm como aspecto característico a expressão do receptor alfa de interleucina-3 (CD123). Consequentemente, estas células requerem interleucina-3 para sua sobrevida “in vitro”. As células dendríticas plasmocitóides têm pouca atividade fagocítica e produzem interferon-alfa (IFN-α) após ativação por infecção viral (ROSSI et al., 2002).

As duas populações de células dendríticas, mielóides e plasmocitóides podem ser distinguidas por suas diferentes capacidades funcionais. As células dendríticas mielóides são derivadas de monócitos e macrófagos, enquanto as células dendríticas plasmocitóides poderiam ser de origem linfóide (CHARLES et al., 2010), além de diferir na sua propensão a gerar interleucina-12 em resposta a estímulos de maturação e de acordo com a sua habilidade de produzir respostas TH1 (ABBAS et al. 2005).

A maturação das células dendríticas e o processo inflamatório são importantes no direcionamento da resposta imune a vírus e bactérias, principalmente nos momentos iniciais. (SOUZA et al., 2009).

Um subconjunto exclusivo das células dendríticas mielóides ($CD1a^{+}$), são as células de Langerhans, que estão presentes no epitélio da pele e mucosas, servindo como um mecanismo protetor nesta barreira física, iniciando tanto respostas inatas quanto imunes, agindo como sentinelas imunológicas (HASSÉUS et al., 2001; MERAD et al., 2002; MERAD, M. 2005).

As células de Langerhans da epiderme são as células dendríticas imaturas mais estudadas. Durante a invasão de patógenos, as células

dendríticas imaturas capturam antígenos estranhos e rapidamente deixam a epiderme ou mucosas (STEINMAN, 1985). Em seguida elas migram para nódulos linfáticos e a partir desta migração sofrem maturação fenotípica e funcional.

Deguchi et al., (2002) realizaram estudo onde compararam a distribuição de células apresentadoras de antígenos em diversas doenças de pele, entre elas a população mielóide, que se mostrou participante não somente na doença enxerto contra hospedeiro crônica, mas também na dermatite espongiótica e líquen plano.

Orti-Raduan, (2009) obtiveram resultados em mucosa bucal de pacientes com DECHc, que concluindo que as células de Langerhans tiveram aumento significativo quando comparadas com grupo controle de mucosa sã.

Alguns outros estudos têm esclarecido propriedades imunológicas peculiares das células dendríticas plasmocitóides ($CD123^{+}$). Estes estudos sugerem que estas células podem afetar variavelmente respostas de células T alogênicas dependendo pelo menos, em parte, do seu estado de maturação e ativação (ROSSI et al., 2002). Esta subpopulação de células dendríticas tem um papel crucial na iniciação de respostas antivirais e antitumorais (KUTZNER et al., 2009).

As células dendríticas plasmocitóides no estado basal estão ausentes da pele, ao contrário das células dendríticas mielóides, sugerindo que a presença das células dendríticas plasmocitóides na pele em condições patológicas é a consequência de mecanismos ativos de recrutamento (CHARLES et al., 2010).

Além disso, estão preferencialmente localizadas na epiderme nas lesões de Dermatomiosite (MCNIFF et al., 2007), já em outras doenças autoimunes como Lupus e Psoríase ao longo da junção dermoepidérmica ao redor de folículos pilosos (CHARLES et al., 2010). Isto demonstra sua participação em lesões cutâneas de doenças autoimunes e diferenças no seu padrão de distribuição, sugerindo mecanismo patogênico distinto.

O papel das células dendríticas plasmocitóides na doença enxerto contra hospedeiro permanece incerto e sua função *in vivo* como células apresentadoras de antígeno permanece controversa. Foi demonstrado em

murinos que elas podem ser capazes de iniciar células T alorreativas e causar doença enxerto contra hospedeiro (KOYAMA et al., 2009). Além disso a depleção de células dendríticas plasmocitóides do enxerto de medula óssea resultou em aceleração da mortalidade por DECH (BANOVIC et al. 2009).

1.4 CÉLULAS NK (*natural killer*)

As células dendríticas plasmocitóides têm implicações particulares na recuperação imunológica no período logo após o transplante de células tronco. A interação de células dendríticas plasmocitóides com células NK (*natural killer*) determina resposta importante para a indução de tolerância para evitar a DECH e um efeito antitumoral para prevenir recaída (CHKLOVSKAIA et al. 2004).

Gerosa et al., (2005) relataram que as células dendríticas plasmocitóides encontradas no sangue periférico são necessárias tanto para induzir, quanto para estimular a atividade de células NK (*natural killer*), em resposta ao vírus da gripe.

As células dendríticas plasmocitóides após o reconhecimento de patógenos, produzem grandes quantidades de IFN-α para ativar o sistema imune inato e desencadear respostas imunes, este IFN-α tipo I produzido pelas células dendríticas plasmocitóides desempenham um papel crítico na regulação das funções de vários tipos de células do sistema imune, dentre elas, ativando células NK (HANABUCHI, et al., 2006).

Muitas citocinas estão envolvidas no desenvolvimento da DECH após o transplante como uma cascata durante a ativação seqüencial de monócitos e células T. Estas citocinas, produzidas por linfócitos T, induzem respostas de linfócitos T citotóxicos, NK e de fagócitos mononucleares com produção de IL-1 e TNF-α. Existem fortes evidências de que estas citocinas e a citotoxidade mediada por células levariam à destruição dos tecidos alvo durante a DECH (FERRARA, J., 2000).

Os grandes linfócitos granulares com atividade citotóxica denominados linfócitos natural killer (NK) constituem a maior porção de linfócitos repovoando o sangue periférico após o inicio do enxerto (REIS et al. 2004).

Os linfócitos NK são populações celulares tipicamente chamadas de linfóides, com base em suas semelhanças morfológicas, destruição e função (PEAKMAN, M., 1999). São responsáveis pela citotoxicidade natural contra determinados alvos, independentemente de ativação prévia ou independentemente das moléculas clássicas MHC-I.

Estas células são capazes de produzir citocinas e, portanto, têm um importante papel na regulação da hematopoiese. Fenotipicamente são caracterizadas por apresentarem os marcadores CD16 e CD56 e ausência do marcador CD3. Alcançam níveis normais durante o primeiro ano do transplante, sendo importantes no inicio da recuperação imunológica principalmente na proteção contra infecções (REIS et al. 2004; PEAKMAN, M., 1999).

Poucos relatos da participação e do padrão de distribuição dessas células nas lesões de DECHc de mucosa bucal. Sendo assim, sua investigação poderia ser uma estratégia promissora para um melhor entendimento da patogênese e novas abordagens terapêuticas da DECH.

*REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Imunologia do transplante. In: _____. **Imunologia celular e molecular.** 5.ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005. Cap. 16, p. 379-400.
2. ANGEL, C.E. et al. Cutting edge: CD1a+ antigen-presenting cells in human dermis respond rapidly to CCR7 ligands. **J. Immunol**. v. 176, p. 5730-5734, 2006.
3. ANGEL, C.E. et al. $CD14^{+}$ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their $CD1a^{+}$ counterparts. **Int. Immunol.**, v. 19, p.1271-1279, 2007.
4. BILLINGHAM, R. E. The biology of graft-versus-host reaction. **Harvey Lect.**, v. 62, p. 21-78, 1966.
5. BANOVIC, T. et al. Graft-versus-host disease prevents the maturation of plasmacytoid dendritic cells. **J. Immunol.**, v.182, n. 2, p. 912-920, 2009.
6. CHARLES, J. et al. Plasmacytoid dendritic cells and dermatological disorder: focus on theirs role in autoimmunity and cancer. **Eur. J. Dermatol.**, v. 20, p. 1-16, 2010.
7. CHKLOVSKAIA, H. et al. Reconstituition of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell transplantation: affects of endogenous flt3 ligand. **Blood**, v. 103, n. 10, p. 3860-3868, 2005.
8. CLARK, F. J.; CHAKRAVERTY, R. Role of dendritic cells in graft-versus-host disease. **J. Hematother. Stem Cell Res.**, v. 11, p. 601-616, 2002.
9. DEGUCHI, M. et al. Comparison of the distribution and numbers of antigen-presenting cells amongT-lymphocyte-mediated dermatoses. **Arch. Dermatol. Res.**, v.294, p. 297-302, 2002.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus.** Washington, 1997. 240p.

10. EBNER, S. et al. Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. **Int. Immunol.**, v. 16, p. 877-887, 2004.

11. FERRARA, J. L. M. Pathogeneses of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular affector. **J. Hematother. Stem Cell Res.**, v. 9, p. 299-306, 2000.

12. FILIPOVICH, A. H. et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. **Biol. Blood Marrow Transplant**, v. 11, n. 12, p. 945-956, 2005.

13. GEROSA, F. et al. The reciprocal interaction of nk cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. **J. Immunol.**, v.174, p. 727-734, 2005.

14. GRATWOHL, A. Bone marrow transplantation: indications and technique. **Radiother. Oncol.**, v. 18, n. 1, p. 3-9, 1990.

15. HANABUCHI, S. et al. Human plasmacytoid predendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL). **Blood**, v.107, p. 3617-3623, 2006.

16. HASSÉUS, B. et al. Langerhans cells and T cells in oral graft versus host disease and oral lichen planus. **Scand. J. Immunol.**, v. 54, n. 5, p. 516-524, 2001.

17. KOYAMA, M. et al. Plasmocytoid dendritic cells prima alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. **Blood**, v. 113, n. 9, p. 2088-2095, 2009.

18. KUTZNER, H. et al. CD123-positive plasmacytoid dendritic cells in primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma. **J. Surg. Pathol.**, v. 33, p. 1307-1313, 2009.

19. LAMPERT, I. A. et al. Immunological analysis of the skin in graft versus host disease. **Clin. Exp .Immunol.**, v. 50, n. 1, p. 123-131, 1982.

20. LENZ, A. et al. Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. **J. Clin. Invest.**, v. 92, p. 2597-2596, 1993.

21. MATTSSON, T. et al. O. A comparative immunological analysis of the oral mucosa in chronic graft-versus-host disease and oral lichen planus. **Arch. Oral Biol.**, v. 37, n. 7, p. 539-547, 1992.

22. MERAD, M. et al. Langerhans cells renew in the skin though out life under steady-state conditions. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 12, p. 1135-1141, 2002.

23. MERAD, M. Ontogeny of langerhans cells and graft versus host disease. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 560, p. 115-123, 2005.

24. McNIFF, J. M.; KAPLAN, D. H. Plasmacytoid dentritc cells are present in cutaneous dermatomyositis lesions in a pattern distinct from lupus erythematosus. **J. Cutan. Pathol.**, v. 35, n. 5, p. 452-456, 2007.

25. NESTLE, F. O. et al. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin revels phenotypic and functionally distinctive subset. **J. Immunol.**, v. 151, p. 6535-6545, 1993.

26. NESTLE, F. O.; TURKA, L. A.; NICKOLOFF, B. J. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 202-209, 1994.

27. NICOLAU-GALITIS, O. et al. The oral manifestations of chronic graft-versus-host disease (cGVHD) in pediatric allogeneic bone marrow transplant recipients. **J. Oral. Pathol. Med.**, v. 30, n. 3, p. 148-153, 2001.

28. ORTI-RADUAN, E. S. L. **Análise quantitativa das células de Langerhans em mucosa bucal de pacientes submetidos ao transplante de medula óssea alogênico com doença enxerto contra hospedeiro crônica**. 2007. 75f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Baruru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.

29. ORTI-RADUAN, E. S. L. **Doença enxerto contra hospedeiro crônica em mucosa bucal**: relação da concentração de células de Langerhans com a expressão da quimiocina CCL20 e de seu receptor CCR6. 2011. 130f. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25150/tde-18012012-104510/>. Acesso em: 2012-02-14.

30. O'DONNEL, R. K. et al. Distribution of dendritic cell subtypes in primary oral squamous cell carcinoma in inconsistent with a functional response. **Cancer Lett.**, v. 255, p. 145-152, 2007.

31. PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 327 p.

32. PERREAULT, C. et al. Persistence of host Langerhans cells following allogeneic bone marrow transplantation: possible relationship with acute graft-versus-host disease. **Br. J. Haematol.**, v. 60, n. 2, p. 253-260, 1985.

33. REIS, M. A. L. et al. Reconstituição imunológica após o transplante de medula óssea alogênico. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 26, n.3, p. 212-217, 2004.

34. ROSSI, M. et al. Plasmacytoid dendritic cells: Do they have a role in immune responses after hematopoietic cell transplantation?. **Hum. Immunol.**, v. 63, p. 1194-1200, 2002.

35. SALE, G. E. Pathology and recent pathogenetic studies in human graft-versus-host disease. **Surv. Synth. Pathol. Res.**, v. 3, n. 3, p. 235-253, 1984.

36. SATO, M. et al. Immunohistopathological study of the oral lichenoid lesions of chronic GVHD. **J. Oral. Pathol. Med.**, v. 35, n. 1, p. 33-36, 2006.

37. SHARON, J. **Imunologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 267.

38. SHLOMCHIK, W. D. et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. **Science**, v. 285, p. 412-415, 1999.

39. SHULMAN H.M, et al. Histopathologic Diagnosis of Chronic Graft-versus-Host Disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: II. Pathology Working Group Report. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.12, p 31-47, 2006.

40. SOARES, A. B. et al. Chronic GVHD in minor salivary glands and oral mucosa: histopathological and immunohistochemical evaluation of 25 patients. **J. Oral. Pathol. Med.**, v. 34, n. 6, p. 368-373, 2005.

41. SOUSA, C. R.; SHER, A.; KAYE, P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, p. 392-399, 1999.

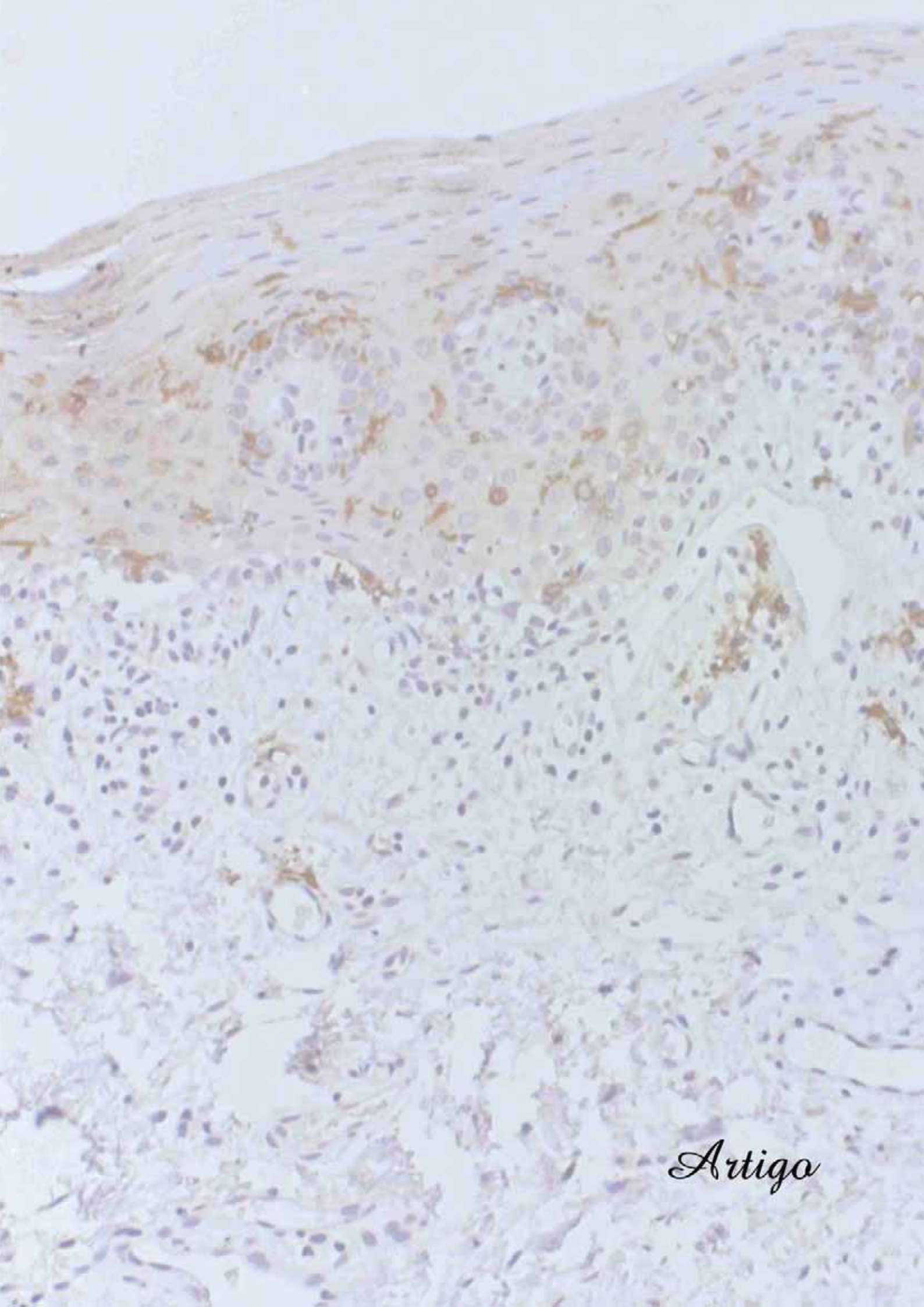
42. SOUZA, A. W. S. et al. Tolerância ou auto-imunidade? O delicado equilíbrio do sistema imunológico. **Sinop. Reumatol.**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2009.

43. STEINMAN, R. M.; COHN, A. Z. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. **J. Exp. Med.**, v. 137, p. 1142-1162, 1973.

44. WACKERNAGEL, A. et al. Plasmocytoid dendritic cells are absent in skin lesions of polymorphic light eruption. **Photodermatolol. Photoimmunol. Photomed.**, v. 23, p. 24-28, 2007.

45. WEISS, C. et al. Immunohistochemical staining for differential diagnosis of cutaneous graft versus host disease and drug reactions. In: WORLD ALLERGY CONGRESS, 2007, Bangkok. **World Allergy Organ. J.**, p.S1-S10, 2007. doi: 10.1097/01.WOX.0000301060.08896.fb

46. ZABA, L. C.; KRUEGER, J. G.; LOWES, M. A. Resident and “inflammatory” dendritic cells in human skin. **J. Invest. Dermatol.**, v. 129, p. 302-308, 2009.


Artigo

ARTIGO

INTRODUÇÃO

A doença enxerto contra hospedeiro (DECH) ou *graft-versus-host-disease* (GVHD) é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes que foram submetidos ao transplante alogênico de medula óssea.[11] É uma síndrome com várias manifestações clínicas, patológicas e imunológicas, sendo atribuída à ação de linfócitos T ativados de um doador HLA incompatível em um receptor imunocomprometido.[12,16] A DECH ocorre quando os linfócitos T da medula transplantada reconhecem como estranhos os antígenos do complexo de histocompatibilidade do hospedeiro, proliferando e atacando os tecidos do mesmo.[12,13]

Para que a DECH ocorra, o enxerto deve conter células imunologicamente competentes e o hospedeiro deve ser incapaz de apresentar resposta efetiva para destruir as células transplantadas. Além disso, o hospedeiro deve expressar antígenos teciduais que não estão presentes no doador.[1]

Os fatores de risco para o desenvolvimento da DECH estão presentes tanto no doador quanto no receptor. Fatores de risco do receptor são: idade maior que 50 anos, o regime de condicionamento pré transplante, o uso de radiação e o tipo de profilaxia utilizada. Os fatores de risco relacionados ao doador são: a disparidade de sexo entre doador e receptor (doador feminino e receptor masculino), o número de gestações prévias, a compatibilidade HLA e o tipo de fonte de células utilizado.[3,4]

De acordo com a cronologia, achados clínicos e histologia, pode-se classificar a DECH em duas formas: aguda (DECHa) e crônica (DECHc), de acordo com a época de aparecimento das manifestações clinicas. Na forma aguda as manifestações surgem antes dos 100 dias pós-transplante e é caracterizada pelo envolvimento de pele (através de rash cutâneo maculo papular), fígado e trato gastrintestinal.[9]

A cavidade bucal é afetada em ambas as formas de DECH, sendo a morbidade oral altamente significativa.[22] De acordo com a classificação atual,

proposta pelo *National Institute of Health* (NIH), a presença de lesões orais liquenoides, placas hiperqueratóticas e restrição a abertura bucal são características diagnósticas de DECHc, isto é, são suficientes para a comprovação diagnóstica de DECH, dispensando a análise histológica. As manifestações de xerostomia, mucocele, atrofia e úlceras necessitam da confirmação histológica.[7,8]

A utilização de anticorpos monoclonais em técnicas imuno-histoquímicas vem sendo freqüente em estudos para a investigação das subpopulações de células linfoides envolvidas na DECH bucal, incluindo as células dendríticas.[5,7,18]

As células dendríticas constituem uma família de células apresentadoras de antígeno (APCs) oriundas de progenitores hematoipoéticos da medula óssea com capacidade para interagir com linfócitos T e B e modular suas respostas. Foram descritas em 1973 por Steinman e Cohn a partir de células isoladas no baço, sendo denominadas dendríticas devido a sua morfologia.[25,26]

Duas linhagens distintas de células dendríticas têm sido descritas em humanos: células dendríticas mielóides, que expressam CD1a, sendo derivadas de monócitos e macrófagos e células dendríticas plasmocitóides, que expressam o receptor alfa de interleucina-3 (CD123) e têm uma origem linfóide.[21]

O papel das células dendríticas plasmocitóides na doença enxerto contra hospedeiro permanece incerto e sua função in vivo como células apresentadoras de antígeno permanece controversa. Foi demonstrado em murinos que elas podem ser capazes de iniciar células T alorreativas e causar doença enxerto contra hospedeiro.[10] Por outro lado a depleção de células dendríticas plasmocitoides do enxerto de medula óssea resultou em aceleração da mortalidade da DECH.[2]

As células dendríticas plasmocitóides tem implicações particulares na recuperação imunológica no período logo após o transplante de células tronco, e a sua interação com células NK (*natural killer*) determinando respostas importantes para a indução de tolerância para evitar a DECH e um efeito antitumoral para prevenir recaídas.[3]

Não há relatos da participação e do padrão de distribuição dessas células nas lesões de DECHc de mucosa bucal. Sendo assim, sua investigação poderia ser uma estratégia promissora para um melhor entendimento da patogênese e novas abordagens terapêuticas da DECH.

OBJETIVO

Avaliar a presença e a concentração das células dendríticas e células NK, imunomarcadas pelos anticorpos primários anti-CD123, anti CD1a e anti-CD56 em fragmentos de mucosa de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas com e sem DECH crônica.

MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospital Amaral Carvalho, Jaú – SP, sob o n°141/10.

Biópsias por punch de mucosa oral de pacientes do Hospital Amaral Carvalho, submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas foram obtidas do arquivo do serviço de Anatomia Patológica no período de 2009 a 2011. Foram selecionados dois grupos: **Grupo 1*:*** 13 biópsias de mucosa oral de pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) submetidos ao o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas de medula óssea de doadores aparentados que desenvolveram doença enxerto contra hospedeiro crônica (DECHc), confirmado pela análise clínica e microscópica. ***Grupo 2:*** 13 biópsias de mucosa oral de pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) submetidos ao o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas de medula óssea de doadores aparentados que não desenvolveram doença enxerto contra hospedeiro crônica (DECHc), confirmado pela análise clínica e microscópica. Ausência de DECHc também em outros órgãos (pele, fígado e trato gastrointestinal), durante todo o tratamento imunossupressor pós-transplante.

MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Cortes microscópicos seriados de 3µm de espessura fixados em formalina tamponada, foram obtidos e preparados para coloração imuno-histoquímica. Após o corte, as fitas obtidas pelo micrótomo foram colocadas em banho-maria histológico e depositadas em lâminas previamente silanizadas (Organo-silano Sigma Cód A3648). As lâminas com os cortes foram levadas à estufa a 60ºC por 5 horas. Em seguida foi efetuada a desparafinização e hidratação dos cortes microscópicos em 3 cubas de xilol por 10 minutos cada uma e 4 cubas de álcool absoluto (99,5%), 1 minuto cada e posteriormente deixados em água destilada por 3 minutos. Em seguida foram realizados os protocolos imuno-histoquímicos, utilizando a técnica Streptavidina Biotina Peroxidase (LSAB-Dako) para o anticorpo anti-CD123 e a técnica do Polímero (Envision) para o anticorpo anti-CD1a e anti-CD56. A recuperação antigênica foi feita com tampão citrato pH 6.2 Target (Dako-K-035) em câmara pressurizada. A incubação com anticorpo monoclonal anti-CD123 (clone 6H6-e Bionscience) a 1:200 em diluente apropriado (Dako cód S3022) por 30 minutos em temperatura ambiente. A incubação com anticorpos monoclonais anti-CD1a (clone 010-Dako) a 1:50 e anti-CD56 (NCAM-clone 1B6-Biocare Medical) a 1:100 em diluente apropriado (Dako cód S3022) por 30 minutos em temperatura ambiente.

QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS

As células dendríticas e células NK do córion foram quantificadas por meio de um sistema computadorizado de captura de imagens na região do tecido conjuntivo subepitelial.

A contagem das células foi realizada, por dois examinadores, sem o conhecimento prévio dos grupos a que pertenciam as amostras de mucosa bucal.

O número de células dendríticas do córion da mucosa bucal imunomarcadas, por milímetro quadrado, em cada espécime cirúrgico foi calculado dividindo-se a média das células dendríticas presentes nos 10 campos examinados pela área percorrida em cada espécime. As imagems

foram capturadas por um sistema de processamento e análise de imagens (Image Lab – Softium Informática Ltda - ME).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi aplicado o método de Mann-Witney, pois os dados não apresentaram uma distribuição normal.

RESULTADOS

Os resultados foram avaliados pelo método de Mann-Witney. A análise entre grupos com e sem DECH demonstrou o aumento estastiticamente significativo para as células CD1a (p=0,022) e para as células CD56 (p=0,04). Houve ausência de imunomarcação para as células CD123 tanto nos casos com DECH como nos sem DECH.

A distribuição dos pacientes de acordo com o sexo, a idade apresentada no momento da biópsia, nos diferentes Grupos de pacientes transplantados que desenvolveram a doença (Grupo 1) e os que não desenvolveram (Grupo 2), pode ser visualizada na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos pacientes com e sem DECHc de acordo com o sexo e a idade.

Características	Com DECHc		Sem DECHc	
	n	%	n	%
Sexo				
Masculino	7	53,8	9	69,2
Feminino	6	46,2	4	30,8
Idade				
≤ 20 anos	1	7,7	1	7,7
21 a 40 anos	8	61,5	10	76,9
≥ 40 anos	4	30,8	2	15,4
TOTAL	13	100	13	100

n = número de pacientes

A distribuição dos pacientes de acordo com acordo com o diagnóstico da doença, a data da biópsia em relação ao dia do transplante (D+) e terapia imunossupressora atual.

nos diferentes Grupos de pacientes transplantados que desenvolveram a doença (Grupo 1) e os que não desenvolveram (Grupo 2), pode ser visualizada na Tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição dos pacientes com e sem DECHc de acordo com o diagnóstico da doença; D+, a data da biópsia em relação ao dia do transplante e terapia imunossupressora atual.

Características	Com DECHc		Sem DECHc	
	n	%	n	%
Diagnóstico				
LMA	13	100	13	100
D+ (Dias)				
≤ 100	2	15,4	12	92,3
101-200	8	61,5	1	7,7
≥ 201	3	23,1	0	0
Terapia Imunossupressora				
Sim	9	69,2	12	92,3
Não	4	30,8	1	7,7
TOTAL	13	100	13	100

n = número de pacientes, D+, dia após o transplante de células tronco hematopoiéticas no qual foi realizada a biópsia.

A distribuição dos pacientes de acordo a relação do sexo entre receptor/doador, nos diferentes Grupos de pacientes transplantados que desenvolveram a doença (Grupo 1) e os que não desenvolveram (Grupo 2), pode ser visualizada na Tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição dos Grupos com e sem DECHc indicando a relação do sexo entre receptor/doador.

Características	Com DECHc		Sem DECHc	
	n	%	n	%
Receptor/Doador (Aparentado)				
M/M	6	46,2	7	53,8
M/F	2	15,3	2	15,4
F/F	5	38,5	4	30,8
TOTAL	13	100	13	100

n = número de pacientes; M: masculino; F: feminino

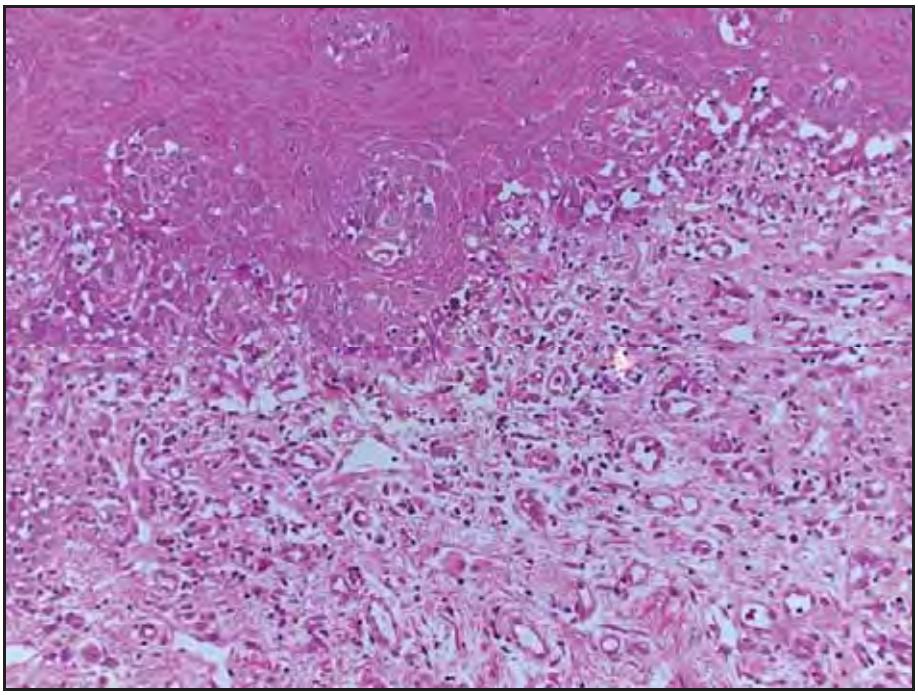


Figura 5: Aspecto microscópico da mucosa bucal de pacientes transplantado com DECHc 20X (infiltrado inflamatório).

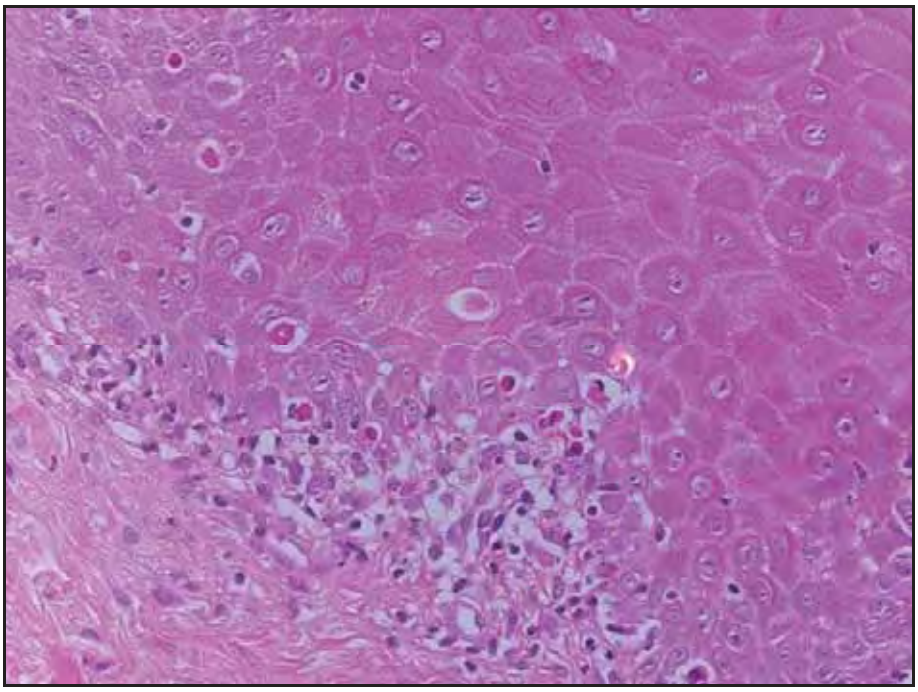


Figura 6: Aspecto microscópico da mucosa bucal de pacientes transplantado com DECHc 40X (áreas de apoptose).

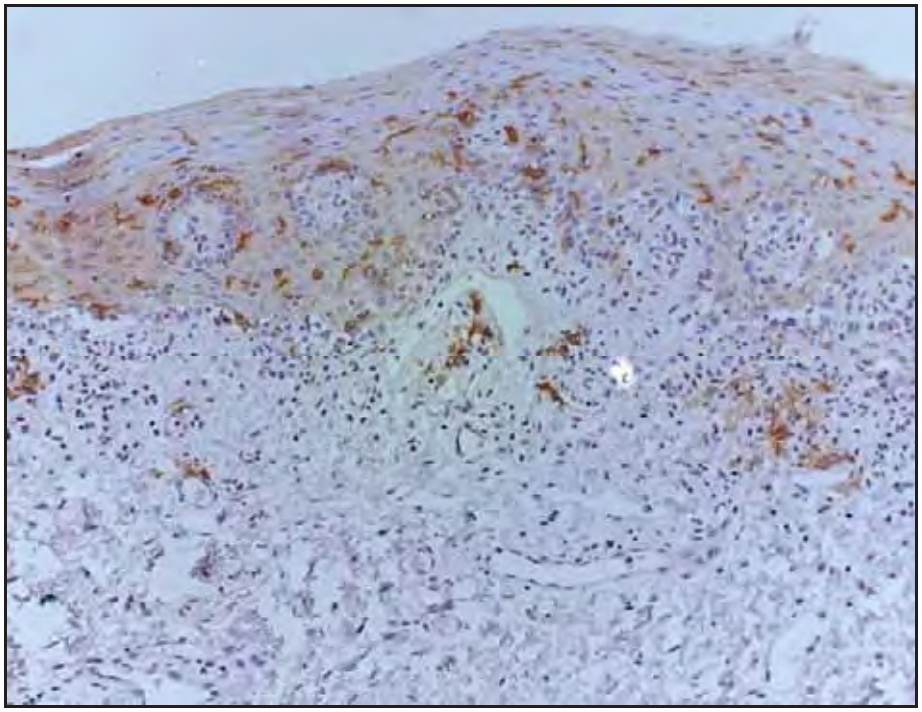


Figura 7: Células $CD1a^{+}$ em mucosa bucal de paciente transplantado com DECHc 20X.

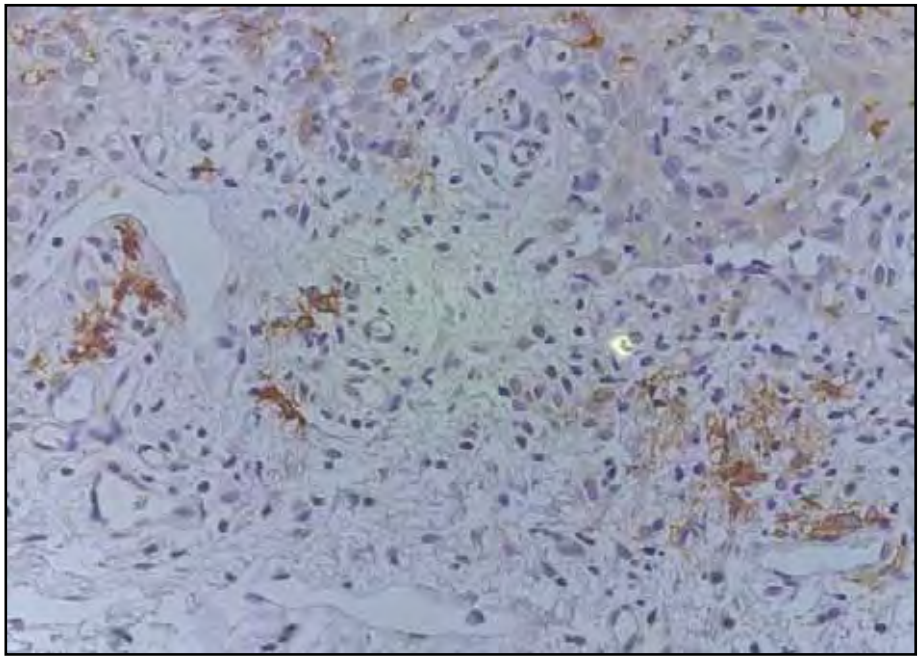


Figura 8: Células $CD1a^{+}$ em mucosa bucal de paciente transplantado com DECHc 40X.

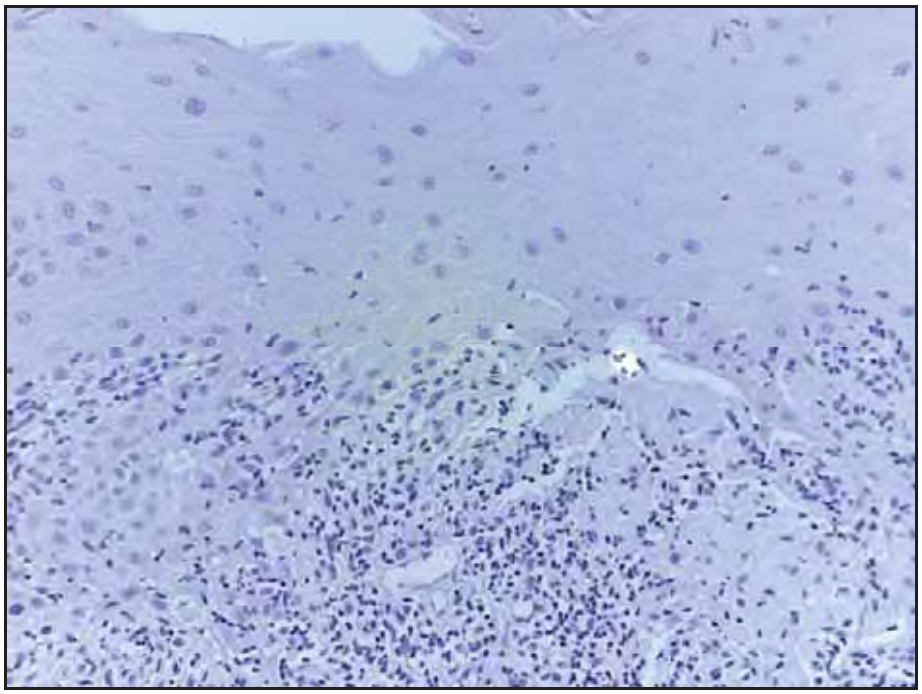


Figura 9: Ausência de imunomarcação para o anticorpo anti-CD123 em mucosa bucal de pacientes com DECHc 20X.

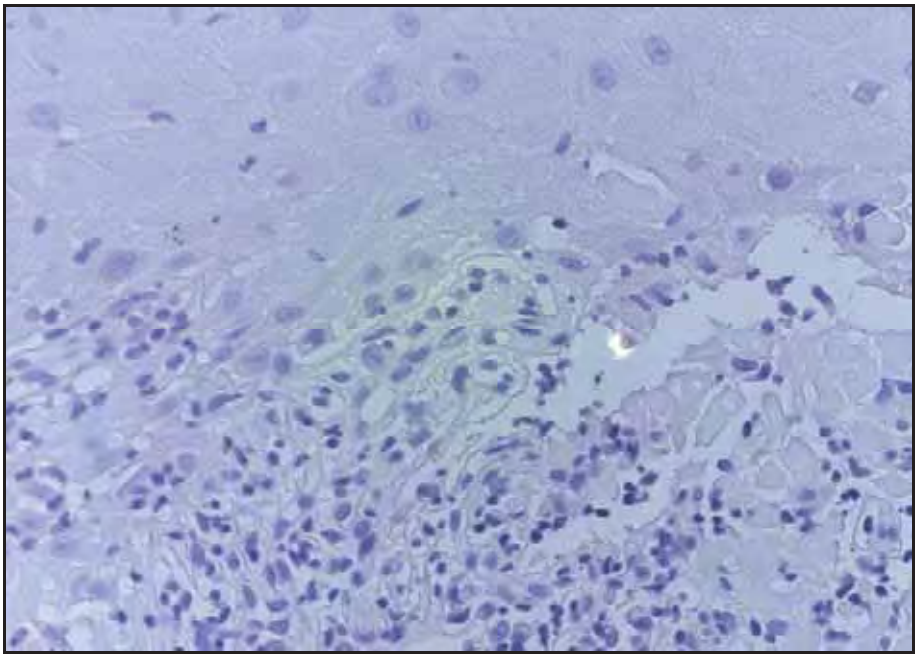


Figura 10: Ausência de imunomarcação para o anticorpo anti-CD123 em mucosa bucal de pacientes com DECHc 40X.

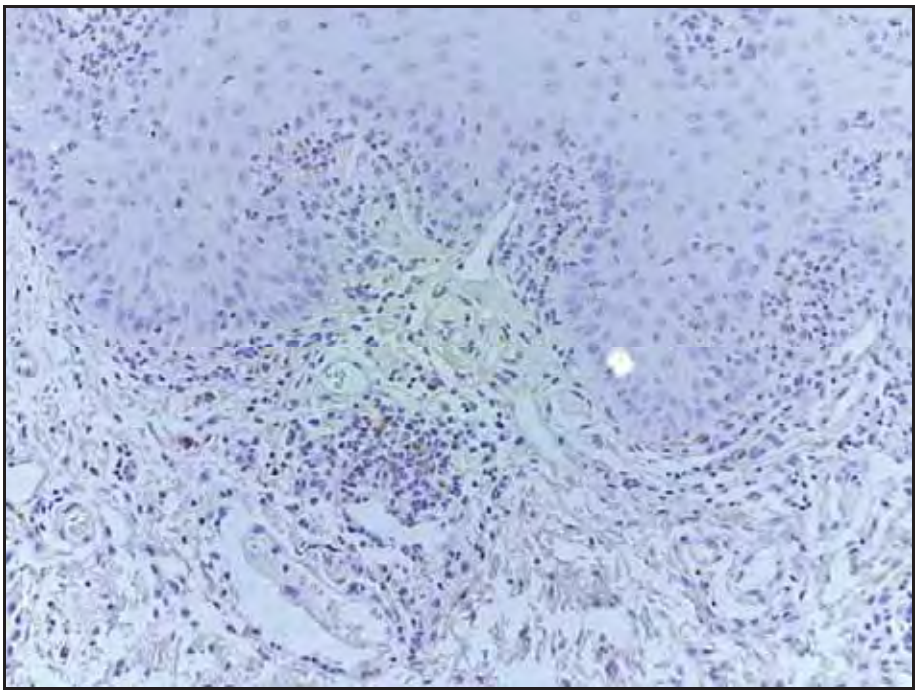


Figura 11: Células CD56^{+} em mucosa bucal de paciente transplantado com DECHc 20X.

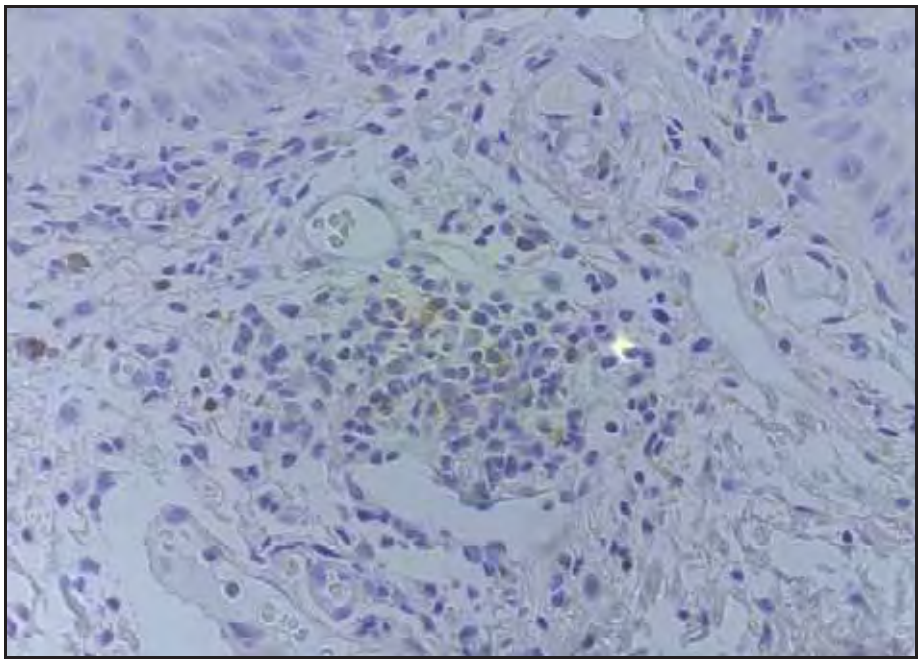


Figura 12: Células CD56^{+} em mucosa bucal de paciente transplantado com DECHc 40X.

DISCUSSÃO

Este estudo avaliou quantitativamente as subpopulações de células dendríticas Mielóides (CD1a), células dendríticas Plasmocitóides (CD123) e células NK (CD56) no córion da mucosa bucal de pacientes transplantados com DECH crônica. A escolha de indivíduos com a mesma doença base, Leucemia mielóide aguda (LMA), sem grandes variações de faixa etária e transplantes alogênicos aparentados foram importante para homogeneizar a amostra estudada, proporcionando semelhantes condições antigênicas.

O infiltrado inflamatório linfocitário, como observado no córion de biópsias de mucosa bucal em nosso estudo, é um aspecto característico da DECH pois sua ocorrência está associada a presença de linfócitos T ativados da medula óssea transplantada que reconhecem como estranhos os antígenos do complexo de histocompatibilidade do hospedeiro, proliferando e atacando os tecidos do mesmo.[16,23]

O foco neste estudo são as células do córion da mucosa bucal, diferente da maioria dos trabalhos da literatura, os quais enfocam as células dendríticas intraepiteliais da pele $CD1a^{+}$ / $CD207^{+}$, as células de Langerhans, sendo a subpopulação de células dendríticas mielóides dérmicas e plasmocitóides pouco relatadas.[17,18,29]

Este estudo demonstrou um aumento estatisticamente significante de células $CD1a^{+}/mm^{2}$ no córion da mucosa bucal em pacientes que desenvolveram GVHDc quando comparado a indivíduos transplantados sem a doença. Este resultado foi semelhante a outros estudos que analisaram células dendríticas na mucosa bucal de pacientes com GVHD, porém com avaliação restrita a células de Langerhans.[18]

Uma possível explicação para este aumento significativo da subpopulação de células dendríticas mielóides, seria a produção de quimiocinas específicas responsáveis pelo recrutamento de precursores mielóides a partir da medula óssea via sangue periférico. Um evento alorrelativo de células T do doador contra células dendríticas residuais do hospedeiro induziria o processo inflamatório característico da DECH.[13] Este processo estimularia a secreção de quimiocinas, estabeleceria um gradiente local, resultando no estímulo migratório para precursores hematopoiéticos

$CD34^+$ ou mais diferenciados a partir da medula óssea transplantada. Não pode ser afastada a proliferação de células dendríticas "*in situ*", embora descrita apenas em tecidos sãos.[13,14] As células dendriticas mielóides observadas no córion poderiam representar uma reserva para posterior migração para o epitélio.

Na literatura há um relato discordante, de acordo como o estudo de Deguchi *et al*., 2002, que avaliando DECH aguda e crônica de pele, mostrou um número reduzido de células dérmicas $CD1a^+$. Uma possível explicação para esta discrepância, além de diferenças intrínsecas relativas ao tecido em estudo, são os critérios diagnósticos de DECH cônica não estarem ainda bem estabelecidos, sendo utilizado o critério cronológico (mais de 100 dias) para inclusão dos casos.

Foi possível constatar-se neste estudo, um aumento estatisticamente significativo de células NK/mm^2 no infiltrado inflamatório do córion da mucosa bucal de pacientes com GVHD em relação ao grupo controle.

Isso significa que outros fatores de ativação podem estar envolvidos, uma vez que células dendríticas plasmocitóides sabidamente ativadoras de células NK não foram detectadas.

Os resultados deste estudo demonstraram a ausência de células $CD123^+$ no córion de mucosa bucal de pacientes com e sem DECH, o que fala contra a participação da linhagem de células dendríticas plasmocitóides na patogênese da DECHc. Ao contrário, em estudo realizado em pele por Weiss *et al*., 2007, foi detectada uma relevante infiltração dérmica (>20 células por mm^2) de células dendríticas plasmocitóides em pacientes com DECH quando comparada à reação a droga, onde o infiltrado era predominantemente da linhagem mielóide.

Estudos demonstram a ausência de imunomarcação de células dendríticas plasmocitóides $CD123^+$ em pele normal, psoríase e erupção polimorfa à luz.[6,27,29] Já em lesões cutâneas de doenças autoimunes Lupus Eritematoso e Dermatomiosite, sua expressão está aumentada.[15]

Desde que células dendríticas plasmocitóides são sabidamente ativadoras de células NK, não se pode ser totalmente afastada sua participação na patogênese da doença, seja em fase muito iniciais ou em número muito

reduzido, com detecção prejudicada pela baixa sensibilidade dos anticorpos comercialmente disponíveis na atualidade.[19]

Estudos futuros seriam necessários para afastar outros fatores ativadores de células NK, bem como confirmar a ausência de células dendríticas da linhagem plasmocitóide no córion da mucosa bucal de pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas com doença enxerto contra hospedeiro crônica.

CONCLUSÃO

O presente estudo comprovou o aumento de células CD1a+ e NK no córion da mucosa bucal de pacientes com DECH crônica. A ausência da imunomarcação para CD123 não exclui a sua participação no processo da DECH crônica. Estudos posteriores com maior número de casos e comparando a expressão destes marcadores também na DECH aguda serão de grande valia para a melhor compreensão da fisiopatologia da DECH.

REFERÊNCIAS

1. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reaction. Harvey Lect. 1966; 62:21-78.

2. Banovic T, Markey KA, Kuns RD, Olver SD, Raffelt NC, Don AL, et al. Graft-versus-host disease prevents the maturation of plasmacytoid dendritic cells. J Immunol. 2009; 182:912-20.

3. Chklovskaia H, Nowbakht P, Nissen C, Gratwohl A, Bargetzi M, Wodnar-Fillipowicz A. Reconstituition of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell transplantation: affects of endogenous flt3 ligand. Blood. 2005; 103:3860-8.

4. Clark FJ, Chakraverty R. Role of dendritic cells in graft-versus-host disease. J Hematother Stem Cell Res. 2002; 11:601-16.

5. Deguchi M, Aiba S, Ohtani H, Nagura H, Tagami H. Comparison of the distribution and numbers of antigen-presenting cells amongt-lymphocyte-mediated dermatoses. Arch Dermatol Res. 2002; 294:297-302.

6. Ebner S, Ehammer Z, Holzmann S, Schwingshacki P, Forstner M, Huemer GM, et al. Expression of c-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. Int Immunol. 2004; 16:877-87.

7. Ferrara JLM. Pathogeneses of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular affector. J Hematother Stem Cell Res. 2000; 9:299-306.

8. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavlelic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. diagnosis and staging working group report. Biol Blood Marrow Transplant. 2005; 11:945-56.

9. Hasséus B, Jontel M, Johansson P, Dahlgren UI. Langerhans cells and t cells in oral graft versus host disease and oral lichen planus. Scand J Immunol. 2001; 54:516-24.

10. Koyama M. Plasmocytoid dendritic cells prima alloreactive t cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. Blood. 2009; 113:2088-95.

11. Lampert IA, Jonossy G, Suitters AJ, Bofill M, Palmer S, Gordon-Smith E, et al. Immunological analysis of the skin in graft versus host disease. Clin Exp Immunol. 1982; 5:193-202.

12. Mattsson T, Sundqvist KG, Heimdahl A, Dahllöf G, Ljungman P, Ringdén O. A comparative immunological analysis of the oral mucosa in chronic graft-versus-host disease and oral lichen planus. Arch Oral Biol. 1992; 37:539-47.

13. Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W, Charo I. Langerhans cells renew in the skin though out life under steady-state conditions. Nat Immunol. 2002; 3:1135-41.

14. Merad M. Ontogeny of langerhans cells and graft versus host disease. Adv Exp Med Biol. 2005; 560:115-23.

15. Mcniff JM, Kaplan DH. Plasmacytoid dentritc cells are present in cutaneous dermatomyositis lesions in a pattern distinct from lupus erythematosus. J Cutan Pathol. 2007; 35:452-56.

16. Nicolau-galitis O, Kitra V, Van Vliet-Constantinidou C, Peristeri J, Goussetis E, Petropoulos D, et al. The oral manifestations of chronic graft-versus-host disease (cgvhd) in pediatric allogeneic bone marrow transplant recipients. J Oral Pathol Med. 2001; 30:148-53.

17. Orti-raduan ESL. Análise quantitativa das células de langerhans em mucosa bucal de pacientes submetidos ao transplante de medula óssea alogênico com doença enxerto contra hospedeiro crônica [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2007.

18. Orti-raduan ESL. Doença enxerto contra hospedeiro crônica em mucosa bucal: relação da concentração de células de langerhans com a expressão da quimiocina ccl20 e de seu receptor ccr6 [tese]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2011.

19. O'donnel RK, Mick R, Feldman M, Hino S, Wang Y, Brose M, et al. Distribution of dendritic cell subtypes in primary oral squamous cell carcinoma in inconsistent with a functional response. Cancer Lett. 2007; 255:145-52.

20. Reis MAL, Mick R, Feldman M, Hino S, Wang Y, Brose M, et al. Reconstituição imunológica após o transplante de medula óssea alogênico. Rev Bras Hematol Hemoter. 2004; 26:212-7.

21. Rossi M, Arpinati M, Rondelli D, Anasetti C. Plasmacytoid dendritic cells: do they have a role in immune responses after hematopoietic cell transplantation?. Hum Immunol. 2002; 63:1194-200.

22. Sale GE. Pathology and recent pathogenetic studies in human graft-versus-host disease. Surv Synth Pathol Res. 1984; 3:235-53.

23. Soares AB, Faria PR, Magna LA, Correa ME, de Souza CA, Almeida OP, et al. Chronic gvhd in minor salivary glands and oral mucosa: histopathological and immunohistochemical evaluation of 25 patients. J Oral Pathol Med. 2005; 34:368-73.

24. Sousa CR, Sher A, Kaye P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. Curr Opin Immunol. 1999; 11:392-9.

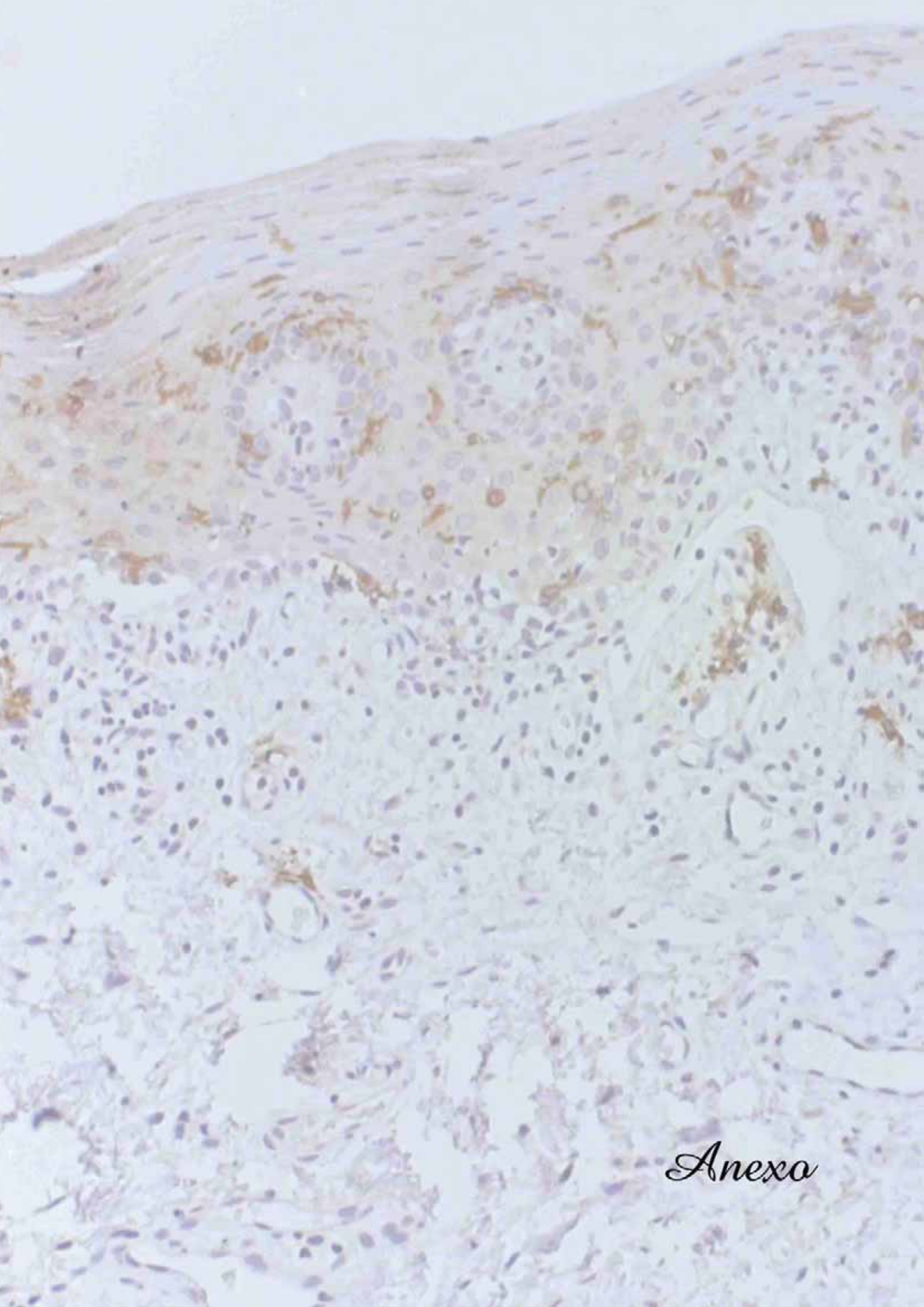
25. Souza AWS, Mesquita D, Araújo JAP, Catelan TTT, Andrade LEC, Silva NP, et al. Tolerância ou auto-imunidade? O delicado equilíbrio do sistema imunológico. Sinop Reumatol. 2009; 11:1-17.

26. Steinman RM, Cohn AZ. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. J Exp Med. 1973; 137:1142-62.

27. Wackernagel A, Massone C, Hoefler G, Steinbauer A, Kerl H, Wolf P. Plasmocytoid dendritic cells are absent in skin lesions of polymorphic light eruption. Photodermatolol Photoimmunol Photomed. 2007; 23:24-8.

28. Weiss C, Burgdorf W, Flaig M, Tischer J, Tietze J, Hans-Jochem K, et al. Immunohistochemical staining for differential diagnosis of cutaneous graft versus host disease and drug reactions. In: World Allergy Congress; 2007; Bangkok. World Allergy Organ J. 2007; s1-10. doi: 10.1097/01.wox.0000301060.08896.fb

29. Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA. Resident and “inflammatory” dendritic cells in human skin. J Iinvest Dermatol. 2009; 129:302-8.



Anexo

FUNDAÇÃO AMARAL CARVALHO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Fundação Hospital Amaral Carvalho

Rua Dr. Miranda Junior, 16, Jardim Alvorada - CEP 17.210-300 - Jaú / SP - Tel. (014) 3602-1194 - Ramal 1550

Parecer CEPFHAC – 141/10 - Recurso.

Projeto de Pesquisa:
"Análise das Subpopulações de Células Dendríticas no Infiltrado Subepitelial da Doença Enxerto Contra Hospedeiro Crônica de Mucosa Bucal"

Documentos Analisados:
✓ Projeto de Pesquisa Completo

Responsáveis pelo Estudo:
Autoria: Clara Marino Espricigo Botari – Bióloga – Aluna do Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica - Mestrado Profissional – UNESP/Botucatu.
Orientadora: Ana Gabriela Sálvio – Médica Dermatologista – Hospital Amaral Carvalho de Jau.

Trata se de Recurso ao Parecer CEPFHAC nº. 141/10, datado de 26 de novembro de 2010, onde o projeto de pesquisa supracitado foi considerado aprovado com recomendação. Para iniciar a pesquisa o pesquisador deveria apresentar recurso abordando quatro pontos: a. Apresentar autorização do chefe do Serviço de Transplante de Medula Óssea; b. Apresentar nova Folha de Rosto, corrigindo o número de sujeitos participantes; c. Alterar o título do estudo, e d. substituir o termo "Transplante de Medula Óssea" para "Transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH)".

A pesquisadora apresentou a autorização do médico responsável pelo Serviço de Transplante de Medula Ossea, Dr. Vergílio Antônio Rensi Colturato.

Apresentou também nova Folha de Rosto, corrigindo o número de sujeitos da pesquisa para 30, conforme alteração no item "Materiais e Métodos" do estudo.

Quanto ao Projeto de Pesquisa a pesquisadora propôs um novo título, "Análise das Subpopulações de Células Dendríticas no Infiltrado Subepitelial da Doença Enxerto Contra Hospedeiro Crônica de Mucosa Bucal". Por fim, substitulu o termo "Transplante de Medula Óssea" para "Transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH)"

As alterações propostas são suficientes para por fim às recomendações do parecer anterior. Não resta qualquer outro entrave ético que impossibilite o início da pesquisa.

Diante do exposto, manifestamo-nos pela aprovação sem restrições dos documentos avaliados.

Informamos que os referidos documentos são rubricados pelo colaborador do CEPFHAC, Ricardo Augusto Sertori, e que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo participou da votação.

Aproveito para recordar-lhe do compromisso de enviar relatórios semestrais referentes à evolução do estudo.

Jaú, 22 de dezembro de 2011.

Dr. Ederson Roberto de Mattos
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Hospital Amaral Carvalho