**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

ÉRIKA SINARA LENHARO ORTI-RADUAN

**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**

**BAURU
2011**

ÉRIKA SINARA LENHARO ORTI-RADUAN

**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 apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Soares Lara

Versão corrigida

BAURU

2011

Orti-Raduan, Érika Sinara Lenharo
Or8d 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 / Érika Sinara Lenharo Orti-Raduan. -- Bauru, 2011.
110 p. : il. ; 30 cm.

Tese. (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Profa. Dra. Vanessa Soares Lara

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Amaral Carvalho
Protocolo nº: 147/09
Data: 29 de outubro de 2009.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ÉRIKA SINARA LENHARO ORTI-RADUAN

DADOS CURRICULARES

19/11/1974 Botucatu – SP	Nascimento
Filiação	Vera Lúcia Lenharo Orti Silvio Orti
1997 – 2002	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade do Sagrado Coração – USC
2004 – 2011	Estagiária do Laboratório de Patologia do Hospital Amaral Carvalho, Jaú - SP
2005 – 2007	Curso de Mestrado em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo
2007– 2011	Curso de Doutorado em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família:

Ao meu esposo, *Ramis Ramsés Raduan*

Ao meu filho, *Ramis Henrique Orti Raduan*

Aos meus pais *Sílvio Orti* e *Vera Lúcia Lenharo Orti*

À minha irmã *Maira Thais Lenharo Orti*

Cada um à sua maneira contribuiu para a conclusão desta etapa da minha vida.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu esposo, ***Ramis Ramsés Raduan***, por saber esperar e por estar sempre ao meu lado. Sua paciência e cumplicidade permitiram que eu chegasse até aqui e fortaleceram o amor que sinto por você.

Ao meu filho, ***Ramis Henrique Orti Raduan***, ao meu lado incondicionalmente, apoiando-me em todos os momentos. Seu amor impulsionou-me a seguir adiante.

Aos meus pais, ***Silvio Orti*** e ***Vera Lúcia Lenharo Orti***, exemplos de coragem, força e determinação, vocês são meu alicerce, tenho muito orgulho da família que somos.

À minha irmã, ***Maira Thais Lenharo Orti***, pelo amor e pela amizade verdadeira que desenvolvemos ao longo desta jornada.

À minha madrinha ***Cleusa Franco Bueno***, sempre presente em minha vida.

Aos meus avós paternos ***Vitório Orti*** (*in memorian*) e ***Maria Senis Orti*** (*in memorian*) e maternos ***Izidora Toquete*** (*in memorian*) e ***Pedro Lenharo*** (*in memorian*) pela presença constante em minha infância e pelos exemplos de vida.

À família: ***Lenharo, Orti***, vocês nunca deixaram de acreditar no meu potencial.

Aos meus sogros ***Ramis Miguel Raduan*** (*in memorian*) e ***Vomilda Stocco Raduan***, pelo respeito e carinho que tiveram comigo.

Agradeço a ***DEUS***, simplesmente pela oportunidade da vida...

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, Profa. Dra. Vanessa Soares Lara

Uma pessoa gentil, educada e amável, com você aprendi a valorizar as coisas simples e enxergar nelas o grande valor que possuem.

A oportunidade de trabalhar com você durante esses anos, fez-me refletir sobre a importância de valorizarmos o ser humano em sua essência e principalmente em suas diferenças.

Você, com seu amor, despertou em mim o gosto pelo saber, pelo aprender e por fazer melhor diante das oportunidades. Tudo o que aprendi ao seu lado levarei comigo para aplicar nessa nova etapa que se inicia.

Estendo os agradecimentos à Família, em nome do **Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto**, sempre gentil e atencioso.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Aos demais professores da Disciplina de Patologia da FOB, **Prof. Dr. Alberto Consolaro**, pelos momentos agradáveis e ensinamentos compartilhados, **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira**, pela amizade e pelo carinho que dispensou a mim e ao **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**, um professor e um companheiro que pude contar em todos os momentos.

Ao **Dr. Adauto José Ferreira Nunes** por participar ativamente na realização deste trabalho e pela amizade que desenvolvemos ao longo destes anos. **Muito Obrigada!**

Ao técnico do Hospital Amaral Carvalho, **José Adalberto** por todo empenho e disponibilidade na realização da técnica imuno-histoquímica, você participou ativamente dessa etapa.

Muito Obrigada!

Ao **Prof. Dr. Luiz Casati Alvares** meu mestre desde a graduação, o senhor é um exemplo de caráter e profissionalismo, em seu nome gostaria de agradecer a todos os professores da minha graduação na Universidade do Sagrado Coração de Jesus.

Ao **Prof. Dr. Dejair Caitano do Nascimento** pela amizade desde a graduação e por incentivar-me à pesquisa.

Aos **Professores Dr. Ivaldo Gomes de Moraes** e **Dr. Roberto Brandão Garcia** pelo carinho que tiveram comigo durante toda a pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Heitor Marques Honório** pela colaboração na realização da análise estatística.

Às funcionárias da Disciplina de Patologia da FOB, **Maria Cristina Carrara Filippi**, **Fátima Aparecida Silveira** e **Marilza Dias de Almeida**, pelo carinho e convivência harmoniosa de tantos anos.

Aos colegas de pós-graduação, Adriana dos Santos Caetano, Ana Carolina Cuzzuol Fracalossi, Bethânia Camargo Pinheiro, Bruna Maria Rodrigues Vilardi, Carlos Eduardo Repeke, Carlos Henrique Betonni Cruz de Castro, Diego Mauricio Bravo Calderón, Érick Nelo Pedreira, Fernanda Mombrini Pigatti, Geraldo Marco Rosa Júnior, Janaína Salomon Ghizoni, Marcela Claudino da Silva, Maria Carolina Martins Mussi, Melaine de Almeida Lawall, Milton Santamaria Júnior, Priscila Lie Tobouti, Renata Bianco Consolaro, Roberta Dias Garcia, Renato Vieira de Moraes, Suzana Luzia Coelho Figliola, Sylvie Brener, Tais Maria Rodrigues Vilardi, Tiago Novaes Pinheiro, pelos bons momentos que passamos.

Em especial aos amigos: Ana Regina Casaroto, Aroldo dos Santos Almeida (*in memoriam*), Bruno Aiello Barbosa, Carine Ervolino de Oliveira, Celma Ferreira Almeida, Heliton Gustavo de Lima, Karen Henriette Pinke, Leda Aparecida Francischone, Maria Carolina Vaz Goulart, Mariela Leite, Marta Miyazawa, Patrícia Freitas-Faria, Rosário de Arruda e Simone Eloiza Sita Faustino pela amizade que compartilhamos, cada um de vocês estiveram e estarão sempre presentes em minha vida.

Aos cunhados e cunhadas da Loja Maçônica Honra Amor e Caridade de Bariri, pelo carinho que tiveram com minha família, pela amizade sincera e por poder contar com vocês durante a realização deste trabalho.

A todos os funcionários da Secretaria de Pós-graduação e da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente durante a pós-graduação.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS AO HOSPITAL AMARAL CARVALHO

Ao Diretor Clínico do Hospital Amaral Carvalho, Jaú – SP, na pessoa do **Dr. José Getúlio Martins Segalla**, pela atenção e dedicação concedidas a este trabalho.

Ao Coordenador do Comitê de Ética do Hospital Amaral Carvalho, na pessoa do **Dr. Éderson Roberto de Mattos**, e ao vice-coordenador na pessoa do **Dr. Mair Pedro de Souza** por colaborar na viabilização deste trabalho. Ao secretário do Comitê de Ética do Hospital Amaral Carvalho, **Ricardo Augusto Sartori**, pela atenção a mim dispensada.

Ao Diretor Reitor da Universidade Corporativa do Hospital Amaral Carvalho, na pessoa do **Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado**. Obrigada pelo apoio científico e pelas idéias inovadoras.

Ao responsável pela Unidade de Transplante de Medula Óssea, na pessoa do **Dr. Vergílio Antônio Rensi Colturato**, como também à equipe, **Dr. Mair Pedro de Souza** e **Dr. Marcos Augusto Mauad**, pela oportunidade a mim concedida para a realização desta pesquisa.

Ao **Dr. Luiz Aguinaldo Ricetto Pegorari** e a sua família, pela amizade e dedicação pessoal ao meu ingresso e permanência no Hospital Amaral Carvalho, Jaú - SP.

Ao chefe do serviço de Anatomia Patológica do Hospital Amaral Carvalho, Jaú - SP, na pessoa do **Dr. Francisco Carlos Quevedo**, e aos demais médicos do setor **Dr. Adauto José Ferreira Nunes** e **Dr. Francisco Alves Moraes Neto**, pela oportunidade e prontidão na realização desta pesquisa.

Aos funcionários do Hospital Amaral Carvalho do Serviço de Anatomia Patológica: **Adriana, Alessandra, Clara, Daniela, Érica, Gabriele, Joice, José Adalberto, Lílian, Maria Lúcia, Paulo, Silvana, Telma, Vanessa**, pela ajuda essencial na realização deste trabalho, compartilhei com vocês momentos de muita alegria.

Aos **pacientes do Hospital Amaral Carvalho** por me ensinarem o valor da vida.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS AO INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA

À chefe da equipe técnica de Patologia, na pessoa da **Dra. Andréa de Faria Fernandes Belone**.

Obrigada pela atenção e pelo carinho que me dispensou.

Ao chefe da seção de Anatomia Patológica, na pessoa do **Dr. Cleverson Teixeira Soares**,

obrigada pelas sugestões sempre pertinentes.

Ao Pesquisador Emérito **Dr. Raul Negrão Fleury**, pela convivência agradável que proporcionou a todos nós.

Aos médicos patologistas **Dr. Adauto José Ferreira Nunes** e **Dr. Jaison Antônio Barreto**.

Muito obrigada pelo incentivo.

Aos funcionários da equipe técnica, **Ana Lucia, Debora, Divanir, Fabiana, Edlaine, Luciana, Maria Helena, Nelci** e **Osmar**, pelo carinho que dedicaram a mim.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa do
excelentíssimo Diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira**.

À Comissão da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do
Presidente, **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**, e do vice-presidente, **Prof. Dr. Guilherme
dos Reis Pereira Janson**.

Ao Curso de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, da Faculdade de
Odontologia de Bauru, na Área de Concentração em Patologia Bucal, na pessoa da responsável
pela área **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira**.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio
pecuniário.

*"Não chega primeiro quem vai mais depressa,
mas sim quem sabe onde vai".*

Lucius Annaeus Seneca

RESUMO

A doença enxerto contra hospedeiro (GVHD) é uma complicação comum nos pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), sendo considerada a maior causa de morbidade e mortalidade nesses pacientes. O principal objetivo do presente estudo foi relacionar a concentração de células de Langerhans em mucosa bucal de pacientes com GVHDc bucal com a expressão da quimiocina CCL20 e de seu receptor CCR6 no epitélio bucal, a fim de elucidar os mecanismos biológicos envolvidos no recrutamento das células de Langerhans na GVHDc. Foram selecionados fragmentos obtidos por biópsia de mucosa bucal de 60 pacientes onco-hematológicos e hematológicos submetidos previamente ao transplante de células tronco hematopoiéticas no Hospital Amaral Carvalho, Jaú – SP, onde 30 pacientes desenvolveram GVHDc em mucosa bucal (Grupo 1) e 30 não desenvolveram GVHDc (Grupo 2). Amostras obtidas a partir de 30 biópsias de lesões não inflamatórias em mucosa bucal constituíram o Grupo Controle (Grupo 3). Cortes microscópicos foram avaliados em coloração de rotina Hematoxilina e Eosina, e submetidos à técnica imuno-histoquímica, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD1a e anti-CCR6, e anticorpos policlonais anti-CCL20. As células de Langerhans CD1a⁺ foram quantificadas no epitélio da mucosa bucal, e os resultados demonstraram um maior número destas células nos pacientes com GVHDc quando comparados àqueles sem GVHDc e ao Grupo Controle ($p<0,001$). A análise da imunomarcagem das moléculas CCR6 e CCL20 foi subjetiva com aplicação de escores. Quanto à molécula CCR6, houve maior expressão no Grupo 1 ($p<0,001$) em comparação aos outros Grupos; porém, quanto à expressão de CCL20, não houve diferença estatística entre os três Grupos ($p=0,108$). Estes resultados sugerem que o aumento das células de Langerhans, na doença enxerto contra hospedeiro crônica, em mucosa bucal, pode estar associado a maior expressão do receptor CCR6. Possivelmente, o maior recrutamento de células de Langerhans até a mucosa bucal, em pacientes transplantados de medula óssea, colabora para o desenvolvimento da GVHDc bucal.

Palavras-chave: Células de Langerhans. Quimiocina CCL20. Receptor CCR6. Transplante de Medula Óssea.

ABSTRACT

Chronic graft versus host disease in the oral mucosa: concentration of Langerhans cells and its relationship with the chemokine CCL20 and its receptor CCR6

The graft versus host disease (GVHD) is a common complication in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), and considered a major cause of morbidity and mortality in these patients. The main objective of this study was to compare the concentration of Langerhans cells in oral mucosa of patients with oral chronic GVHD (GVHDc) with the expression of the chemokine CCL20 and its receptor CCR6 in oral epithelium, in order to clarify the biological mechanisms involved in the recruitment of Langerhans cells in GVHDc. We selected 60 biopsies of oral mucosa from onco-hematological and hematological patients submitted to prior hematopoietic stem cell transplantation at Hospital Amaral Carvalho, Jaú - SP from which 30 patients developed GVHDc in the oral mucosa (Group 1) and 30 did not develop GVHDc (Group 2). The Control Group (Group 3) was obtained from 30 biopsies of non-inflammatory lesions of oral mucosa. Microscopic sections were evaluated in routine Hematoxylin and Eosin staining, and submitted to immunohistochemistry using anti-CD1a and anti-CCR6 monoclonal antibodies, and anti-CCL20 polyclonal antibody. The Langerhans cells (CD1a+) were quantified in the epithelium of the oral mucosa, and the results showed a greater number of these cells in patients with GVHDc compared to those without GVHDc and the Control Group ($p < 0.001$). Analysis of immunostaining of molecules CCL20 and CCR6 were subjective with application of scores. The expression of CCR6 molecule was more significant in Group 1 ($p < 0.001$) compared to other groups, but in relation to CCL20 expression, there was no statistical difference between the three groups ($p = 0.108$). These results suggest that the increase of Langerhans cells in GVHDc affecting oral mucosa may be associated with increased expression of the receptor CCR6. We suggest that the increased recruitment of Langerhans cells to the oral mucosa in patients with transplanted bone marrow contributes to the development of oral GVHDc.

Keywords: Langerhans cells. Chemokine CCL20. Receptor CCR6. Bone marrow transplantation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 -** Aspectos microscópicos da mucosa bucal de paciente transplantado de medula óssea com GVHDc (A), de paciente transplantado sem GVHDc (B), e de amostra Controle (C) (HE).. **71**
- Figura 2 -** Células CD1a⁺ em mucosa bucal de paciente transplantado de medula óssea com GVHDc (A), de paciente transplantado sem GVHDc (B), e de amostra Controle (C) (Imuno-histoquímica)..... **73**
- Figura 3 -** Cortes microscópicos da imunomarcção das moléculas CCR6 (A, B e C) e CCL20 (D) na mucosa bucal de paciente transplantado de medula óssea com GVHDc. Em (A) e (B), observar a imunomarcção forte, sendo que (B) representa maior aumento da região demarcada por linha tracejada em (A). Em (C) e (D), notar imunomarcção moderada e fraca, respectivamente (Imuno-histoquímica)..... **75**

- GRÁFICOS

- Gráfico 1 -** Média e desvio padrão do número de células de Langerhans/mm² no epitélio da mucosa bucal dos pacientes dos Grupos com e sem GVHDc e do Grupo Controle. Letras iguais representam diferença estatística, p<0,001..... **66**
- Gráfico 2 -** Média e desvio padrão da expressão de CCR6 no epitélio da mucosa bucal dos pacientes dos Grupos com e sem GVHDc e do Grupo Controle. Letras iguais representam diferença estatística, p<0,001..... **67**
- Gráfico 3 -** Média da expressão de CCL20 no epitélio da mucosa bucal dos pacientes dos Grupos com e sem GVHDc e do Grupo Controle, p=0,108..... **69**
-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos pacientes com e sem GVHDc e do Grupo Controle de acordo com o sexo e a idade. Hospital Amaral Carvalho, Jaú, e Faculdade de Odontologia de Bauru, USP.....	52
Tabela 2 -	Distribuição dos pacientes dos Grupos com e sem GVHDc de acordo com o diagnóstico da doença, D+ e Terapia imunossupressora atual. Hospital Amaral Carvalho, Jaú.....	53
Tabela 3 -	Distribuição das amostras dos pacientes do Grupo Controle de acordo com as lesões não inflamatórias. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP.....	53
Tabela 4 -	Distribuição dos pacientes dos Grupos com e sem GVHDc indicando a relação do sexo entre receptor/doador. Hospital Amaral Carvalho, Jaú.....	54
Tabela 5 -	Características clínicas detectadas no momento da biópsia de mucosa bucal realizada nos pacientes com (n=30) e sem GVHDc (n=30). Hospital Amaral Carvalho, Jaú.....	55
Tabela 6 -	Distribuição das amostras referentes aos pacientes dos Grupos com (n=30) e sem GVHDc (n=30) quanto às características do tecido epitelial. Hospital Amaral Carvalho, Jaú.....	57
Tabela 7 -	Distribuição das amostras dos pacientes dos Grupos com (n=30) e sem GVHDc (n=30) quanto às características do tecido conjuntivo fibroso subjacente. Hospital Amaral Carvalho, Jaú.....	58
Tabela 8 -	Distribuição das amostras dos pacientes dos Grupos com (n=25) e sem GVHDc (n=30) quanto às características da glândula salivar menor. Hospital Amaral Carvalho, Jaú.....	60
Tabela 9 -	Distribuição das amostras referentes ao Grupo Controle (n=30), quanto às características do tecido epitelial. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP.....	61

Tabela 10 -	Distribuição das amostras do Grupo Controle (n=30), quanto às características do tecido conjuntivo fibroso subjacente. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP.....	63
Tabela 11 -	Distribuição das amostras do Grupo Controle (n=30), quanto às características da glândula salivar menor. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP.....	64
Tabela 12 -	Média e desvio padrão do número de células de Langerhans/mm ² na mucosa bucal dos pacientes transplantados com (n=30) e sem GVHDc (n=30) e do Grupo Controle (n=30).....	65
Tabela 13 -	Média e desvio padrão da expressão epitelial na mucosa bucal dos pacientes transplantados com (n=30) e sem GVHDc (n=30) e do Grupo Controle (n=30).....	67
Tabela 14 -	Média da expressão epitelial do anticorpo anti-CCL20 na mucosa bucal dos pacientes transplantados com (n=30) e sem GVHDc (n=30) e do Grupo Controle (n=30).....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	Células apresentadoras de antígenos
DECH	Doença enxerto contra hospedeiro
Fc	Fragmento cristalizável
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de monócitos – macrófagos
GVHD	Graft versus host disease / doença enxerto contra hospedeiro
GVHDa	Acute graft versus host disease / doença enxerto contra hospedeiro aguda
GVHDC	Chronic graft versus host disease / doença enxerto contra hospedeiro crônica
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MMP	Metaloproteinases
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	21
1.1	TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (TCTH) ...	23
1.2	DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO – DECH/GVHD.....	23
1.3	CÉLULAS DE LANGERHANS.....	25
1.4	AS QUIMIOCINAS ENVOLVIDAS NO RECRUTAMENTO DAS CÉLULAS DE LANGERHANS	30
1.5	AS CÉLULAS DE LANGERHANS, A QUIMIOCINA CCL20 E SEU RECEPTOR CCR6, NA DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO CRÔNICA (GVHDC).....	32
2	PROPOSIÇÃO	35
2.1	OBJETIVO GERAL.....	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	39
3.1	DELINEAMENTO DA AMOSTRAGEM.....	41
3.2	AMOSTRAGEM.....	42
3.3	ANÁLISE DEMOGRÁFICA E CLÍNICA	43
3.4	ANÁLISE MICROSCÓPICA EM HEMATOXILINA E EOSINA (HE)	43
3.5	MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	45
3.6	AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA	47
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
4	RESULTADOS	49
4.1	CASUÍSTICA	51
4.2	CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E CLÍNICA DA AMOSTRAGEM DE ESTUDO	51
4.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA DA AMOSTRAGEM.....	56
4.4	AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA	64
5	DISCUSSÃO	77
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICES.....	101
	ANEXOS	105

1 Introdução e Revisão de Literatura

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (TCTH)

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) ou transplante de medula óssea (TMO) é utilizado no tratamento de diversas doenças onco-hematológicas, como as leucemias e a mielodisplasia; no tratamento de doenças hematológicas, como aplasia de medula óssea e, também, no tratamento de doenças oncológicas, como os tumores sólidos de testículo, de mama e de ovário (PERREAULT et al., 1985; GRATWOHL, 1990; HASSÉUS et al., 2001; NICOLAU-GALITIS et al., 2001; MERAD, 2005; SOARES et al., 2005; SATO et al., 2006).

A preparação do paciente para a realização do TCTH consiste na utilização de radiação e/ou quimioterapia, no intuito de depletar suas células medulares, permitindo que as células-tronco transplantadas colonizem a medula óssea e se estabeleçam em um ambiente apropriado.

Células-tronco alogênicas são rapidamente rejeitadas, mesmo por um hospedeiro minimamente imunocompetente. Sendo assim, o hospedeiro e o doador devem ter sua compatibilidade cuidadosamente testada para todos os *loci* polimórficos do Complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Além disso, para se evitar a rejeição das células transplantadas, é necessário suprimir fortemente o sistema imune do receptor/hospedeiro para permitir a efetivação e o sucesso do transplante de medula óssea. Mesmo após o enxerto bem sucedido, dois problemas adicionais são frequentemente associados ao TCTH, sendo eles: a imunodeficiência e a doença enxerto contra hospedeiro.

1.2 DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO – DECH/GVHD

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 medula óssea (LAMPERT et al., 1982). A GVHD ocorre quando os linfócitos T ativados, 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; SOARES et al., 2005). Diferenças genéticas em antígenos de histocompatibilidade maiores ou, pelo menos, menores são uma necessidade absoluta, por definição, para o desenvolvimento da GVHD (SALE, 1984; PERREAULT et al., 1985).

Duas formas de GVHD têm sido descritas: a aguda (GVHDa) e a crônica (GVHDc). No passado, eram definidas de acordo com o tempo de aparecimento dos sinais clínicos, ou seja, na aguda, anterior a 100 dias após o transplante e, na forma crônica, persistência ou aparecimento dos sinais após este período (HASSÉUS et al., 2001; SATO et al., 2006). Avanços na prática do transplante, nas últimas décadas, alteraram profundamente o entendimento da história natural da GVHD. Assim, recentemente, novos critérios para o diagnóstico de GVHDc e um novo escore clínico foram estabelecidos, dando prioridade à extensão e à gravidade da GVHDc para cada órgão ou sítio em determinado momento, independentemente do tempo de aparecimento dos sintomas, após o transplante (FILIPOVICH et al., 2005).

A forma aguda é definida na ausência de características *diagnósticas* ou *distintivas* da GVHDc, incluindo GVHDa clássica ocorrendo dentro de 100 dias após o transplante de medula óssea e GVHDa persistente ou tardia, ocorrendo após 100 dias.

Ao contrário, o diagnóstico da forma crônica exige a presença de pelo menos um sinal clínico *diagnóstico* de GVHDc (ou seja, um sinal que estabelece a presença da doença, mas sem a necessidade de outros testes ou evidência de envolvimento de outros órgãos) ou a presença de, pelo menos, uma manifestação *distintiva* (manifestação vista na doença crônica, mas insuficiente por si só para estabelecer um diagnóstico, a qual deve ser confirmada por biópsia ou outros testes relevantes). Outros possíveis diagnósticos para os sintomas clínicos devem ser excluídos. As categorias de GVHDc incluem a doença clássica, sem as características da forma aguda, e uma síndrome de sobreposição, na qual aspectos diagnósticos de ambas as formas aparecem juntos (FILIPOVICH et al., 2005).

Um escore global da GVHDc, após a confirmação de seu diagnóstico, foi proposto com base no número de órgãos ou locais envolvidos e na gravidade de cada órgão afetado, com graduação em leve, moderada e grave. Esse escore global

reflete o grau da doença e guia a terapêutica recomendada (FILIPOVICH et al., 2005).

A GVHDc é uma das principais complicações do TCTH, e sua incidência varia de 6% a 80% em função da idade do receptor, tipo de doador, escolha e manipulação do enxerto e uso de infusões de linfócitos do doador pós transplante de medula óssea (REMBERGER et al., 2001; FILIPOVICH et al., 2005; LEE; DEEG, 2008; SCHUBERT; CORREA, 2008). Os sintomas da GVHD costumam se apresentar no prazo de três dias, após transplante da medula óssea. A cavidade bucal é afetada em ambas as formas de GVHD, sendo a morbidade oral altamente significativa (SALE, 1984). Características *diagnósticas* da GVHDc oral incluem lesões liquenóides afetando mucosa bucal, língua, palato ou lábios. Além disso, placas hiperqueratóticas e restrição da abertura da boca podem ocorrer, sendo suficientes para estabelecer o diagnóstico. As características *distintivas* da GVHDc oral incluem xerostomia, mucocela, bem como úlceras não associadas com infecção, toxicidade por drogas ou malignidade (FILIPOVICH et al., 2005).

1.3 CÉLULAS DE LANGERHANS

Em 1868, Paul Langerhans (1868 apud LOMBARDI; HAUSER; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1993; LINS et al., 2003), um estudante de Medicina interessado na anatomia de nervos da pele, descreveu uma população de células de formato dendrítico, localizadas nas camadas suprabasais da epiderme, usando uma técnica de impregnação por cloreto de ouro. Estas células foram posteriormente identificadas em quase todos os epitélios escamosos estratificados dos mamíferos. Por muitos anos, estas células foram consideradas como células ectodérmicas, artefatos, melanócitos ou elementos neurais, tais como as células de Schwann (KATZ; TAMAKI; SACHS, 1979 apud LOMBARDI; HAUSER; BUDDTZ-JÖRGENSEN, 1993). Entretanto a função das células de Langerhans permaneceu desconhecida até os anos de 1960 e 1970, quando marcadores mais específicos foram descobertos (MIZUMOTO; TAKASHIMA, 2004).

As células de Langerhans representam um subconjunto exclusivo das células dendríticas presentes no epitélio da pele e mucosas, servindo como um mecanismo

protetor nesta barreira física, iniciando tanto respostas inatas quanto imunes e agindo, desse modo, como sentinelas imunológicas (LOMBARDI; HAUSER; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1993; HASSEÚS et al., 2001; LINS et al., 2003; MERAD et al., 2002, 2004; MERAD, 2005). Elas fazem parte de uma família de células apresentadoras de antígenos (APCs) oriundas de progenitores da medula óssea com capacidade para interagir com os linfócitos T e B e modular as suas respostas (SOUSA; SHER; KAYE, 1999; ARDAVIN et al., 2001; KELLER, 2001; CIRRINCIONE et al., 2002). As células de Langerhans são capacitadas para processar antígenos estranhos presentes nas mucosas e na pele. Com a ativação, há um aumento da expressão de MHC classe II e de moléculas co-estimuladoras, após isso, células de Langerhans migram para os nódulos linfáticos de drenagem e iniciam respostas imunes para sensibilizar células T específicas, tendo um papel chave como sentinela da imunidade da pele (SCHULER; STEINMAN, 1985; MERAD et al., 2004).

Essas células exibem aspectos ultra estruturais peculiares (NEWCOMB; SEYMOUR; POWELL, 1982; DIFRANCO et al., 1985; LOMBARDI; HAUSER; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1993; MISERY; DEZUTTER-DAMBUYANT, 1995; MERAD, 2005) sendo eles: núcleo denteado ou lobulado, aparelho de Golgi bem desenvolvido, ausência de melanossomas e de tonofilamentos e presença de grânulos de Birbeck, sendo esta característica considerada exclusiva e aparentemente relacionada com o processo de endocitose de partículas estranhas (BERMAN, 1983).

Os grânulos de Birbeck não representam organelas isoladas, mas sim, fragmentos do retículo endossomal contínuo que constitui uma estrutura tubular peculiar envolvida no fenômeno de processamento de antígenos capturados (LOMBARDI; HAUSER; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1993; LINS et al., 2003; MERAD, 2005). A presença de organelas intracelulares únicas com grânulos de Birbeck e a expressão de moléculas de ligação de lecitina de Langerin, a qual constitutivamente se liga ao grânulo de Birbeck, distinguem estas células das demais células dendríticas (MERAD, 2005).

As funções das células de Langerhans são: captação, processamento e apresentação antigênica, migração celular, expressão de moléculas co-estimulatórias, interação com linfócitos T, secreção de citocinas e ativação da

resposta imune específica (HART, 1997; BANCHEREAU; STEINMAN, 1991; SOUSA; SHER; KAYE, 1999; MERAD, 2005).

Os principais marcadores expressos pelas células de Langerhans e identificados pela técnica da imuno-histoquímica são os seguintes: receptores de superfície para porção Fc da IgG e para C3, participantes da captação antigênica, antígenos de histocompatibilidade classe I e classe II (HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP), envolvidos na apresentação antigênica aos linfócitos T, moléculas de superfície CD54 (ICAM-1), CD11a (LFA-1) e CD29 (VLA), responsáveis pelos mecanismos de interação celular, moléculas citoplasmáticas como o antígeno CD68, e os antígenos de superfície CD45, comum aos leucócitos, CD4, originalmente restrito aos linfócitos T *helper* (CD4⁺) e CD25, que constitui um receptor para a IL-2, sendo por isso considerado um marcador de ativação celular (PITIGALA-ARACHCHI et al., 1989; LOMBARDI; HAUSER; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1993; HART, 1997; LINS et al., 2003; MERAD, 2005).

Para Pitigala-Arachchi et al. (1989), a maioria dos marcadores citados também é expressa por outras células imunocompetentes como os macrófagos e os linfócitos T e B, não sendo, portanto, exclusivos das células de Langerhans. Segundo Hart (1997), a marcação CD68 das células dendríticas limita-se a uma distribuição perinuclear, enquanto que nos macrófagos essa marcação é mais citoplasmática e difusa. De acordo com DiFranco et al. (1984), e Lombardi et al. (1993), os marcadores que melhor identificam as células de Langerhans são as glicoproteínas de superfície CD1, especialmente a CD1a, que parece ser exclusiva das referidas células e seus precursores, e a proteína S-100, embora esta identifique especialmente células de origem neural.

Segundo Lombardi et al. (1993), dentre os marcadores já mencionados, a molécula de superfície CD1a constitui a mais importante na identificação das células de Langerhans no epitélio humano. A expressão desse antígeno sobre as células precursoras monocíticas é induzida por citocinas, como o TNF- α (fator de necrose tumoral), a IL-1(interleucina), a IL-6 e o GM-CSF (fator estimulador de colônias de monócitos – macrófagos), secretadas pelos queratinócitos, conforme afirmam Athanasas-Platsis et al. (1995) e Merad (2005). Para estes autores, a expressão da molécula CD1a manifesta-se desde a primeira etapa da transição da célula precursora para a célula de Langerhans propriamente dita.

Além da apresentação de peptídios associada ao MHC, há mais um sistema de apresentação de antígenos lipídicos. A molécula não-polimórfica semelhante à classe I CD1, é expressa em várias células apresentadoras de antígenos (APCs) e epitélios, e apresenta antígenos lipídicos a populações incomuns de linfócitos T não-restritos ao MHC. Estudos em linhas clonadas derivadas de linfócitos T indicam que várias células podem reconhecer antígenos lipídicos apresentados por células CD1⁺, estas incluem linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Alguns estudos, em pele de murinos, têm demonstrado que células de Langerhans do hospedeiro persistem na pele após o transplante de medula óssea e são responsáveis pela indução da GVHD (EMERSON, 2004; MERAD et al., 2004). Células de Langerhans são membros de uma família altamente especializada de células apresentadoras de antígenos chamadas células dendríticas e funcionam como sentinelas do sistema imune (STEINMAN, 1991; SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1999; FUKUNAGA et al., 2008). Elas estão localizadas tipicamente na camada basal e suprabasal dos epitélios da pele e mucosas, e representam a principal barreira hematopoiética ao ambiente externo (MERAD et al., 2002). As células de Langerhans da epiderme são as células dendríticas imaturas mais estudadas, e demonstram uma alta habilidade para captura de antígenos, mas baixa capacidade para apresentação de antígenos (DIEU-NOSJEAN et al., 1999). Durante uma invasão de patógenos, as células dendríticas imaturas capturam antígenos estranhos e rapidamente deixam a epiderme ou mucosa (SCHULER; STEINMAN, 1985; INABA et al. 1986; ROMANI et al., 1989; STREILEIN; GARAMMER, 1989; PURÉ et al., 1990; KAPLAN et al., 1992). Em seguida, elas cruzam a derme ou submucosa, o endotélio dos vasos linfáticos e migram para nódulos linfáticos de drenagem. Durante esta migração, a partir dos tecidos periféricos, sofrem maturação fenotípica e funcional.

As células dendríticas são desta forma células migratórias, movendo-se de um sítio a outro após estímulo antigênico, adquirindo habilidades específicas no processo de maturação. Tem sido possível por meio de análise *in vitro* gerar células dendríticas de monócitos, cultivados na presença de GM-CSF e IL-4 (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1999) ou de células hematopoiéticas CD34⁺, cultivadas com GM-CSF mais TNF- α (CAUX et al., 1992).

O processo de maturação das células dendríticas compreende os seguintes estágios: 1) um estágio provavelmente heterogêneo de precursores de células dendríticas encontradas *in vivo* na medula óssea e sangue periférico; 2) um estágio de células dendríticas imaturas na periferia, caracterizadas por atividade endocítica e pela ausência de expressão de moléculas co-estimulatórias; 3) após o estímulo por produtos bacterianos, como lipopolissacarídeo (LPS) ou mediadores inflamatórios (IL-1, TNF- α), as células dendríticas perdem sua expressão de receptores de superfície e sua capacidade de processar antígeno. Em contraste, células dendríticas maduras exibem fenótipos e funções de células apresentadoras de antígeno, capacitadas para eficientemente ativar células T CD4⁺ *naïve* (DIEU-NOSJEAN et al., 1999).

Vários estudos têm sido conduzidos para elucidar os mecanismos da migração das células de Langerhans para os tecidos epiteliais. Essas células não possuem uma única origem e as condições locais intraepiteliais direcionam sua renovação.

Postula-se que as células de Langerhans migram mesmo durante o estado de equilíbrio para manter ou induzir a tolerância periférica para os antígenos da pele, os quais podem ser críticos para prevenção da doença auto-imune neste órgão (STEIMAN; HAWINGER; NUSSENZWIEG, 2003).

Segundo Ferrero et al. (2003), células mononucleares do sangue periférico (PBMcs) CD14⁺ e CD34⁺ migram ao longo do endotélio dando origem às células dendríticas imunoestimulatórias. Em condições não inflamatórias, na pele, as células de Langerhans são substituídas por uma reserva precursora local provavelmente derivada de células dérmicas CD14⁺. A substituição das células de Langerhans epidérmicas por células precursoras derivadas da medula óssea, nestas condições, ocorre muito lentamente, se ocorrer (MOSER; LOETSCHER, 2001). Por outro lado, condições inflamatórias induzem um aumento da migração de células de Langerhans, originadas de monócitos derivados de células CD34⁺ (IMHOF; AURRAND-LIONS, 2004). Neste processo, a interação com as células endoteliais pode ser suficiente para a diferenciação dos monócitos em células dendríticas (IMHOF; AURRAND-LIONS, 2004).

1.4 AS QUIMIOCINAS ENVOLVIDAS NO RECRUTAMENTO DAS CÉLULAS DE LANGERHANS

A migração dos precursores de células de Langerhans é guiada pelo gradiente de várias quimiocinas inflamatórias. Algumas destas quimiocinas precisam ser ativadas por metaloproteinases (MMP)-2 e MMP-9, derivadas dos próprios precursores de células de Langerhans; tais MMPs clivam formas inativas de quimiocinas. Além disso, a atividade de MMP é necessária para a quebra de proteínas constituintes da matriz extracelular, a qual será cruzada pelos precursores de células de Langerhans na sua rota de migração para a epiderme. Portanto, as quimiocinas e as MMP da matriz têm um importante papel durante a migração de precursores de células de Langerhans para a epiderme (KOCH et al., 2006).

As quimiocinas constituem uma família estruturalmente relacionada de citocinas quimiotáticas, que orientam a migração de leucócitos por todo o organismo, sob condições fisiológicas e inflamatórias (YOSHIE; IMAI; NOMIYAMA, 2001). Além disso, estão envolvidas em processos como angiogênese, morfogênese, autoimunidade, crescimento tumoral e metástase (MURPHY et al., 2000). De acordo com a presença e a posição relativa dos resíduos de cisteína e NH₂-terminais, as quimiocinas são estruturalmente agrupadas em quimiocinas CC, CXC, CX₃C e C. A primeira geração de quimiocinas foi descoberta em função das suas propriedades quimiotáticas. Acredita-se que a maior parte delas desempenhe um papel central no recrutamento de elementos do sistema imunológico para sítios inflamatórios, atuando em um amplo espectro de tipos celulares. Desde 1996, uma segunda geração de quimiocinas surgiu, devido à evolução da bioinformática e seu sequenciamento em bases de dados. A maior parte destas quimiocinas é expressa constitutivamente, porém seletivamente, em alguns tipos celulares específicos, e é determinante para orquestrar o tráfego homeostático de leucócitos e a organização do tecido linfóide (ZLOTNIK; MORALES; HEDRICK, 1999).

A CCL20, uma quimiocina de segunda geração, tem sido associada com a migração das células de Langerhans, sendo considerada o maior fator responsável pela migração de células de Langerhans para a epiderme, quando induzida por TNF- α . Especula-se que TNF- α possa depletar células de Langerhans residentes na epiderme, enquanto estimula a migração de novas células via síntese de CCL20

(TOHYAMA et al., 2001). Em resposta a estímulos inflamatórios como a sensibilização da pele, radiação ultravioleta (UV) e infecções cutâneas, os queratinócitos epidérmicos produzem TNF- α (SCHUTYSER; STRUYF; VAN DAMME, 2003), que parece induzir a produção de CCL20 por estas mesmas células. A CCL20, por sua vez, pode estimular a migração dos precursores circulantes de células de Langerhans no sangue periférico para a epiderme (CHARBONNIER, et al., 1999; DIEU-NOSJEAN et al., 1999; HOMEY et al., 2000; NAKAYAMA et al., 2001; SCHUTYSER; STRUYF; VAN DAMME, 2003).

Dependendo das condições, a CCL20 age tanto como constitutiva-homeostática como indutora-inflamatória (MANTOVANI, 1999). Na nomenclatura sistemática das quimiocinas, a sinonímia da CCL20 é LARC/MIP-3 α /Exodus-1 (ZLOTNIK; YOSHIE, 2000). Em humanos, a CCL20 foi relatada como sendo a primeira quimiocina descoberta por meio da bioinformática, por análises em bases de dados e técnicas de sequenciamento de DNA automatizadas. Em murinos, ratos e macacos *rhesus*, a CCL20 também foi identificada (UTANS-SCHNEITZ et al., 1998; VARONA et al., 1998; BASU et al., 2002). Em contraste com a primeira geração de genes de quimiocinas CC, todos agrupados no cromossomo 17q11.2, o gene da CCL20 humana foi mapeado no cromossomo 2q33-37 (HIESHIMA et al., 1997; NELSON et al., 2001).

In vitro, a CCL20, é produzida por macrófagos ativados, células dendríticas, células endoteliais e queratinócitos basais, sendo a única com um ligante de alta afinidade, o receptor CCR6 (YANG et al., 1999a). Por outro lado, *in vivo*, a CCL20 é expressa constitutivamente em queratinócitos basais e em macrófagos de pele (CHRISTOPHERSON et al., 2003).

Tohyama et al. (2001), observaram, *in vitro*, que os queratinócitos basais produzem mais CCL20 que os queratinócitos da camada espinhosa, após estimulação por TNF- α , e que a quimiocina CCL20 estava localizada na camada espinhosa, mas não na camada basal de culturas de pele tratadas com TNF- α . Essas observações poderiam explicar porque células de Langerhans são localizadas, predominantemente, na camada suprabasal ao invés da camada basal.

Distintos receptores de quimiocinas orquestram a migração de células dendríticas do sangue para os tecidos inflamados (SOZZANI et al., 2000; MULLER, 2001; ONO et al., 2003; IMHOF; AURRAND-LIONS, 2004), embora, aparentemente,

os precursores de células de Langerhans possam migrar para a epiderme na ausência de estímulos inflamatórios. O CCR6 é um receptor específico para o ligante CCL20, e parece regular especificamente células dendríticas do tipo Langerhans constitutivas e residentes da epiderme; enquanto que outros tipos de células dendríticas respondem a outras quimiocinas (BABA et al., 1997; CHARBONNIER et al., 1999; LIAO et al., 1999). O gene humano do CCR6 foi mapeado no cromossomo 6q27, fora do principal grupamento dos genes de receptores de quimiocinas CC que estão no cromossomo 3p (GREAVES et al., 1997; LIAO et al., 1999; SOZZANI et al., 2000).

O RNAm de CCR6 está presente constitutivamente no tecido linfóide secundário (baço, nódulos linfáticos e apêndice) e fígado fetal, no sangue periférico em células T CD4⁺ e CD8⁺, com um fenótipo de memória, e em células B, mas não em células NK, monócitos e granulócitos. O receptor CCR6 é expresso em células de Langerhans derivadas de células CD34⁺ e monócitos do sangue periférico *in vitro* (GREAVES et al., 1997, DIEU et al. 1998, YANG et al., 1999b); *in vivo*, foi observado em células de Langerhans e em um subgrupo de células T de memória (CHARBONNIER et al., 1999; LIAO et al., 1999).

A responsividade quimiotática decorrente da expressão de CCR6 poderia estar relacionada ao tráfego de células dendríticas observado em condições inflamatórias, como na GVHD.

1.5 AS CÉLULAS DE LANGERHANS, A QUIMIOCINA CCL20 E SEU RECEPTOR CCR6, NA DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO CRÔNICA (GVHDC)

Aractingi et al. (1997), estudaram o número e a área de células de Langerhans em pele com lesões de GVHDc e pele sem lesão de GVHDc, pertencentes ao mesmo paciente e compararam ambas a um Grupo Controle. Os autores observaram uma redução significativa no número e na área de células de Langerhans nas lesões de GVHDc quando comparados à pele sem lesão e ao controle, não apresentando diferença significativa entre os dois últimos. Desta forma, os autores sugerem que a redução das células de Langerhans na pele com lesão é uma consequência direta da GVHDc e não devido aos regimes condicionantes e

drogas imunossupressoras, sendo que essa diminuição seria possivelmente relacionada a ocorrência de um fenômeno autorreativo na GVHDc, uma vez que na fase crônica a maioria das células de Langerhans são originárias da medula óssea do doador.

Hasséus et al. (2001) realizaram um estudo onde compararam GVHDc bucal, com líquen plano bucal em relação a distribuição de subpopulações celulares, através da análise de expressão de marcadores de superfície de interesse para respostas inflamatórias. Anticorpos monoclonais foram utilizados em procedimentos imuno-histoquímicos padrão. Vários marcadores foram utilizados neste trabalho entre eles CD1a, cuja expressão foi observada com maior frequência no epitélio de líquen plano do que no epitélio de GVHDc. As lesões de líquen plano mostraram maior frequência de células subepiteliais expressando CD1a quando comparadas às lesões de GVHDc. Com relação ao Grupo Controle (mucosa bucal saudável), tanto no líquen plano como na GVHDc foi observado aumento de células CD1a⁺, sugerindo uma existência de absorção local e apresentação de aloantígenos ou auto-antígenos.

Sato et al. (2006), realizaram um estudo onde compararam o número de células de Langerhans (CD1a) em GVHDc, líquen plano bucal e mucosa bucal saudável e observaram que, no epitélio da GVHDc e líquen plano, este número foi significativamente maior.

Foi demonstrado em estudos experimentais que a eliminação das células de Langerhans do animal receptor por luz ultravioleta na pele antes da infusão de células T alorreativas previne a ocorrência de GVHD (EMERSON, 2004; MERAD et al., 2004). Por outro lado, a depleção de células T do enxerto também evita a ocorrência de GVHD, mas aumenta a incidência de recidivas tumorais e falhas na eficácia do enxerto, pois as células T do doador produzem fatores de crescimento que estimulam a proliferação das células mielóides e têm uma ação citotóxica contra células tumorais residuais.

Foi demonstrado, na GVHD, que as células de Langerhans parecem continuamente ativar células T do doador, resultando na produção de citocinas que provavelmente tem um papel chave no dano tecidual observado nesta reação (LEVER, 1986; HASSÉUS et al., 2001; MERAD et al., 2004; MERAD, 2005; SATO et al., 2006). As células T alorreativas induzem, na pele, quimiocinas inflamatórias que

recrutam células de Langerhans circulantes do doador, onde variados graus de quimerismo de células de Langerhans podem ser esperados em pacientes transplantados (MERAD et al., 2004).

Poucos estudos têm abordado o ciclo de vida das células de Langerhans, da sua célula precursora no sangue, o mecanismo de substituição após dano da pele e sua homeostasia após transplante de medula óssea (MERAD, 2005). Tendo em vista a mucosa bucal, também poucos estudos têm focado o papel destas células na GVHD e de possíveis quimiocinas envolvidas no processo de recrutamento para o epitélio bucal. Apenas alguns trabalhos demonstraram um aumento significativo das células de Langerhans no epitélio da mucosa bucal de pacientes com GVHD (HASSEUS et al., 2001; ORTI-RADUAN et al., 2009).

O nosso mais recente estudo (ORTI-RADUAN et al., 2009), realizado no Departamento de Estomatologia (Patologia), na Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, juntamente com o Hospital Amaral Carvalho, Jaú – SP, comparou quantitativamente as células de Langerhans em 20 pacientes que foram submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas e desenvolveram GVHDc (Grupo 1), com 20 pacientes que realizaram o mesmo procedimento e não desenvolveram GVHDc (Grupo 2), bem como com 20 pacientes controle (Grupo 3), ou seja mucosa jugal livre de doenças inflamatórias. Nos resultados obtidos, foi detectado um aumento significativo do número de células de Langerhans em pacientes do Grupo 1 quando comparados ao Grupo 2 bem como ao Grupo 3, (ORTI-RADUAN, 2007; ORTI-RADUAN et al., 2009), sugerindo fortemente a possibilidade do envolvimento de citocinas neste processo, possivelmente CCL20.

De acordo com a literatura, as células de Langerhans têm uma participação efetiva na GVHD e o seu aumento, embora ainda controverso, possivelmente estaria relacionado à expressão da quimiocina CCL20 no local da lesão. Sendo assim, a investigação do papel dessas células e da expressão tecidual de CCL20 e seu receptor CCR6, na GVHDc em mucosa bucal, poderia ser uma estratégia promissora para novas abordagens terapêuticas desta doença.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a relação da expressão tecidual de CCL20 e de seu receptor CCR6 com a concentração de células de Langerhans (CD1a⁺) em lesões bucais de doença enxerto contra hospedeiro crônica (GVHDc).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Por meio da técnica imuno-histoquímica, identificar e qualificar (análise subjetiva) as células imunomarcadas para CCL20 e CCR6 em fragmentos de mucosa bucal de pacientes submetidos ao transplante alogênico de medula óssea, com e sem a GVHDc;
 - Relacionar os achados qualitativos da quimiocina CCL20 e do seu receptor CCR6, em ambos os Grupos (com GVHDc e sem GVHDc), com o número de células de Langerhans (CD1a⁺).
-

3 Casuística e Métodos

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DA AMOSTRAGEM

O presente estudo foi desenvolvido utilizando-se fragmentos obtidos por biópsia da região da mucosa bucal (lábio inferior), de pacientes diagnosticados previamente com doenças onco-hematológicas como leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica, leucemia linfóide aguda, leucemia linfóide crônica e doenças hematológicas como aplasia de medula óssea. De acordo com o protocolo hospitalar, esses pacientes foram submetidos a regimes condicionantes pré-transplante (Anexo A), aplicados de acordo com o diagnóstico prévio da doença, e posteriormente após o transplante, à terapia imunossupressora geralmente nos primeiros 100 dias após a realização do transplante (Anexo B).

Os pacientes foram selecionados a partir de seus prontuários (banco de dados do Hospital Amaral Carvalho, Jaú – SP), considerando critérios clínicos e microscópicos que caracterizavam a presença ou ausência da doença enxerto contra hospedeiro crônica (FILIPOVICH et al., 2005). Assim foram obtidos dois Grupos: **Grupo 1** - fragmentos obtidos por biópsia de pacientes que realizaram o transplante de células-tronco hematopoiéticas e desenvolveram GVHD crônica em mucosa bucal, e **Grupo 2** - fragmentos obtidos por biópsia de pacientes que realizaram o transplante de células-tronco hematopoiéticas e não desenvolveram GVHD crônica pelo menos nos primeiros 100 dias após o transplante de medula óssea.

Um terceiro Grupo foi também incluído na amostra (**Grupo 3**). Trata-se do Grupo Controle, o qual foi selecionado a partir de fragmentos obtidos por biópsia com diagnóstico microscópico de lesões não inflamatórias da região de mucosa bucal, as quais foram selecionadas dos Arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Estomatologia (Disciplina de Patologia) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB – USP).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospital Amaral Carvalho, Jaú – SP, sob o nº147/09, no dia 29 de outubro de 2009 (Anexo C).

3.2 AMOSTRAGEM

A seleção das amostras utilizadas para o presente estudo foi obtida dos arquivos de diferentes serviços de Anatomia Patológica, sendo divididas em três Grupos e seguindo os seguintes critérios:

- **Grupo 1:** fragmentos obtidos por biópsia de mucosa bucal de pacientes onco-hematológicos e hematológicos, submetidos ao o transplante de células-tronco hematopoiéticas que desenvolveram doença enxerto contra hospedeiro crônica (GVHDc), confirmado pela análise clínica e microscópica – 30 casos;
- **Grupo 2:** fragmentos obtidos por biópsia de mucosa bucal de pacientes onco-hematológicos e hematológicos submetidos ao o transplante de células-tronco hematopoiéticas que não desenvolveram doença enxerto contra hospedeiro crônica (GVHDc), confirmado pela análise clínica e microscópica – 30 casos.

O material referente aos Grupos 1 e 2 foram obtidos a partir de biópsias, que foram realizadas por *punch*, em mucosa bucal, no período de 1997 a 2010, de pacientes onco-hematológicos e hematológicos, submetidos ao transplante alogênico de medula óssea, no Hospital Amaral Carvalho, Jaú - SP, Brasil. Os critérios de inclusão para estes pacientes seguem a classificação proposta por Filipovich et al., 2005:

- com diagnóstico de leucemia aguda ou crônica, linfoma e anemia aplásica;
 - para o Grupo 1, presença de pelo menos um sinal clínico *diagnóstico* de GVHD crônica em mucosa bucal (lesões liquenóides, placas hiperqueratóticas ou restrição de abertura bucal) e ou presença de, pelo menos, uma manifestação *distintiva* (xerostomia, mucoccele, atrofia da mucosa ou úlceras);
 - para o Grupo 2, ausência do desenvolvimento de GVHD crônica em mucosa bucal como também em outros órgãos (pele, fígado e trato gastrointestinal), durante todo o tratamento imunossupressor pós-
-

transplante para a doença hematológica, confirmada clínica e microscopicamente.

- **Grupo 3 (Controle):** fragmentos obtidos por biópsia de lesões não inflamatórias da região de mucosa bucal com diagnósticos microscópicos como Lipoma, Mucoccele, Grânulos de Fordyce, Fibrolipoma, e Mucosa Normal, obtidas no período de 1997 a 2009, dos Arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Estomatologia (Disciplina de Patologia) da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (FOB – USP) – 30 casos.

Pacientes apresentando manifestações bucais de infecções ou de reações à drogas ou, ainda, de doenças malignas foram descartados da amostra.

3.3 ANÁLISE DEMOGRÁFICA E CLÍNICA

As informações clínicas dos pacientes dos Grupos 1 e 2 foram obtidas a partir do banco de dados pertencente ao Hospital Amaral Carvalho, Jaú – SP, Brasil. Estes registros incluem a identificação e os dados relativos aos pacientes, como aspectos demográficos, história clínica, exames pertinentes realizados, cirurgias, tratamento pré-transplante e sinais clínicos *diagnósticos* e ou manifestações *distintivas* em mucosa bucal, seguindo os critérios propostos por Filipovich et al. (2005). Os dados demográficos dos pacientes do Grupo 3 foram obtidos a partir do banco de dados do Serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Estomatologia (FOB – USP).

3.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA EM HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

Os cortes microscópicos de 3µm arquivados, referentes à amostragem, corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE), foram obtidos e analisados por dois examinadores (E.S.L.O.R e A.J.F.N), com ênfase nas características microscópicas relativas à presença de GVHD crônica.

A avaliação microscópica das amostras de mucosa bucal de todos os Grupos baseou-se no protocolo proposto pela "ASBMTtm - *American Society for blood and Marrow Transplantation*" - USA- <http://www.asbmt.org/>, o qual aborda: 1) avaliação do tecido epitelial, 2) avaliação da presença de células inflamatórias no tecido conjuntivo, 3) distribuição do infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo e 4) avaliação da glândula intratubular (Apêndice A).

As características microscópicas inerentes ao tecido epitelial dos diferentes Grupos deste estudo foram coletadas em formulário próprio para registro dos dados microscópicos, conforme pode-se observar no Apêndice A. O tecido epitelial foi primeiramente avaliado no que se refere a sua espessura, sendo atribuídas a ele quatro diferentes classificações: normal, atrófico, hiperparaqueratótico e acantótico. Em seguida, foi avaliada a presença ou ausência de: espongiose, exocitose, outras células inflamatórias bem como o espessamento da membrana basal. Outra característica analisada foi a presença localizada ou generalizada de alteração hidrópica de células basais, como também de corpos eosinofílicos, sendo caracterizado como frequente ou ocasional (item I, Apêndice A).

No tecido conjuntivo fibroso, a presença das seguintes células inflamatórias foi analisada: linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, neutrófilos. As células que se apresentavam isoladas foram descartadas da avaliação e considerou-se apenas o infiltrado inflamatório localizado ou generalizado.

Quatro critérios foram aplicados no que se refere à distribuição do infiltrado inflamatório: perivascular, periductal (ducto secretor), intersticial ou ainda submucoso (em banda), como pode ser observado no item II do formulário de coleta de dados microscópicos exposto no Apêndice A.

Na avaliação da glândula intratubular, foram considerados os seguintes critérios: presença de linfócito periductal com exocitose ductal, infiltrado inflamatório crônico periductal misto, dilatação ductal, fibrose periductal, perda da polaridade das células ductais, linfócito periacinar com exocitose acinar, alteração acinar, células apoptóticas em ductos/ácinos e fibrose intersticial (item III, Apêndice A).

Para o Grupo Controle foram selecionadas somente áreas que estavam livres de lesão e de inflamação.

3.5 MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Cortes microscópicos seriados de 3µm de espessura foram obtidos dos espécimes selecionados, e alocados em lâminas previamente silanizadas. A silanização foi realizada com banhos de dois minutos em cada uma das soluções que seguem abaixo:

- ➡ 500mL álcool 99%;
- ➡ 500mL acetona;
- ➡ 500mL cola constituída por 420mL de acetona, 80mL de organosilano SIGMA – ALDRICH - COD. A3648 - 100mL LOTE- 059 K 0061;
- ➡ 500mL acetona.

As marcações imuno-histoquímicas seguiram a técnica padrão da estreptavidina-biotina-peroxidase para o anticorpo anti-CCL20 e do Polímero ENVISION para os anticorpos anti-CD1a e anti-CCR6, sendo que o último a incubação foi *overnight*. Tais marcações foram realizadas no Setor de Imuno-histoquímica, do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Amaral Carvalho, Jaú – SP.

Os anticorpos primários foram diluídos em diluente específico para anticorpos (*antibody diluent with background reducing componentes*, DAKO Corporation, Glostrup, Denmark, S3022):

- Anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD1a humano, clone 010 (DAKO); diluição 1:50;
- Anticorpo monoclonal de camundongo anti-CCR6 humano, clone 53103 (R&D Systems, Minneapolis); diluição 1:30;
- Anticorpo policlonal de cabra anti-CCL20 humano, AF 360 (R&D Systems); diluição 1:50.

Para o anticorpo anti-CCR6, foram realizados dois bloqueios da peroxidase endógena, um deles anteriormente à recuperação antigênica e outro após; ambos por um tempo de 10 minutos, em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (H₂O₂ – 10 volumes).

A recuperação antigênica para a marcação imuno-histoquímica das moléculas CD1a, CCR6 e CCL20 foi realizada por meio da incubação dos espécimes em solução tampão TARGET pH 6,0 (DAKO, S1699), em panela de pressão como fonte geradora de calor úmido por 40 minutos (CAMARA PASCAL – DAKO, S2800).

Para os anticorpos anti-CD1a e anti-CCL20, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena por 10 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (H₂O₂ - 10 volumes) após a recuperação antigênica.

Os anticorpos anti-CCL20 foram incubados por uma hora e, posteriormente, os espécimes foram incubados com Link secundário biotinilado (Kit LSAB – DAKO, K0690) por 30 minutos e as secções foram incubadas com estreptavidina (Kit LSAB) por 30 minutos em temperatura ambiente.

Os anticorpos anti-CD1a e anti-CCR6 foram incubados por 1 hora e 18 horas, respectivamente. Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS e incubados por 30 minutos com POLÍMERO ENVISION DUAL LINK SYSTEM – HRP (DAKO, K4063).

O produto final da reação antígeno-anticorpo (CD1a, CCR6 e CCL20) foi visualizado por meio da incubação dos espécimes em solução cromógena 3,3'diaminobenzidina (DAB – DAKO, S3000 - 1mL de tampão para 1 gota de cromógeno) por 1 minuto.

Os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Harris por 30 segundos e, em seguida, lavados em água corrente, azulecidos em água amoniacal e lavados novamente em água corrente por 3 minutos. Após desidratação, as lâminas foram montadas em meio não aquoso (Entelan – Merck, 1079610100).

Um controle positivo e um controle negativo foram incluídos em cada série de colorações imuno-histoquímicas. Para o anticorpo anti-CD1a, foi utilizado como controle positivo uma secção de pele com Histiocitose de células de Langerhans e, como controle negativo, uma secção do mesmo tecido, com a omissão do anticorpo primário e sua substituição por PBS.

Para os anticorpos anti-CCR6 e anti-CCL20, foram utilizados, como controle positivo, uma secção de tonsila normal e, como controle negativo, para ambos os marcadores, secções do mesmo tecido, com a omissão do anticorpo primário e sua substituição por PBS.

3.6 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

A quantificação das células de Langerhans imunomarcadas com o anticorpo anti-CD1a, nas amostras de mucosa bucal referente aos Grupos com GVHDc (30 espécimes), sem GVHDc (30 espécimes) e Grupo Controle (30 espécimes), foi realizada por meio de um sistema computadorizado de captura de imagens analisando-se somente a área correspondente ao epitélio da mucosa bucal.

Em cada espécime de mucosa bucal, foram analisados, um total de 10 campos microscópicos consecutivos, capturados a partir de uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico binocular em uma objetiva de 40x.

A área total em cada campo microscópico foi de 0,0939921 mm². Para obtenção da área total em cada espécime de mucosa bucal, multiplicou-se a área de um campo microscópico pelo número de campos percorridos neste espécime.

A contagem das células de Langerhans foi realizada, por dois examinadores (E.S.L.O.R e A.J.F.N), sem o conhecimento prévio dos Grupos a que pertenciam as amostras de mucosa bucal.

O número de células de Langerhans por milímetro quadrado em cada espécime de mucosa bucal foi calculado dividindo-se o número total de células de Langerhans (CD1a⁺) contadas, pela área total de epitélio de mucosa bucal analisado, (0,939921 mm²). A média do número de células de Langerhans/mm² obtida nos diferentes Grupos foi comparada estatisticamente.

A análise imuno-histoquímica para os marcadores anti-CCR6 e anti-CCL20 foi baseada no sistema qualitativo de escores (análise subjetiva). Os escores foram baseados em um trabalho realizado por Ghadjar et al. (2008), onde tonsila normal foi utilizada como controle positivo. Assim, na presente tese, utilizamos corte de tonsila normal como controle positivo da imunomarcagem para as moléculas CCR6 e CCL20. A marcação observada nas células epiteliais das criptas da tonsila foi considerada como imunomarcagem forte para a técnica imuno-histoquímica utilizada por nós. As marcações, moderada e fraca, foram qualificadas durante a análise das amostras após comparação com a forte marcação obtida nos cortes de tonsila normal. Sendo assim, os escores utilizados foram:

0 (escore 0) = ausência de imunomarcacão

1 (escore 1) = imunomarcacão fraca

2 (escore 2) = imunomarcacão moderada

3 (escore 3) = imunomarcacão forte

A avaliacão da marcação dos anticorpos anti-CCR6 e anti-CCL20 compreendeu toda a extensão epitelial, e foi aplicado um único escore (0, 1, 2 ou 3) como classificacão desta imunomarcacão para cada amostra.

Considerando que a presença das moléculas CCR6 e CCL20 na membrana das células inflamatórias é constitutiva, a imunomarcacão no tecido conjuntivo fibroso subjacente não foi qualificada.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos e qualitativos foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade, e os resultados mostraram que estes não obedeceram a uma distribuicão normal. Desta forma, a aplicacão de um teste não paramétrico foi indicada.

A análise estatística comparativa múltipla do número de células de Langerhans $CD1a^+$ / mm^2 , bem como dos escores obtidos por amostra para a imunomarcacão de $CCR6^+$ e de $CCL20^+$ nos diferentes Grupos experimentais (Grupos 1, 2 e 3) foi obtida pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Em seguida, para comparacão aos pares, foi aplicado o Teste Tukey. Em seguida, foi aplicado o teste de coeficiente de correlacão de Spearman entre as variáveis ($CD1a$, $CCR6$ e $CCL20$).

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 CASUÍSTICA

Após a análise dos prontuários dos pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas no Hospital Amaral Carvalho, Jaú – SP, foram selecionadas 30 fragmentos de mucosa bucal com GVHDc e 30 fragmentos de mucosa bucal sem GVHDc. Foram incluídas, ainda, 30 fragmentos de mucosa bucal com padrão de normalidade, a partir do Arquivo de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E CLÍNICA DA AMOSTRAGEM DE ESTUDO

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

Nos Grupos 1 e 2, 53,3% da amostra eram homens e o restante mulheres (46,7%). No Grupo Controle, os pacientes do sexo feminino apresentaram-se em uma porcentagem mais expressiva (56,7%) que o masculino (43,3%).

Quanto à idade dos pacientes no momento da biópsia, no Grupo 1, 40% estavam na faixa entre 21 a 40 anos, seguido de 36,7% na faixa etária acima de 40 anos e 23,3% com até 20 anos. Entre os pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas e que não desenvolveram GVHDc (Grupo 2), a maior porcentagem deles estava na faixa etária entre 21 e 40 anos (60,0%). No Grupo 3 (Controle), não constava a informação com relação à idade em 33,3% dos pacientes. Quando havia esta informação, 36,7% encontravam-se na faixa etária maior de 40 anos.

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes com e sem GVHDc e do Grupo Controle de acordo com o sexo e a idade. Hospital Amaral Carvalho, Jaú, e Faculdade de Odontologia de Bauru, USP

Característica	com GVHDc		sem GVHDc		Controle	
	n	%	n	%	n	%
Sexo						
Masculino	16	53,3	16	53,3	13	43,3
Feminino	14	46,7	14	46,7	17	56,7
Idade						
≤ 20 anos	7	23,3	9	30	5	16,7
21 a 40 anos	12	40	18	60	4	13,3
≥ 40 anos	11	36,7	3	10	11	36,7
Não Informado					10	33,3
TOTAL	30	100	30	100	30	100

n: número de pacientes

A Tabela 2 demonstra a distribuição dos pacientes oncológicos e hematológicos nos diferentes Grupos de transplantados que desenvolveram (Grupo 1) ou não (Grupo 2) GVHDc bucal, de acordo com o diagnóstico da doença primária, dia após o transplante de células-tronco hematopoiéticas no qual foi realizada a biópsia (D+), como também a realização de terapia imunossupressora na ocasião da biópsia.

Dos pacientes do Grupo com GVHDc, 40,0% apresentaram diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA). Na amostragem sem GVHDc, 33,3% tiveram o mesmo diagnóstico.

A maioria dos pacientes do Grupo 1 havia sido submetida à biópsia no período de 101 a 300 dias pós transplante (50%). No Grupo 2, 40% foi submetida à biópsia antes dos 100 dias e 40% entre 101 a 300 dias após o transplante de células-tronco hematopoiéticas.

Nos pacientes com GVHDc, 50,0% realizavam terapia imunossupressora, enquanto que no Grupo que não desenvolveu GVHDc, 66,7% não realizavam a terapia.

O regime pré-condicionante aplicado para a depleção da medula óssea do receptor, a presença de GVHDc em outros órgãos (além da boca) antes da biópsia e a evolução para óbito em função da doença primária dos pacientes oncológicos e hematológicos transplantados estão demonstrados no Apêndice B.

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes dos Grupos com e sem GVHDc de acordo com o diagnóstico da doença, D+ e Terapia imunossupressora atual. Hospital Amaral Carvalho, Jaú

Característica	com GVHDc		sem GVHDc	
	n	%	n	%
Diagnóstico				
LMA	12	40	10	33,3
LMC	7	23,3	8	26,7
LLA	7	23,3	3	10
LLC	0		1	3,3
MDS	1	3,3	1	3,3
AP	3	10	7	23,3
D+ (Dias)				
≤ 100	7	23,3	12	40
101 a 300	15	50	12	40
≥300	8	26,7	6	26,7
Terapia imunossupressora				
Sim	15	50	10	33,3
Não	15	50	20	66,7
TOTAL	30	100	30	100

n: número de pacientes; D+: dia após o transplante de células-tronco hematopoiéticas no qual foi realizada a biópsia; LMA: leucemia mielóide aguda; LMC: leucemia mielóide crônica; LLA: leucemia linfóide aguda; LMA: leucemia mielóide aguda; LMC: leucemia mielóide crônica; LLA: leucemia linfóide aguda LLC: leucemia linfóide crônica; MDS: mielodisplasia; AP: aplasia de medula óssea

A distribuição das amostras referentes aos pacientes do Grupo Controle, de acordo com as lesões não inflamatórias, está na Tabela 3. Nesse Grupo, houve um maior número de pacientes com Lipoma (46,7%), seguido por Fibrolipoma (20,0%), Mucoccele (16,7%) e Mucosa Normal (13,3%). Apenas um paciente do Grupo Controle teve diagnóstico de Grânulos de Fordyce (3,3%).

Tabela 3 - Distribuição das amostras dos pacientes do Grupo Controle de acordo com as lesões não inflamatórias. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP

Característica (Lesões)	Grupo Controle	
	n	%
Lipoma	14	46,7
Fibrolipoma	6	20
Mucoccele	5	16,7
Mucosa Normal	4	13,3
Grânulos de Fordyce	1	3,3
TOTAL	30	100

n: número de pacientes

A distribuição das amostras referentes aos pacientes oncológicos e hematológicos dos Grupos com e sem GVHDc, considerando a relação do sexo entre receptor/doador, pode ser visualizada na Tabela 4.

Considerando os pacientes que receberam o transplante de irmãos (familiar), dezenove transplantes de medula óssea alogênico foram realizados entre doadores e receptores do mesmo sexo, e oito entre pacientes de sexo diferente, no Grupo com GVHDc. Nos pacientes do Grupo sem GVHDc, quatorze tiveram os transplantes realizados entre doadores do mesmo sexo, e treze entre sexos diferentes.

Considerando doadores não aparentados, ou seja, cordão umbilical de doadores cadastrados no banco de dados do Hospital Amaral Carvalho, houve apenas transplante entre receptores e doadores do mesmo sexo, no Grupo 1. No Grupo sem GVHDc, houve 2 pacientes que receberam transplante de doadores de sexo diferente.

Os transplantes também foram recebidos de doadores não aparentados cadastrados no banco de dados do Hospital Amaral Carvalho. No Grupo com GVHDc, dos 2 pacientes que receberam este tipo de transplante, um era do mesmo sexo que o receptor, enquanto que o outro era de sexo diferente. Em relação aos pacientes sem GVHDc, houve apenas 1 transplante não aparentado, o qual foi realizado entre doador e receptor do mesmo sexo.

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes dos Grupos com e sem GVHDc indicando a relação do sexo entre receptor/doador. Hospital Amaral Carvalho, Jaú

Característica	com GVHDc		sem GVHDc	
	n	%	n	%
Receptor/Doador (Familiar)				
M/M	8	26,7	8	26,7
M/F	5	16,7	7	23,3
F/F	11	36,7	6	20
F/M	3	10	6	20
Cordão Umbilical				
M/M	1	3,3		
M/F			1	3,3
F/F			1	3,3
Não Familiar				
M/M	1	3,3		
M/F	1	3,3		
F/F			1	3,3
TOTAL	30	100	30	100

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

As características clínicas bucais, apresentada pelos pacientes no momento em que foram submetidos à biópsia, para acompanhamento do transplante de células-tronco hematopoiéticas, estão relacionadas na Tabela 5.

Nos pacientes do Grupo 1, foram observadas características como: dor, lesão liquenóide, mucosite e xerostomia. Dos pacientes analisados, 11 manifestaram duas características clínicas e 1 paciente apresentou três características, concomitantemente. Os 18 pacientes restantes do Grupo 1 apresentaram apenas uma manifestação clínica. Dentre as características clínicas, as mais frequentes neste Grupo foram a xerostomia (21) e a lesão liquenóide (14).

No Grupo 2, 18 pacientes não relataram queixa, 3 apresentaram duas características clínicas conjuntamente, e o restante apresentou apenas uma manifestação clínica. Dos 30 pacientes deste Grupo, 10 apresentaram xerostomia.

Tabela 5 - Características clínicas detectadas no momento da biópsia de mucosa bucal realizada nos pacientes com (n=30) e sem GVHDc (n=30). Hospital Amaral Carvalho, Jaú

Pacientes	com GVHDc					sem GVHDc			
	D	LL	M	Xe	S/Q	D	LL	M	Xe
1				x		x			x
2				x		x			
3		x							x
4		x		x	x				
5		x						x	x
6		x			x				
7				x					x
8			x	x					x
9		x	x		x				
10		x	x						x
11		x							x
12		x	x	x	x				
13		x	x		x				
14				x	x				
15		x			x				
16		x			x				
17				x	x				
18		x		x	x				
19			x	x	x				
20				x					x
21	x			x					x
22		x		x	x				
23				x			x		
24				x	x				
25				x	x				
26				x	x				
27				x			x		x
28				x	x				
29		x		x	x				
30	x			x	x				
TOTAL	2	14	6	21	18	2	2	1	10

S/Q: Sem queixas; D: dor; LL: lesão liquenóide; M: mucosite; Xe: xerostomia; x: presença

4.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA DA AMOSTRAGEM

A caracterização da amostra referente à análise microscópica em HE dos Grupos 1, 2 e 3 pode ser visualizada nas Tabelas a seguir.

A Tabela 6 apresenta os dados referentes à análise do tecido epitelial. No Grupo com GVHDc, observam-se 13 amostras apresentando espessura epitelial normal, 5 acantótico, 2 apresentaram epitélio hiperparaqueratótico e 10 amostras foram classificadas como hiperparaqueratótico e acantótico concomitantemente, perfazendo um total de 43%, 16,7%, 6,7% e 33,3% respectivamente.

A espongiose foi observada em 18 amostras, representando 60% dos casos estudados. Quanto à exocitose, somente 1 amostra não apresentou essa característica. Em nenhum dos casos, foram observados células inflamatórias e espessamento da membrana basal.

Notou-se, também, que 17 amostras apresentaram alteração hidrópica localizada; e em 6 amostras, foi observada esta alteração de forma generalizada, estando ausente em 7, representando 56,7%, 20% e 23,3%, respectivamente. Corpos eosinofílicos foram visualizados ocasionalmente em 21 amostras, ou seja, em 70% dos casos e, nos 30% restantes, eles eram frequentes.

A análise do Grupo sem GVHDc revelou que 12 amostras (40%) apresentaram a espessura epitelial normal; 2 amostras (6,7%), hiperparaqueratótica, e 3 (10,0%), acantótica. Em 13 amostras (43,3%), epitélio hiperparaqueratótico e acantótico, simultaneamente, foi observado.

A espongiose foi observada em 3 amostras, e em apenas 1 observou-se exocitose. A alteração hidrópica foi detectada de forma localizada em 2, representando 6,7% dos casos. As células inflamatórias, o espessamento da membrana basal e os corpos eosinofílicos não foram observados em nenhum dos casos.

Tabela 6 - Distribuição das amostras referentes aos pacientes dos Grupos com (n=30) e sem GVHDc (n=30) quanto às características do tecido epitelial. Hospital Amaral Carvalho, Jaú

Característica	com GVHDc		sem GVHDc	
	n	%	n	%
Espessura epitelial				
Normal	13	43,3	12	40
Atrófico				
Hiperparaqueratótico	2	6,7	2	6,7
Acantótico	5	16,7	3	10
Hiperparaqueratótico/ acantótico	10	33,3	13	43,3
Espongiose				
Sim	18	60	3	10
Não	12	40	27	90
Exocitose				
Sim	29	96,7	1	3,3
Não	1	3,3	29	96,7
Outras células inflamatórias				
Sim				
Não	30	100	30	100
Espessamento da membrana basal				
Sim				
Não	30	100	30	30
Alteração hidrópica				
Localizada	17	56,7	2	6,7
Generalizada	6	20		
Ausente	7	23,3	28	93,3
Corpos eosinofílicos				
Frequente	9	30		
Ocasional	21	70		
Ausente			30	100

n: número de pacientes

A análise microscópica do tecido conjuntivo fibroso subjacente está representada na Tabela 7. No Grupo com GVHDc, verificou-se que em 7 amostras os linfócitos apresentaram-se de forma localizada, em 14, estavam generalizados e em 9 amostras foram observados ocasionalmente, representando 23,3%, 46,7% e 30%, respectivamente.

Os plasmócitos foram observados em 9 amostras, ou seja, em 30% dos casos. Nas demais amostras, os plasmócitos estavam ausentes. Os eosinófilos foram constatados somente em 1 amostra, enquanto que os neutrófilos foram observados de forma ocasional em 20% dos casos estudados, isto é, em 6 pacientes.

Observa-se que, em 30% da amostragem (9), o infiltrado inflamatório apresentou-se generalizado, enquanto que nos demais (70%) estava localizado.

Foi verificado o infiltrado inflamatório perivascular, periductal e intersticial em 10%, 3,3% e 13,3% dos casos, respectivamente. O infiltrado inflamatório submucoso foi observado em 36,7% dos casos estudados (11 amostras).

No Grupo sem GVHDc, os linfócitos foram detectados de forma localizada em 5 pacientes, de forma ocasional em 21 e ausentes em 4, correspondendo a 16,7%, 70% e 13,3% dos casos estudados.

Os plasmócitos foram observados de forma ocasional em 7 amostras, representando 23,3% da amostragem. Os eosinófilos e neutrófilos foram detectados somente em 1 amostra, de forma ocasional.

O infiltrado inflamatório foi observado de forma localizada em 9 amostras, ou seja, em 30% dos casos. Em nenhuma amostra, foram observadas as características perivascular, periductal e submucoso; entretanto, a intersticial foi detectada somente em 1 amostra.

Tabela 7 - Distribuição das amostras dos pacientes dos Grupos com (n=30) e sem GVHDc (n=30) quanto às características do tecido conjuntivo fibroso subjacente. Hospital Amaral Carvalho, Jaú

Característica	com GVHDc		sem GVHDc	
	n	%	n	%
Linfócito				
Localizado	7	23,3	5	16,7
Generalizado	14	46,7		
Ocasional	9	30	21	70
Ausente			4	13,3
Plasmócito				
Localizado				
Generalizado				
Ocasional	9	30	7	23,3
Ausente	21	70	23	76,7
Eosinófilo				
Localizado				
Generalizado				
Ocasional	1	3,3	1	3,3
Ausente	29	96,7	29	96,7
Neutrófilo				
Localizado				
Generalizado				
Ocasional	6	20	1	3,3
Ausente	24	80	29	96,7
Infiltrado Inflamatório				
Localizado	21	70	9	30
Generalizado	9	30		
Ausente			21	70
Perivascular				
Ausente	27	90	30	100
Presente	3	10		
Periductal				
Ausente	29	96,7	30	100
Presente	1	3,3		
Intersticial				
Ausente	26	86,7	29	96,7
Presente	4	13,3	1	3,3
Submucoso				
Ausente	19	63,3	30	100
Presente	11	36,7		

n: número de pacientes

A partir da análise microscópica do tecido conjuntivo, especificamente glândula salivar menor, no Grupo com GHVDc, observou-se que 5 amostras não apresentaram glândulas nos cortes examinados. Assim, dos 25 casos analisados, 14 amostras revelaram exocitose ductal (56%). O infiltrado inflamatório crônico foi observado em 12 amostras, ou seja, em 48% dos casos, e a dilatação ductal foi verificada somente em 2 amostras (8%). A perda da polaridade e as células apoptóticas em ductos/ácinos não foram observadas em nenhum caso (Tabela 8).

Em 10 amostras, observou-se a fibrose periductal (40%), enquanto que os linfócitos periacinares com exocitose acinar foram verificados em 8 casos (32%).

A alteração acinar e a fibrose intersticial foram observadas em 7 amostras, representando 28% dos casos estudados.

No Grupo sem GVHDc (n=30), ressalta-se que a dilatação ductal, a fibrose periductal, a perda de polaridade nas células ductais, o linfócito periacinar com exocitose acinar, a alteração acinar, as células apoptóticas em ductos e ácinos e a fibrose intersticial estavam ausentes em todos os casos estudados.

O infiltrado crônico periductal misto foi observado somente em 1 caso (3,3%). O linfócito periductal com exocitose ductal foi observado em 2 amostras, correspondendo a 6,7%.

Tabela 8 - Distribuição das amostras dos pacientes dos Grupos com (n=25) e sem GVHDc (n=30) quanto às características da glândula salivar menor. Hospital Amaral Carvalho, Jaú

Característica	com GVHDc		sem GVHDc	
	n	%	n	%
Exocitose ductal				
Ausente	11	44	28	93,3
Presente	14	56	2	6,7
Infiltrado crônico periductal misto				
Ausente	13	52	29	96,7
Presente	12	48	1	3,3
Dilatação ductal				
Ausente	23	92	30	100
Presente	2	8		
Fibrose periductal				100
Ausente	15	60	30	
Presente	10	40		
Perda da polaridade (células ductais)				
Ausente	25	100	30	100
Presente				
Exocitose acinar				
Ausente	17	68	30	100
Presente	8	32		
Alteração acinar				
Ausente	18	72	30	100
Presente	7	28		
Células apoptóticas (ductos/ácinos)				
Ausente	25	100	30	100
Presente				
Fibrose intersticial				
Ausente	18	72	30	100
Presente	7	28		

n: número de pacientes

Na Tabela 9, podem ser visualizadas as características microscópicas do tecido epitelial do Grupo Controle.

Constatou-se que 30% das amostras apresentaram espessura epitelial acantótica, 20% normal e 20% atrófico. Em 13%, a espessura epitelial mostrou-se hiperparaqueratótica e, em 16,7%, hiperparaqueratótica e acantótica simultaneamente.

Em nenhum dos casos foram observadas espongiose e exocitose, assim como células inflamatórias e espessamento da membrana basal. A alteração hidrópica e os corpos eosinofílicos estavam ausentes.

Tabela 9 - Distribuição das amostras referentes ao Grupo Controle (n=30), quanto às características do tecido epitelial. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP

Característica	Controle	
	n	%
Espessura epitelial		
Normal	6	20
Atrófico	6	20
Hiperparaqueratótico	4	13,3
Acantótico	9	30
Hiperparaqueratótico/ Acantótico	5	16,7
Espongiose		
Sim		
Não	30	100
Exocitose		
Sim		
Não	30	100
Outras células inflamatórias		
Sim		
Não	30	100
Espessamento da membrana basal		
Sim		
Não	30	100
Alteração hidrópica		
Localizada		
Generalizada		
Ausente	30	100
Corpos eosinofílicos		
Frequente		
Ocasional		
Ausente	30	100

n: número dos pacientes

A análise do tecido conjuntivo fibroso subjacente das amostras do Grupo Controle está descrita na Tabela 10. Em 17 amostras, foram observados linfócitos ocasionais, representando 56,7%, estando ausentes em 43,3%.

Os plasmócitos foram visualizados em apenas 2 amostras (6,7%) e de forma ocasional; os neutrófilos em 1 caso (3,3%) ocasionalmente. Os eosinófilos não foram observados em nenhum caso.

Em 5 amostras (16,7%), observou-se infiltrado inflamatório localizado. O infiltrado inflamatório periductal, intersticial e submucoso estavam ausentes em todos os casos estudados.

Na Tabela 11, as características da glândula salivar menor, do Grupo Controle, estão demonstradas. A glândula salivar menor estava ausente em 23 amostras, correspondendo a 76,7%.

Exocitose ductal, infiltrado crônico periductal misto, dilatação ductal, fibrose periductal, células ductais (perda da polaridade), exocitose acinar, alteração acinar, células apoptóticas e fibrose intersticial estavam ausentes em todos os casos analisados.

Tabela 10 - Distribuição das amostras do Grupo Controle (n=30), quanto às características do tecido conjuntivo fibroso subjacente. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP

Característica	Controle	
	n	%
Linfócito		
Localizado		
Generalizado		
Ocasional	17	56,7
Ausente	13	43,3
Plasmócitos		
Localizado		
Generalizado		
Ocasional	2	6,7
Ausente	28	93,3
Eosinófilo		
Localizado		
Generalizado		
Ocasional		
Ausente	30	100
Neutrófilo		
Localizado		
Generalizado		
Ocasional	1	3,3
Ausente	29	96,7
Infiltrado inflamatório		
Localizado	5	16,7
Generalizado		
Ausente	25	83,3
Perivascular		
Ausente	30	100
Presente		
Periductal		
Ausente	30	100
Presente		
Intersticial		
Ausente	30	100
Presente		
Submucoso		
Ausente	30	100
Presente		

n: número de pacientes

Tabela 11 - Distribuição das amostras do Grupo Controle (n=30), quanto às características da glândula salivar menor. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP

Característica	Controle	
	n	%
Exocitose ductal		
Ausente	7	23,3
Presente		
Infiltrado crônico periductal misto		
Ausente	7	23,3
Presente		
Dilatação ductal		
Ausente	7	23,3
Presente		
Fibrose periductal		
Ausente	7	23,3
Presente		
Perda da polaridade (células ductais)		
Ausente	7	23,3
Presente		
Exocitose acinar		
Ausente	7	23,3
Presente		
Alteração acinar		
Ausente	7	23,3
Presente		
Células apoptóticas (ductos/ácinos)		
Ausente	7	23,3
Presente		
Fibrose intersticial		
Ausente	7	23,3
Presente		
Glândula salivar menor		
Ausente	23	76,7
Presente	7	23,3

n: número de pacientes

4.4 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

A imunomarcagem das células de Langerhans pelo anticorpo anti-CD1a nos diferentes Grupos de pacientes transplantados (Grupos 1 e 2) e Grupo Controle (Grupo 3), pode ser visualizada na Figura 2.

As células de Langerhans (CD1a⁺), estavam localizadas nas camadas basais e suprabasais, e apresentaram-se fortemente marcadas. A contagem das células de Langerhans foi realizada, a partir da captura de 10 campos consecutivos, da região epitelial das amostras de mucosa bucal. A captura foi realizada, em um microscópio

binocular (Axio Star – ZEISS, Germany), no aumento de 40x, e em seguida as células nucleadas foram contadas.

O número total de células de Langerhans (300 campos microscópicos) foi de 1680 células/mm² para o Grupo 1, sendo o número mínimo obtido por lâmina, 13, e o máximo 130 células; para o Grupo 2 houve um total de 682 células/mm², onde o número mínimo foi 5 e o máximo 63, e para o Grupo Controle, 387 células/mm², com número mínimo 2 e máximo 33.

Assim, a média de células de Langerhans/mm² foi de 56 para o Grupo 1 (com GVHDc), de 22,7 para o Grupo 2 (sem GVHDc) e de 12,9 para o Grupo 3 (Controle), como pode ser observado na Tabela 12.

O Teste Kruskal-Wallis revelou diferenças estatisticamente significativas entre os três Grupos ($p < 0,001$), em relação ao número de células de Langerhans/mm² (Tabela 12 e Gráfico 1).

O Teste de Tukey demonstrou diferença significativa em nível de 5% ($p < 0,05$) em todas as comparações aos pares.

Em resumo, estes resultados demonstraram que a média do número de células de Langerhans/mm² foi estatisticamente maior no Grupo de pacientes transplantados que desenvolveram GVHDc em comparação ao Grupo de pacientes transplantados que não desenvolveram GVHDc. Ambos os Grupos de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas apresentaram um número de células de Langerhans estatisticamente maior quando comparado ao Grupo Controle.

Tabela 12 - Média e desvio padrão do número de células de Langerhans/mm² na mucosa bucal dos pacientes transplantados com (n=30) e sem GVHDc (n=30) e do Grupo Controle (n=30)

Grupos	Células de Langerhans /mm ²
com GVHDc	56,0 ± 30,6
sem GVHDc	22,7 ± 11,3
Controle	12,9 ± 9,2

Gráfico 1 - Média e desvio padrão do número de células de Langerhans/mm² no epitélio da mucosa bucal dos pacientes dos Grupos com e sem GVHDc e do Grupo Controle. Letras iguais representam diferença estatística, $p < 0,001$

A análise imuno-histoquímica para os marcadores anti-CCR6 e anti-CCL20 foi baseada no sistema qualitativo de escores (análise subjetiva).

As células imunomarcadas CCR6⁺ estavam localizadas nas camadas basais e suprabasais do tecido epitelial (Figura 3, em A, B e C). No Grupo 1, observou-se uma marcação intensa (escore 3), em 7 amostras, marcação moderada (escore 2) em 16 amostras, e, em 6, a marcação foi fraca (escore 1). Em nenhuma amostra do Grupo 1 houve ausência de marcação.

No Grupo 2, em apenas uma amostra, obteve-se marcação forte para CCR6 (escore 3) e foi observado escore 0 (ausência de marcação) em apenas 2 casos. A maioria das amostras apresentou fraca marcação (escore 1), ou seja, 18 amostras. Em 9, houve marcação moderada (escore 2).

A maioria das amostras (15) do Grupo Controle, apresentou fraca marcação (escore 1) para a molécula CCR6. As amostras restantes demonstraram ausência de marcação (11) e imunomarcação moderada (4). Neste Grupo não se observou marcação forte para CCR6.

A análise estatística dos escores da imunomarcação do receptor CCR6 resultou nas seguintes médias: 2 para o Grupo 1; 1,3 para o Grupo 2 e 0,7 para o Grupo 3 (Tabela 13).

A partir do Teste Kruskal-Wallis, a análise estatística da expressão qualitativa (subjativa) de CCR6, para comparações múltiplas, mostrou haver diferenças estatisticamente significativas entre os três Grupos ($p < 0,001$), como demonstrado na Tabela 13 e no Gráfico 2. A partir do Teste de Tukey, para comparações aos pares, notou-se diferença significativa em nível de 5% ($p < 0,05$) entre os Grupos 1 e 2, e entre 1 e 3. Estes resultados demonstram que a expressão de CCR6 foi estatisticamente maior no Grupo de pacientes transplantados que desenvolveram GVHDc em comparação aos outros Grupos.

Tabela 13 - Média e desvio padrão da expressão epitelial na mucosa bucal dos pacientes transplantados com (n=30) e sem GVHDc (n=30) e do Grupo Controle (n=30)

Grupos	Expressão epitelial de CCR6
com GVHDc	$2 \pm 0,6$
sem GVHDc	$1,3 \pm 0,6$
Controle	$0,767 \pm 0,6$

Gráfico 2 - Média e desvio padrão da expressão de CCR6 no epitélio da mucosa bucal dos pacientes dos Grupos com e sem GVHDc e do Grupo Controle. Letras iguais representam diferença estatística, $p < 0,001$

As células imunomarcadas CCL20⁺ apresentavam-se localizadas nas camadas basais e suprabasais do tecido epitelial como pode ser observado na Figura 3 em (D).

Para o Grupo 1, observou-se apenas marcação de escore 1 (marcação fraca) em 20 dos 30 casos avaliados e o restante apresentou ausência de marcação (escore 0).

No Grupo 2, 17 amostras apresentaram escore 1 (marcação fraca) e 23 escore 0 (ausência de marcação).

Para o Grupo Controle, assim como no Grupo 1, das trinta amostras analisadas, 20 apresentaram marcação fraca (escore 1) e, em 10 casos, não houve marcação (escore 0).

A análise estatística da imunomarcação da quimiocina CCL20 apresentou as seguintes médias: Grupo1, 1; Grupo 2, 0 e Grupo 3, 1, demonstradas na Tabela 14.

O Teste Kruskal-Wallis mostrou não haver diferenças estatisticamente significativas entre os três Grupos ($p=0,108$), como demonstrado na Tabela 14 e no Gráfico 3. Do mesmo modo, o Teste de Tukey, para comparações aos pares, demonstrou não haver diferença significativa em nível de 5% ($p>0,05$) entre os Grupos 1, 2 e 3.

Estes resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significante entre os Grupos quanto à expressão da quimiocina CCL20 ($p=0,108$).

Após a aplicação do coeficiente de Spearman, a fim de verificar uma possível correlação entre os resultados quantitativos de células de Langerhans e qualitativos da expressão das moléculas CCR6 e CCL20, verificou-se ausência de correlação entre as diferentes variáveis ($p>0,05$).

Tabela 14 - Média da expressão epitelial do anticorpo anti-CCL20 na mucosa bucal dos pacientes transplantados com (n=30) e sem GVHDc (n=30) e do Grupo Controle (n=30)

Grupos	Expressão epitelial de CCL20
com GVHDc	1
sem GVHDc	0
Controle	1

Gráfico 3 - Média da expressão de CCL20 no epitélio da mucosa bucal dos pacientes dos Grupos com e sem GVHDc e do Grupo Controle, $p=0,108$

Figura 1 - Aspectos microscópicos da mucosa bucal de paciente transplantado de medula óssea com GVHDc (A), de paciente transplantado sem GVHDc (B), e de amostra Controle (C) (HE)

Figura 2 - Células CD1a⁺ em mucosa bucal de paciente transplantado de medula óssea com GVHDc (A), de paciente transplantado sem GVHDc (B), e de amostra Controle (C) (Imunohistoquímica)

Figura 3 - Cortes microscópicos da imunomarcagem das moléculas CCR6 (A, B e C) e CCL20 (D) na mucosa bucal de paciente transplantado de medula óssea com GVHDc. Em (A) e (B), observar a imunomarcagem forte, sendo que (B) representa maior aumento da região demarcada por linha tracejada em (A). Em (C) e (D), notar imunomarcagem moderada e fraca, respectivamente (Imuno-histoquímica)

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O transplante de célula-tronco hematopoiéticas tem sido utilizado como opção de tratamento para os pacientes com doenças hematológicas e onco-hematológicas. A preparação do paciente para o transplante é realizada com aplicação de radiação e quimioterapia, no intuito de depletar as células do indivíduo receptor, para que haja a infusão de uma nova medula óssea, oriunda de um indivíduo doador compatível e capaz de substituir as células do receptor.

Algumas complicações podem surgir durante este processo de repovoamento medular: a doença enxerto contra hospedeiro, a qual pode se apresentar em sua forma aguda ou crônica. No passado, GVHD era diagnosticada de acordo com o tempo de aparecimento dos sinais clínicos, ou seja, na aguda, anterior a 100 dias após o transplante e, na forma crônica, quando havia persistência ou aparecimento dos sinais após este período (HASSÉUS et al., 2001; SATO et al., 2006).

Recentemente, novos critérios para o diagnóstico de GVHDc e um novo escore clínico foram estabelecidos, priorizando a extensão e a gravidade da GVHDc para cada órgão ou sítio em determinado momento, independentemente do tempo de aparecimento dos sintomas, após o transplante (FILIPOVICH et al., 2005).

A GVHD é uma das principais complicações do transplante de células-tronco hematopoiéticas, e sua incidência varia de 6 a 80% em função da idade do receptor, tipo de doador, escolha e manipulação do enxerto e uso de infusões de linfócitos do doador pós transplante de medula óssea. Os sintomas da GVHD costumam se apresentar no prazo de três dias, após o transplante da medula óssea (REMBERGER et al., 2001; FILIPOVICH et al., 2005). A cavidade bucal é afetada em ambas as formas de GVHD, sendo a morbidade oral altamente significativa (SALE, 1984). Mesmo sendo a GVHD uma das complicações pós transplante mais frequentes, sua patogênese ainda não está totalmente esclarecida (PERREAULT et al., 1985; LEVER et al., 1986; MATTSSON et al., 1992; HASSÉUS et al., 2001; NICOLAU-GALITIS et al., 2001; MERAD et al., 2005; SOARES et al., 2005; SATO et al., 2006). Poucos estudos a respeito da GVHD acometendo mucosa bucal foram relatados na literatura (MATTSON et al., 1992; HASSÉUS et al., 2001; NICOLAU-GALITIS et al., 2001; SATO et al., 2006; ORTI-RADUAN, 2007; ORTI-RADUAN et

al., 2009), o que justificou a realização deste trabalho, visando contribuir para a ampliação do conhecimento dos mecanismos imunopatológicos da GVHD, particularmente quando ocorre na forma crônica na mucosa bucal, com enfoque na participação e no recrutamento das células de Langerhans, consideradas fundamentais no processo de apresentação antigênica aos linfócitos T, participando ativamente da ocorrência desta complicação pós transplante (MERAD et al., 2002; MERAD, 2005).

Os pacientes incluídos neste presente estudo apresentavam doenças hematológicas e onco-hematológicas, e foram submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas no Hospital Amaral Carvalho em Jaú, um importante centro de referência no tratamento de câncer no Estado de São Paulo. Para os pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas, que desenvolveram GVHDc, houve a necessidade da presença de pelo menos um sinal clínico *diagnóstico* de GVHD crônica em mucosa bucal, como lesões liquenóides, placas hiperqueratóticas ou restrição de abertura bucal, e/ou presença de, pelo menos, uma manifestação *distintiva* como xerostomia, mucoccele, atrofia da mucosa ou úlceras. Estes critérios de inclusão foram baseados em FILIPOVICH et al. (2005). O outro critério de inclusão para os pacientes do Grupo 2 (sem GVHDc) foi a completa ausência do diagnóstico de GVHD aguda ou GVHD crônica na pele, fígado e trato gastrointestinal, durante todo o tratamento até o momento da realização da biópsia de acompanhamento.

Microscopicamente, a presença da GVHDc na mucosa bucal foi caracterizada, nesta amostragem, por um infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário justaepitelial, com presença de vacuolização celular na camada basal do epitélio, e corpúsculos acidofílicos (Figura 1). Esse padrão microscópico de GVHD tem sido observado em inúmeros relatos (SALE 1984; MATTSSON et al., 1992; HART, 1997; HASSÉUS et al., 2001; NICOLAU-GALITIS et al., 2001; SOARES et al., 2005; SATO et al., 2006; ORTI-RADUAN et al., 2009). O infiltrado inflamatório subepitelial, como observado no tecido conjuntivo subjacente da mucosa bucal em nosso estudo, é um aspecto característico da GVHD, pois sua ocorrência está associada à presença de linfócitos T ativados da medula óssea transplantada, que reconhecem como estranhos principalmente os antígenos do complexo de histocompatibilidade do hospedeiro receptor, proliferando e atacando os tecidos do

mesmo (MATTSSON et al., 1992; HASSÉUS et al., 2001; NICOLAU-GALITIS et al., 2001).

Assim como observado previamente por Soares et al. (2005) e por Shulman et al. (2006) a mucosa bucal dos pacientes com GVHDc, no presente estudo, demonstraram glândulas salivares menores com alterações microscópicas ductais como infiltrado inflamatório periductal com exocitose ductal, além de fibrose periductal. Exocitose acinar por linfócitos também foi observada nestes pacientes. De forma interessante, xerostomia foi detectada em 21 dos 30 pacientes com GVHDc, sugerindo que os mecanismos alorreativos da GVHD podem ocorrer nos tecidos glandulares, comprometendo sua função.

Por outro lado, no presente estudo, as características microscópicas da mucosa bucal dos pacientes, submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas e que não desenvolveram GVHDc, eram semelhantes àquelas do Grupo Controle (Grupo 3), exceto pela presença ocasional de um discreto infiltrado inflamatório linfocitário no Grupo de pacientes transplantados (Grupo 2), como demonstrado na Figura 1. O desenvolvimento da GVHD está diretamente relacionado ao tipo de doença prévia, ao grau de disparidade HLA entre hospedeiro e doador, e a idade avançada entre ambos, devido a fatores imunológicos como aumento de antígenos sensibilizados e a involução do timo (BURT et al., 1998; SCHUBERT; CORREA, 2008; LEE; DEEG, 2008).

Em um trabalho prévio, desenvolvido por nós, foi realizada a comparação quantitativa das células de Langerhans no revestimento epitelial da mucosa bucal de 20 pacientes que foram submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas e desenvolveram GVHDc, com 20 pacientes que realizaram o mesmo procedimento e não desenvolveram GVHDc, bem como com 20 pacientes controle, cuja mucosa bucal apresentava áreas livres de doenças inflamatórias. A partir dos resultados obtidos, foi detectado um aumento significativo do número de células de Langerhans em pacientes com GVHDc quando comparados com o restante (ORTI-RADUAN, 2007; ORTI-RADUAN et al., 2009).

Esses resultados foram semelhantes aos de outros trabalhos (MATTSSON et al., 1992; HASSÉUS et al., 2001; SATO et al., 2006) embora haja discordâncias, como por exemplo, nos estudos realizados, em pele, por Aractingi et. al. (1997). Estes autores observaram uma redução significativa de células de Langerhans nas

lesões de GVHDc quando comparadas com tecido cutâneo saudável, sugerindo que tal redução na pele com lesão provavelmente seria uma consequência direta dos mecanismos imunes citotóxicos da GVHDc e não dos regimes condicionantes e drogas imunossupressoras.

Uma possível explicação para o aumento significativo das células de Langerhans na GVHDc, observado em nosso estudo anterior (ORTI-RADUAN et al., 2009), seria a produção de quimiocinas específicas responsáveis pelo recrutamento dos precursores de células de Langerhans a partir da medula óssea transplantada. Um fenômeno alorreativo de células T do doador contra as células de Langerhans persistentes do hospedeiro receptor poderia induzir um processo inflamatório predominantemente linfocitário, como observado experimentalmente em pele de murinos (MERAD et al., 2002; EMERSON, 2004; MERAD et al., 2004). Esta resposta inflamatória poderia estimular a secreção de citocinas e consequentemente estabelecer um gradiente local das mesmas, resultando na atração química dos precursores hematopoiéticos das células de Langerhans a partir da medula óssea transplantada.

Considerando este raciocínio, o principal objetivo do presente estudo foi relacionar a concentração de células de Langerhans na mucosa bucal dos pacientes com GVHDc com a expressão da quimiocina CCL20 e de seu receptor CCR6 no epitélio bucal, a fim de esclarecer os mecanismos biológicos envolvidos no recrutamento das células de Langerhans na GVHD. Tal recrutamento possivelmente colabora, ou até mesmo seja crucial, para o desenvolvimento desta doença, já que as células de Langerhans são consideradas o alvo da reação GVHD aguda (ARACTINGI et al., 1997) por constituírem uma das principais fontes de antígenos de histocompatibilidade expressos em membrana e principais apresentadores de antígenos (ABBAS; LICHTMAN, 2005). CCR6 é o único receptor conhecido para a CCL20, assim como a CCL20 é a única quimiocina agonista para o CCR6 (BABA et al., 1997; GREAVES et al., 1997; CHARBONNIER et al., 1999; MURPHY et al., 2002). Considerando os pares quimiocinas/receptores de quimiocinas, já está bem estabelecido que CCL20/CCR6 é responsável pela migração de células de Langerhans para a epiderme humana, em condições normais (CHARBONNIER et al., 1999).

Os resultados deste presente estudo revelaram novamente um aumento estatisticamente significativo do número de células de Langerhans/mm², na mucosa bucal de pacientes transplantados que desenvolveram GVHDc em comparação aos pacientes transplantados que não desenvolveram GVHDc. Ainda, a mucosa bucal dos pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas, independente da presença de GVHDc, apresentou um número de células de Langerhans estatisticamente maior quando comparada à mucosa saudável de indivíduos não transplantados (Grupo Controle). Em concordância, a expressão de CCR6 apresentou-se estatisticamente maior no epitélio (camadas basal e suprabasal) da mucosa bucal dos pacientes transplantados que desenvolveram GVHDc em comparação aos outros Grupos, embora sem correlação após aplicação do teste de Spearman. Porém, quanto à expressão epitelial de CCL20, não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos.

Baseando-se em Dieu-Nosjean et al. (2000) e Caux et al. (2002), acreditamos que condições inflamatórias pós transplante a partir da ativação dos mecanismos imunológicos alorreativos, provavelmente pela persistência de células de Langerhans do indivíduo receptor, resultaram em acúmulo de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, TNF- α e GM-CSF, os quais estimularam os queratinócitos a expressar a quimiocina CCL20. Tal quimiocina atrai células de Langerhans sanguíneas imaturas (precursores) via ligação com o receptor CCR6 expresso, dentre outras células, por estes precursores de células de Langerhans. A CCL20 estimula a expressão de CCR6 pelas células de Langerhans imaturas da medula óssea transplantada dos indivíduos doadores, promovendo, portanto, sua quimiotaxia e recrutamento (DIEU-NOSJEAN et al., 2000). Vale ressaltar que, em condições normais, precursores de células de Langerhans não existem em número suficiente para serem detectadas na circulação (DIEU-NOSJEAN et al., 2000).

Sendo assim, estas condições inflamatórias provavelmente resultaram neste aumento de células de Langerhans associado a maior expressão do receptor CCR6 na mucosa bucal dos pacientes com GVHDc, deste presente trabalho. Nos pacientes transplantados de medula óssea, provavelmente as células de Langerhans imaturas oriundas do doador se instalam no tecido epitelial do receptor após os transplantes. A migração de precursores das células de Langerhans, a partir da medula óssea transplantada, para o epitélio do indivíduo receptor tem sido bem

estabelecida em pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas. As células de Langerhans do indivíduo receptor são gradativamente reduzidas, mesmo na ausência de GVHD, sendo substituídas, principalmente ou exclusivamente, por células de Langerhans originadas de precursores da medula óssea do indivíduo doador (LOMBARDI; HAUSER; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1993; MISERY; DEZUTTER-DAMBUYANT, 1995; ARACTINGI et al., 1997; HART, 1997; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; ARDAVIN et al., 2001; HASSEÛS et al., 2001; LINS et al., 2003; MERAD et al., 2002, 2004; MERAD et al., 2005). Segundo Aractingi et al. (1997), no período entre 100 e 300 dias pós transplante, as células de Langerhans sejam originárias da medula óssea do doador.

A quimiocina CCL20 desempenha um papel chave no controle do recrutamento de células de Langerhans em revestimentos epiteliais, tanto sob condições inflamatórias quanto na regulação normal da imunidade epitelial (DIEU-NOSJEAN et al., 2000), provavelmente representando uma importante quimiocina para o recrutamento dos precursores das células de Langerhans e seu consequente povoamento no revestimento epitelial dos pacientes receptores de medula óssea transplantada. Porém, no presente estudo, a expressão da quimiocina CCL20 foi fraca ou ausente em toda a amostragem dos três diferentes Grupos, sem diferenças estatisticamente significantes. Esta marcação imuno-histoquímica fraca ou ausente também foi relatada por Christopherson II et al. (2003) após comparação de tecido cutâneo saudável com o mesmo tecido acometido por doença autoimune; bem como por Ghadjar et al. (2008), após análise desta quimiocina em tumores de próstata em diferentes estágios.

Esta expressão fraca ou ausente de CCL20 nos fez refletir se de fato os domínios antigênicos desta quimiocina estão devidamente expostos para o acoplamento dos anticorpos disponíveis comercialmente, o que prejudicaria a técnica de imuno-histoquímica. Não podemos descartar ainda a possibilidade de uma rápida ação e metabolização da CCL20, após sua liberação pelos queratinócitos.

Segundo Charbonnier et al. (1999), é possível que outros fatores, além da expressão de CCL20, determinem se precursores de células de Langerhans podem povoar um determinado órgão. Assim, esta migração deve ser mediada por uma cascata de interações envolvendo células endoteliais, por meio de uma expressão

específica, para cada órgão, de moléculas de adesão endotelial. Esta ideia é fortalecida pelo fato que nem todos os leucócitos sanguíneos apresentando CCR6, em sua superfície, migram para o epitélio cutâneo em resposta a CCL20. Ainda, as células de Langerhans imaturas estão presentes somente nos epitélios estratificados, embora a quimiocina CCL20 seja expressa em diversos órgãos diferentes, como por exemplo, apêndice, timo, tonsila, fígado e pulmão fetais.

No presente trabalho, a semelhança de expressão de CCL20 em toda a amostragem dos três diferentes Grupos pode significar ainda que, em queratinócitos, a sua expressão seja constitutiva. Dessa forma, além de direcionar a migração de células de Langerhans, é possível que esta quimiocina desempenhe um papel autócrino, ainda não estabelecido, na homeostasia dos queratinócitos, já que estas células produzem CCL20 e, ao mesmo tempo, expressam CCR6 (CHARBONNIER et al., 1999).

Essa relação entre o envolvimento da quimiocina CCL20, seu receptor CCR6 e o recrutamento de células de Langerhans para o tecido epitelial, poderia ser utilizada para estabelecimento de terapias imunes; ou seja, a partir da inibição de CCR6, ou até mesmo da CCL20, seria possível controlar a migração e a função das células de Langerhans, trazendo inúmeros benefícios para o tratamento de infecções por HIV, de doenças inflamatórias epidérmicas, de doenças autoimunes, assim como nos casos de rejeição a transplantes (GREAVES et al., 1997; PARADIS et al., 2007) e de GVHD.

6 Considerações Finais

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base na metodologia aplicada e nos objetivos propostos neste trabalho, verificamos que:

- ❖ A média do número de células de Langerhans/mm² (CD1a⁺) na mucosa bucal foi estatisticamente maior no Grupo de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas e que desenvolveram GVHDc (Grupo 1) em comparação ao Grupo de pacientes transplantados que não desenvolveram GVHDc (Grupo 2). Ambos os Grupos apresentaram uma média do número de células de Langerhans/mm² estatisticamente maior quando comparados ao Grupo Controle;
- ❖ A expressão da imunomarcação de CCR6 nas células epiteliais da mucosa bucal foi maior no Grupo 1 em comparação aos outros Grupos;
- ❖ A expressão da imunomarcação de CCL20 nas células epiteliais da mucosa bucal foi semelhante nos três Grupos estudados.

Estes resultados sugerem que o aumento das células de Langerhans, na doença enxerto contra hospedeiro crônica, em mucosa bucal, pode estar associado a maior expressão do receptor CCR6.

Referências

REFERÊNCIAS¹

Abbas, AK, Lichtman AH, Pillai S. Hipersensibilidade imediata. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai, S. *Imunologia celular e molecular*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 401-21.

Aractingi S, Gluckman E, Dauge-Geffroy MC, Le Goué C, Flahaut A, Dubertret L et al. Langerhans' cells are depleted in chronic graft versus host disease. *J Clin Pathol*. 1997 Apr.;50(4):305-9.

Ardavín C, Martínez del Hoyo G, Martín P, Anjuère F, Arias CF, Marín AR, Ruiz S et al. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol*, 2001 Dec.;22(12):691-700.

Athanasas-Platsis, S. Savage NW, Winning Ta, Walsh Lj Induction of the CD1a Langerhans cell marker on human monocytes. *Arch Oral Biol*. 1995 Feb.;40(2):157-60.

Baba M, Imai T, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Hieshima K et al. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem*. 1997 Jun.;272(23):14893-8.

Banchereau J, Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar.;392(6673):245-52.

Basu S, Schaefer TM, Ghosh M, Fuller CL, Reinhart TA. Molecular cloning and sequencing of 25 different rhesus macaque chemokine cDNAs reveals evolutionary conservation among C, CC, CXC, AND CX3C families of chemokines. *Cytokine*. 2002 May;18(3):140-8.

Berman B. Advances in the characterization of Langerhans cell structure and function. *Br J Dermatol*. 1983;97:14.

Burt R, Deeg J, Lothian ST, Santos G, editores. *Bone marrow transplantation*, Georgetown: RG Landes Co.; 1998. p. 478-9.

¹ Normas de Vancouver: *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*, do International Committee of Medical Journals Editors (ICMJE) - maio de 2009.

Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992 Nov.;360(6401):258-61.

Charbonnier AS, Kohrgruber N, Kriehuber E, Stingl G, Rot A, Maurer D. Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*. 1999 Dec.;20;190(12):1755-68.

Christopherson KW 2nd, Hood AF, Travers JB, Ramsey H, Hromas RA. Endothelial induction of the T-cell chemokine CCL21 in T-cell autoimmune diseases. *Blood*. 2003 Feb.;101(3):801-6.

Cirincione C, Pimpinelli N, Orlando L, Romagnoli P et al. Lamina propria dendritic cells express activation markers and contact lymphocytes in chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2002 Jan.;73(1):45-52.

Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med*. 1998 July;188(2):373-86.

Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A et al. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med*. 2000 Sep.;192(5):705-18.

Dieu-Nosjean MC, Vicari A, Lebecque S, Caux C. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol*. 1999 Aug.;66(2):252-62.

DiFranco CF, Toto PD, Rowden G, Gargiulo AW, Keene JJ Jr, Connelly E. Identification of Langerhans cells in human gingival epithelium. *J Periodontol*. 1985 Jan.; 56(1):48-54.

Emerson SG. Tanning before transplant: lancing the Langerhans cell. *Nat Med*. 2004 May;10(5):510-7.

Ferrero E, Belloni D, Contini P, Foglieni C, Ferrero ME, Fabbri M et al. Transendothelial migration leads to protection from starvation-induced apoptosis in CD34+CD14+ circulating precursors: evidence for PECAM-1 involvement through Akt/PKB activation. *Blood*. 2003 Jan.;101(1):186-93.

Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic 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 Dec.;11(12):945-56.

Fukunaga A, Khaskhely NM, Sreevidya CS, Byrne SN, Ullrich SE. Dermal dendritic cells, and not Langerhans cells, play an essential role in inducing an immune response. *J Immunol*. 2008 Mar.;180(5):3057-64.

Ghadjar P, Loddenkemper C, Coupland SE, Stroux A, Noutsias M, Thiel E et al. Chemokine receptor CCR6 expression level and aggressiveness of prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 Nov.;134(11):1181-9.

Gratwohl A. Bone marrow transplantation: indications and technique. *Radiother Oncol*. 1990;18 Suppl 1:3-9.

Greaves DR, Wang W, Dairaghi DJ, Dieu MC, Saint-Vis B, Franz-Bacon K et al. CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3alpha and is highly expressed in human dendritic cells. *J Exp Med*. 1997 Sep.;186(6):837-44.

Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*. 1997 Nov.;90(9):3245-87.

Hasséus B, Jontell M; Brune, M, Johansson P, Dahlgren UI. Langerhans cells and T cells in oral graft versus host disease and oral lichen planus. *Scand J Immunol*. 2001 Nov.;54(5):516-24.

Hieshima K, Imai T, Opdenakker G, Van Damme J, Kusuda J, Tei H et al. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem*. 1997 Feb.;272(9):5846-53.

Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E et al. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol*. 2000 June;164(12):6621-32.

Imhof BA, Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol*. 2004 June;4(6):432-44.

Inaba K, Schuler G, Witmer MD, Valinsky J, Atassi B, Steinman RM. Immunologic properties of purified epidermal Langerhans cells. Distinct requirements for stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes. *J. Exp Med.* 1986 Aug.;164(2):605-13.

Kaplan G, Walsh G, Guido LS, Meyn P, Burkhardt RA, Abalos RM et al. Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. *J Exp Med.* 1992 June;175(6):1717-28.

Katz SL, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells which originate in bone marrow. *Nature.* 1979 Nov.;282(5736):324-6 apud Lombardi T, Hauser C, Budtz-Jørgensen E. Langerhans cells: structure, function and role in oral pathological conditions. *J Oral Pathol Med.* 1993 May;22(5):193-202.

Keller R. Dendritic cells: their significance in health and disease. *Immunol Lett.* 2001 Oct.;78(3):113-22.

Koch S, Kohl K, Klein E, von Bubnoff D, Bieber T. Skin homing of Langerhans cell precursors: adhesion, chemotaxis, and migration. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Jan.;117(1):163-8. Epub 2005 Dec. 2.

Lampert IA, Janossy G, Sutters AJ, Bofill M, Palmer S, Gordon-Smith E et al. Immunological analysis of the skin in graft versus host disease. *Clin Exp Immunol.* 1982 Oct.;50(1):123-31.

Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch Path Anat.* 1868;44:325-37 apud Lombardi T, Hauser C, Budtz-Jørgensen E. Langerhans cells: structure, function and role in oral pathological conditions. *J Oral Pathol Med.* 1993 May;22(5):193-202.

Lee JW, Joachim Deeg H. Prevention of chronic GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008 June;21(2):259-70.

Lever R, Turbitt M, Mackie R, Hann I, Gibson B, Burnett A et al. A prospective study of the histological changes in the skin in patients receiving bone marrow transplants. *Br J Dermatol.* 1986 Feb.;114(2):161-70.

Liao F, Rabin RL, Smith CS, Sharma G, Nutman TB, Farber JM. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J Immunol.* 1999 Jan.;162(1):186-94.

Lins RDA, Freitas RA, Figueiredo CRLV, Silveira EJD, Medeiros KB, Godoy GP. Células dendríticas: origem, distribuição, morfologia, estrutura, atividade funcional e métodos de identificação: uma revisão. *Rev bras patol oral*. 2003 jul./set.;2(3):29-35.

Lombardi T, Hauser C, Budtz-Jørgensen E. Langerhans cells: structure, function and role in oral pathological conditions. *J Oral Pathol Med*. 1993 May;22(5):193-202.

Mantovani A. Chemokines. Introduction and overview. *Chem Immunol*. 1999;72:1-6.

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(7):539-47.

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

Merad M, Hoffmann P, Ranheim E, Slaymaker S, Manz MG, Lira SA. Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat Med*. 2004 May;10(5):510-7.

Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W, Charo I. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol*. 2002 Dec.;3(12):1135-41.

Misery L, Dezutter-Dambuyant C. Precursors of Langerhans cells. *J Europ Acad Dermatol Venereol*. 1995;5:124-31.

Mizumoto N, Takashima A. CD1a and langerin: acting as more than Langerhans cell markers. *J Clin Invest*. 2004 Mar.;113(5):658-60.

Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*. 2001 Feb.;2(2):123-8.

Muller W.A. New mechanisms and pathways for monocyte recruitment. *J Exp Med*. 2001 Nov.;194(9):F47-51.

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 2000 Mar.;52(1):145-76.

Nakayama T, Fujisawa R, Yamada H, Horikawa T, Kawasaki H, Hieshima K et al. Inducible expression of a CC chemokine liver- and activation-regulated chemokine (LARC)/macrophage inflammatory protein (MIP)-3 alpha/CCL20 by epidermal keratinocytes and its role in atopic dermatitis. *Int Immunol*. 2001 Jan.;13(1):95-103.

Nelson RT, Boyd J, Gladue RP, Paradis T, Thomas R, Cunningham AC et al. Genomic organization of the CC chemokine mip-3alpha/CCL20/larc/exodus/SCYA20, showing gene structure, splice variants, and chromosome localization. *Genomics*. 2001 Apr.;73(1):28-37.

Newcomb GM, Seymour GJ, Powell RN. Association between plaque accumulation and Langerhans cell numbers in the oral epithelium of attached gingiva. *J Clin Periodontol*. 1982 July;9(4):297-304.

Nicolatou-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 paediatric allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Oral Pathol Med*. 2001 Mar.;30(3):148-53.

Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M. Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 June;111(6):1185-99; quiz 1200.

Orti-Raduan ESL, Nunes AJ, Oliveira DT, Lara VS, Taveira LA. Quantitative analysis of Langerhans' cells in oral chronic graft-vs.-host disease. *J Oral Pathol Med*. 2009 Jan.;38(1):132-7.

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 (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007.

Paradis TJ, Cole SH, Nelson RT, Gladue RP. Essential role of CCR6 in directing activated T cells to the skin during contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 2008 Mar.;128(3):628-33.

Perreault C, Pelletier M, Belanger R, Boileau J, Bonny Y, David M et al. Persistence of host Langerhans cells following allogeneic bone marrow transplantation: possible relationship with acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 1985 June;60(2):253-60.

Pitigala-Arachchi A, Crane IJ, Scully C, Prime SS. Epithelial dendritic cells in pathological human oral tissues. *J Oral Pathol Med*. 1989 Jan.;18(1):11-6.

Puré E, Inaba K, Crowley MT, Tardelli L, Witmer-Pack MD, Ruberti G et al. Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *J Exp Med*. 1990 Nov.;172(5):1459-69.

Remberger M, Ringdén O, Blau IW, Ottinger H, Kremens B, Kiehl MG et al. No difference in graft-versus-host disease, relapse, and survival comparing peripheral stem cells to bone marrow using unrelated donors. *Blood*. 2001 Sep.;98(6):1739-45.

Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone AM, Fathman CG et al. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*. 1989 Mar.;169(3):1169-78.

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

Sallusto F, Lanzavecchia A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med*. 1999 Feb.;189(4):611-4.

Sato M, Tokuda N, Fukumoto T, Mano T, Sato T, Ueyama Y. Immunohistopathological study of the oral lichenoid lesions of chronic GVHD. *J Oral Pathol Med*. 2006 Jan.;35(1):33-6.

Schubert MM, Correa ME. Oral graft-versus-host disease. *Dent Clin North Am*. 2008 Jan.;52(1):79-109, viii-ix.

Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potente immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med*. 1985 Mar.;161(3):526-46.

Schutysse E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Oct.;14(5):409-26.

Soares AB, Faria PR, Magna LA, Correa ME, de Sousa 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 July;34(6):368-73.

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 Aug.;11(4):392-9.

Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Mantovani A. Chemokines and dendritic cell traffic. *J Clin Immunol*. 2000 May;20(3):151-60.

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:271-96.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685-711.

Streilein JW, Grammer SF. In vitro evidence that Langerhans cells can adopt two functionally distinct forms capable of antigen presentation to T lymphocytes. *J Immunol*. 1989 Dec.;143(12):3925-33.

Tohyama M, Shirakara Y, Yamasaki K, Sayama K, Hashimoto K. Differentiated keratinocytes are responsible for TNF-alpha regulated production of macrophage inflammatory protein 3alpha/CCL20, a potent chemokine for Langerhans cells. *J Dermatol Sci*. 2001 Oct.;27(2):130-9.

Utans-Schneitz U, Lorez H, Klinkert WE, da Silva J, Lesslauer W. A novel rat CC chemokine, identified by targeted differential display, is upregulated in brain inflammation. *J Neuroimmunol*. 1998 Dec.;92(1-2):179-90.

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. 1999a Oct.;286(5439):525-8.

Yang D, Howard OM, Chen Q, Oppenheim JJ. Cutting edge: immature dendritic cells generated from monocytes in the presence of TGF-beta 1 express functional C-C chemokine receptor 6. *J Immunol*. 1999b Aug.;163(4):1737-41.

Yoshie O, Imai T, Nomiya H. Chemokines in immunity. *Adv Immunol*. 2001;78:57-110.

Zlotnik A, Morales J, Hedrick JA. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol*. 1999;19(1):1-47.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000 Feb.;12(2):121-7.

APÊNDICE A - Dados microscópicos para a obtenção do diagnóstico GVHDc, após transplante de medula óssea, de acordo com "ASBMTtm - American Society for blood and Marrow Transplantation" - USA- <http://www.asbmt.org/>)

I. Análise microscópica do tecido epitelial (H.E.):

1. Paciente: _____
2. Espessura epitelial: ☐ 1-normal ☐ 2-atrófico ☐ 3-hiperparaqueratótico ☐ 4-acantótico
3. Espongiose: ☐ 0-não ☐ 1-sim
4. Exocitose (5 linfócitos/campo): ☐ 0-não ☐ 1-sim
5. Outras células inflamatórias: ☐ 0-não ☐ 1-sim
6. Espessamento da membrana basal: ☐ 0-não ☐ 1-sim
7. Alteração hidrópica de células basais: ☐ 1-localizada ☐ 2-generalizada
8. Corpos eosinofílicos: ☐ 1-frequente ☐ 2-ocasional

II. Análise microscópica do tecido conjuntivo – distribuição do infiltrado inflamatório (H.E.):

9. Infiltrado inflamatório: ☐ 1-localizado ☐ 2-generalizado
10. Perivascular: ☐ 0-ausente ☐ 1-presente
11. Periductal (secretor): ☐ 0-ausente ☐ 1-presente
12. Intersticial: ☐ 0-ausente ☐ 1-presente
13. Submucoso (em banda): ☐ 0-ausente ☐ 1-presente

III. Análise microscópica do tecido glandular – glândula salivar menor (H.E.):

14. Linfócito periductal com exocitose ductal: ☐ 0-ausente ☐ 1-presente
 15. Infiltrado crônico periductal misto: ☐ 0-ausente ☐ 1-presente
 16. Dilatação ductal: ☐ 0-ausente ☐ 1-presente
 17. Fibrose periductal: ☐ 0-ausente ☐ 1-presente
 18. Perda da polaridade das células ductais: ☐ 0-ausente ☐ 1-presente
 19. Linfócito periacinar com exocitose acinar: ☐ 0-ausente ☐ 1-presente
 20. Alteração acinar: ☐ 0-ausente ☐ 1-presente
 21. Células apoptóticas em ductos/ácinos: ☐ 0-ausente ☐ 1-presente
 22. Fibrose intersticial: ☐ 0-ausente ☐ 1-presente
-

APÊNDICE B - Terapia pré-condicionante para a realização do transplante de medula óssea, presença de GVHDc em outros órgãos (além da boca) anteriormente à biópsia de acompanhamento, e evolução para óbito em função da doença primária dos pacientes transplantados com ou sem GVHDc

PACIENTES	com GVHDc			sem GVHDc		
	Regime pré-condicionante	GVHDc em outros órgãos	Óbito	Regime pré-condicionante	GVHDc em outros órgãos	Óbito
1	BU +CY	-	-	FLU + BU	-	-
2	FLU + BU	P	-	CY	-	-
3	FLU + CY	-	-	FLU + BU	-	-
4	CY	-	Sim	BU +CY	-	-
5	FLU +BU	P	-	BU + CY	-	-
6	BU +CY	-	-	FLU + BU	-	-
7	BU + CY	-	-	FLU + BU	-	Sim
8	BU + CY	-	-	FLU + BU	-	-
9	BU +CY	-	-	FLU + CY	-	-
10	BU + FLU	-	-	CY	-	-
11	BU + FLU	-	-	BU + CY	-	-
12	BU + CY	P	-	FLU + BU	-	Sim
13	BU + CY	P	-	BU + CY	-	-
14	BU +CY	-	-	BU + CY	-	-
15	FLU + BU	-	-	BU + CY	-	-
16	CY	P	-	BU + CY	-	-
17	BU + CY	-	-	FLU + BU	-	-
18	BU + CY	-	-	BU + CY	-	Sim
19	BU + CY	-	-	CY	-	-
20	BU + CY	P, TGI	-	FLU + BU	-	-
21	BU + CY	P	-	CY	-	-
22	BU + CY	-	-	BU + CY	-	Sim
23	FLU + BU	-	-	FLU +BU	-	-
24	BU +CY	-	-	FLU + BU	-	-
25	FLU + BU	-	-	BU + CY	-	-
26	CY	P	-	CY	-	-
27	FLU + BU	-	-	FLU + BU	-	Sim
28	BU + CY	TGI	-	BU + CY	-	-
29	FLU + BU	TGI	-	BU + CY	-	-
30	BU + CY	P	-	BU + CY	-	-

BU: Bussulfano; FLU: Fludarabina; CY: Ciclosfosfamida; P: Pele; TGI: Trato Gastrointestinal

ANEXO A - Protocolo de condicionamento pré-transplante de medula óssea alogênico

LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LMC)**Idade****< 30 Anos**

- BU₁₆ + CY₁₂₀

> 30 Anos

- FLU₁₅₀ + BU₁₆

> 60 Anos

- BU₈ + FLU₁₅₀

LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA (LMA)

- BU₁₆ + CY₁₂₀

- FLU₁₅₀ + BU₁₆

LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA)

- BU₁₆ + CY₁₂₀

- CY₁₂₀ + TBI

- TBI + VP

APLASIA DE MEDULA ÓSSEA**Nº de Transfusões****< 15 trasnf.**

- CY₂₀₀

> 15 trasnf.

- FLU₁₅₀ + CY₁₂₀- BU₈ + CY₁₂₀

BU = Bussulfano, CY = Ciclosfosfamida, FLU = Fludarabina, TBI = Radioterapia Corpórea Total, VP = Vepeside

ANEXO B - Protocolo de tratamento para profilaxia pós-transplante de medula óssea

PROTOCOLO DE PROFILAXIA PÓS TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA PARA GVHD	DURAÇÃO DO TRATAMENTO
Ciclosporina + Metrotexate (CSA + MTX)	100 DIAS PÓS TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA
Ciclosporina + Micofenolato Mofetil (CSA + MMF)	100 DIAS PÓS TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA
Ciclosporina (CSA)	100 DIAS PÓS TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA
Ciclosporina + Corticosteróide (CSA + Corticosteróide)	100 DIAS PÓS TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

ANEXO C - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

F U N D A Ç Ã O
AMARAL CARVALHO

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Fundação Hospital Amaral Carvalho**

Rua Dr. Miranda Junior, 16, Jardim Alvorada – CEP 17.210-300 – Jaú / SP - ☎ (014) 3602-1194 – Ramal - 1552.

Parecer CEPFHAC – 147/09 - Recurso.

Protocolo de Estudo

Avaliação Quantitativa da Quimiocina CCL20 e seu Receptor CCR6 e a Relação com a Concentração de Células de Langerhans na GVHDc em Mucosa Bucal.

Documentos avaliados:

✓ Currículo na Plataforma Lattes dos participantes da pesquisa.

Pesquisador Responsável:

Autoria: Érika Sinara Lenharo Orti Raduan - aluna do Programa de Pós-Graduação (Doutorado) em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

Orientação: Profa. Dra. Vanessa Soares Lara - Professora Livre Docente pela Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

Colaboração: Dr. Adauto José Ferreira Nunes - Médico Patologista do Hospital Estadual de Bauru.

Trata-se de recurso ao Parecer CEPFHAC nº. 147/09, datado de 23 de outubro de 2009, onde o projeto de pesquisa supracitado foi aprovado com a recomendação do envio dos currículos dos participantes da pesquisa na plataforma lattes.

Os documentos analisados encontram-se de acordo com a recomendação do citado parecer, podendo o projeto ser considerado aprovado.

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 Sartori, 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, 29 de outubro de 2009.

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

F U N D A Ç Ã O
AMARAL CARVALHO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Fundação Hospital Amaral Carvalho

Rua Dr. Miranda Junior, 16, Jardim Alvorada – CEP 17.210-300 – Jauú / SP - ☎ (014) 3602-1194 – Ramal - 1552.

Parecer CEPFHAC – 147/09 - Adendo.

Protocolo de Estudo

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

Documentos avaliados:

✓ Carta solicitando alteração no título da pesquisa, datada de 18 de julho de 2011.

Pesquisador Responsável:

Autoria: Érika Sinara Lenharo Orti Raduan - aluna do Programa de Pós-Graduação (Doutorado) em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

Orientação: Profa. Dra. Vanessa Soares Lara - Professora Livre Docente pela Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

Colaboração: Dr. Adauto José Ferreira Nunes - Médico Patologista do Hospital Estadual de Bauru.

Trata-se de declaração assinada pela pesquisadora principal solicitando a alteração do título da pesquisa de: "Avaliação Quantitativa da Quimiocina CCL20 e seu Receptor CCR6 e a Relação com a Concentração de Células de Langerhans na GVHDc em Mucosa Bucal", para "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".

Não há qualquer outra implicação de ordem ética que possa prejudicar a execução 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 Sartori, 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.

Jauú, 18 de julho de 2011.

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