

JULIANA YURI KAWAMURA

**O EFEITO DA CICLOSPORINA A NA POPULAÇÃO DE CÉLULAS
APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS EM HIPERPLASIA GENGIVAL
MEDICAMENTOSA**

São Paulo

2006

Juliana Yuri Kawamura

**O efeito da ciclosporina A na população de células apresentadoras
de antígenos em hiperplasia gengival medicamentosa**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Profa. Dra. Marina HCG Magalhães

São Paulo

2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Kawamura JY. O efeito da ciclosporina A na população de células apresentadoras de antígenos em hiperplasia gengival medicamentosa [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, / /2006

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, por guiar meus passos, me proteger e conduzir minha vida sempre no sentido da evolução espiritual.

Aos meus pais Paulo e Maria da Graça, obrigada por tudo! Pessoas que sempre posso contar e que nunca conseguirei agradecer todos os esforços para garantir, a mim e aos meus irmãos, os maiores bens que qualquer pessoa deseja ter: amor, respeito, saúde e educação.

Ao meu noivo Bruno, pessoa iluminada, um verdadeiro presente de Deus, que me acompanha a cada instante, sempre torcendo pelas minhas conquistas e nunca medindo esforços para me ajudar.

Aos meus irmãos, pelo aprendizado da convivência, sinceridade e por todos os momentos que passamos juntos.

AGRADECIMENTOS

À professora Marina, por ter me aberto as portas do conhecimento científico, me proporcionado grande aprendizado e convivência enriquecedora.

A FOUSP que me proporcionou, desde 1996, umas das melhores recordações de minha vida. Adorei estudar aqui!

A todos os professores da Disciplina de Patologia Bucal que, de uma forma ou de outra, participaram de minha formação acadêmica.

À minha amiga-irmã Daniela Botega, que hoje e sempre será um grande apoio em minha vida. Podemos sempre contar uma com a outra e isso ninguém paga!

À minha amiga Luciana Matizonkas por participar ativamente de minha vida e que encontramos uma na outra o otimismo e a esperança de nossas realizações.

Ao amigo Sérgio Alves, pessoa encantadora e competente que me auxiliou muito na elaboração das análises estatísticas, além de um ótimo conselheiro.

Aos amigos Cláudio Sakura e Fernanda por terem confiado e acreditado em mim. Agradeço todos os dias por ter encontrado pessoas maravilhosas como vocês.

Exercer a profissão junto a vocês me faz querer sempre melhorar!

A todos os colegas de pós-graduação, pois sem dúvida nenhuma, nossa agradável interação me proporcionou momentos inesquecíveis, bem como amadurecimento como pessoa e como profissional.

Às secretárias e técnicas da Disciplina que sempre permitiram uma convivência prazerosa durante todo o tempo.

A CAPES pela bolsa de grande valia durante meu tempo de pós-graduanda.

Kawamura JY. O efeito da ciclosporina A na população de células apresentadoras de antígenos em hiperplasia gengival medicamentosa [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

A proposta do nosso estudo foi comparar o número de células apresentadoras de antígenos (CAAs) presentes em biópsias de gengivite (G) e de hiperplasia gengival induzida por ciclosporina (HGIC). Vinte e oito biópsias de pacientes com G e 14 biópsias de HGIC foram analisadas no epitélio de revestimento bucal (ERB), epitélio sulcular (ES) e no tecido conjuntivo (TC). O número de macrófagos (CD68+), de células de Langerhans (CD1a+) e de células dendríticas intersticiais (CDIs) (FXIIIa+) foi investigado por técnica imunoistoquímica. Células CD1a+/mm² foram significativamente aumentadas na G quando comparada com HGIC, no TC, no ES e no ERB (p<0,05). Em contrapartida, o número de células CD68+ no TC e no ERB, e o número de células FXIIIa+/mm² no TC foram aumentadas no grupo de HGIC (p<0,05). Ciclosporina A está relacionada com a diminuição de células de Langerhans. Podemos sugerir que este fato aumenta as infecções oportunistas, conseqüentemente, um maior número de macrófagos é necessário para combater os microorganismos.

Palavras-Chave: Doença periodontal, ciclosporina A, células apresentadoras de antígenos, imunoistoquímica

Kawamura JY. The effect of antigen-presenting cells in the human gingival overgrowth [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the number of antigen-presenting cells (APCs) observed in biopsies of gingivitis (G), and in cyclosporine-induced gingival overgrowth (CIGO). Twenty eight biopsies from patients with G, and 14 with CIGO were analyzed in oral epithelium (OE), sulcular/junctional epithelium (SJE), and connective tissue (CT). The number of macrophages (CD68+), Langerhans' cells (CD1a+), and interstitial dendritic cells (FXIIIa+) was investigated by immunohistochemistry. CD1a+ cells/mm² were significantly increased in G when compared with CIGO, in CT, in SJE, and in OE (p<0.05). In contrast, the number of CD68+ in CT, and in OE, and FXIIIa+ cells/mm² in CT were increased in CIGO group (p<0.05). Cyclosporine is related with the diminution of Langerhans' cells. We can suggest that this fact increase opportunistic infections, consequently, a greater number of macrophages is necessary in order to combat the microorganisms.

Keywords: Periodontal disease, cyclosporin A, antigen-presenting cell, immunohistochemical

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 Ciclosporina e seus efeitos no sistema imunológico	11
2.2 Células apresentadoras de antígenos: células dendríticas (células de Langerhans e células dendríticas intersticiais) e macrófagos	14
2.2.1 células dendríticas (células de Langerhans e células dendríticas intersticiais).....	14
2.2.1.1 células de Langerhans (CLs).....	19
2.2.1.2 células dendríticas intersticiais.....	22
2.2.2) Macrófagos	24
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	54

1 INTRODUÇÃO

Pacientes transplantados de órgãos são submetidos, após o transplante, à terapia imunossupressora, a fim de minimizar os riscos de rejeição do órgão recebido. Dentre as drogas imunossupressoras existentes, a ciclosporina (CsA) vem sendo utilizada desde 1978, marcando uma nova fase na história médica dos transplantes, já que não só apresentava capacidade de aumentar significativamente a taxa de sobrevivência dos pacientes, mas também de melhorar sua qualidade de vida (AFONSO; BELLO, SOARES, 2005).

O mecanismo preciso da ação da CsA no sistema imunológico não está totalmente elucidado, contudo, há evidências de que preferencialmente atue nas células T, prejudicando a produção de IL-2 e outras linfocinas. Tem-se demonstrado que a CsA pode também inibir as funções de células acessórias e células apresentadoras de antígenos (KNIGHT et al., 1986).

Macrófagos e células dendríticas são células apresentadoras de antígenos (CAAs) e expressam moléculas co-estimulatórias especializadas necessárias para ativar células T. Contudo, esses tipos celulares só expressam essas moléculas quando adequadamente ativados no contexto da resposta à infecção. Células dendríticas (CDs) podem capturar, processar e apresentar uma imensa variedade de patógenos e antígenos, além de serem as mais importantes ativadoras de células T naïve. Macrófagos são especializados em processar e apresentar antígenos de patógenos ingeridos e antígenos solúveis, e também são os alvos de ações subsequentes de células T CD4 efetoras (JANEWAY Jr et al., 2001).

Embora a CsA tenha revolucionado a história dos transplantes, ela traz diversos efeitos colaterais aos seus usuários, sendo a hiperplasia gengival a principal alteração de interesse odontológico.

A análise das células apresentadoras de antígenos na hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina pode ajudar-nos a conhecer melhor a resposta imunológica dos tecidos periodontais de pacientes transplantados, bem como elucidar alguns aspectos etiopatológicos da hiperplasia gengival nesses indivíduos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Didaticamente, dividimos a revisão de literatura em 2 tópicos: 1) ciclosporina e seus efeitos no sistema imunológico e 2) células apresentadoras de antígenos: células dendríticas (células de Langerhans e células dendríticas intersticiais) e macrófagos.

2.1 Ciclosporina e seus efeitos no sistema imunológico

A CsA é um medicamento com potente ação imunossupressora tanto *in vitro* quanto *in vivo*. É universalmente utilizada como imunomodulador na prevenção de rejeição de transplantes de órgãos sólidos e de medula óssea, e no tratamento de doenças auto-imunes (FERGUSON; FIDELUS-CORT, 1983).

Sua absorção se dá no intestino, com pico de concentração sérica após 3-4 horas da ingestão, com meia vida variável de 17 a 40 horas (BEVERIDGE; GRANTWOHL; MICHOT, 1981). Acumula-se no pâncreas, baço, fígado, tecido gorduroso, pulmão, rim, medula óssea, coração e sangue. A metabolização da droga ocorre no fígado e sua eliminação ocorre principalmente pelas vias biliares, diretamente nas fezes.

Os efeitos colaterais relacionados com o uso contínuo da CsA têm sido relatados na literatura e incluem: nefrotoxicidade, hipertensão, hepatotoxicidade,

neurotoxicidade, diabetes, alteração no metabolismo ósseo e hiperplasia gengival (MARSHALL; BARTOLD, 1998).

A hiperplasia gengival relacionada ao uso da ciclosporina acomete uma porcentagem que varia de 13% a 80% dos pacientes transplantados de órgãos que fazem uso desta droga (MARGIOTTA et al., 1996). A incidência e o grau de severidade estão na dependência de vários fatores tais como: suscetibilidade do paciente, dose de ciclosporina ingerida, associação com outros medicamentos, duração da terapia, controle do biofilme, dentre outros (RAMALHO et al., 2003). Na dependência destes fatores, o aspecto clínico da hiperplasia pode variar desde um discreto aumento da papila gengival até seu crescimento determinando a completa cobertura das coroas dentárias.

O tratamento e a prevenção da HGIC estão relacionados a programas de higiene bucal acompanhados de plastias gengivais (SEYMOUR; SMITH; ROGERS, 1987; SEYMOUR; SMITH, 1991; McGAW; LAM; COATES, 1987). A substituição da CsA por tacrolimus pode reduzir significativamente a HGIC, no entanto a troca de medicação imunomoduladora requer a análise criteriosa de cada caso em particular (BUSQUE et al., 1999; KHONLE et al., 1999; HARIKRISHNAN; HARDEN, 1999).

A CsA atua em diferentes passos da resposta imunológica, podendo se ligar a todos linfócitos do sangue periférico, com ligação preferencial aos linfócitos T, onde compete pelos seus sítios de ligação, como o anti-CD3 (OKT3) (THOMSON; WEBSTER, 1988).

Os efeitos nos linfócitos T têm sido extensivamente investigados. CsA inibe eventos de sinalização antígenos-dependente e diminui a proliferação de células T em resposta a mitógenos (THOMSON; WEBSTER, 1988).

Com relação ao ciclo celular, a CsA inibe o estágio de transição G0-G1 de células T humanas, sendo que o evento G1 é necessário para que linfócitos humanos sem mobilidade, adquiram capacidade de se locomover (WILKINSON; HIGGINS, 1987).

Segundo Thomson e Webster (1988) a única ação irrefutável da CsA contra células T auxiliares é seu potente efeito inibitório na produção de linfocinas *in vitro*. Contudo, o mecanismo preciso pelo qual CsA bloqueia a transmissão de sinais antigênicos permanece obscuro, embora haja especulações de que seja resultado da interferência com vias de sinalização Ca^{2+} dependente.

O'Valle et al. (1994) sugeriram um possível mecanismo imunorregulatório da patogênese da hiperplasia gengival causada pela CsA, uma vez que em 30 casos estudados, através de técnica imunoistoquímica, encontraram uma maior relação entre CD4/CD8 quando comparado com controles saudáveis. Além disso, o número células CD45+, CD4+ e CD68+ (marcadores para leucócitos, células T auxiliares e macrófagos, respectivamente) aumentaram conforme com o grau de hiperplasia gengival aumentava.

Chen et al. (2004) analisaram *in vitro* os efeitos diretos da CsA em CDs, usando concentrações clinicamente relevantes. Examinaram se houve inibição da diferenciação de CDs e maturação fenotípica e encontraram que CsA pode alterar significativamente a capacidade migratória das CDs. Além disso, demonstraram que adicionando prostaglandina E2 exógena (PGE2) em culturas de CDs tratadas com CsA, houve restauração de sua capacidade migratória. Sugeriram, então, que a CsA afeta a função de CDs em várias etapas durante a resposta imunológica, incluindo a migração, sendo PGE2 um importante regulador da migração.

As CDs são consideradas células chave no desenvolvimento da pega do enxerto. Finalmente, a alta incidência de complicações infecciosas e de neoplasias malignas depois de transplantes pode ser explicada, pelo menos em parte, pela interferência de drogas imunossupressoras com as funções normais das CDs. Recentemente, os efeitos das drogas imunossupressoras nas funções específicas das CDs, como capturação de antígenos, maturação, migração e estimulação de células T, têm sido caracterizados (HESSELINK et al., 2005).

2.2) Células apresentadoras de antígenos: células dendríticas e macrófagos

Células apresentadoras de antígenos (CAAs) tais como CDs, macrófagos e linfócitos B são capazes de ingerir, processar e apresentar antígenos. Contudo, estas células têm diferentes funções imunológicas (PALUCKA et al., 1998), que serão abordadas a seguir.

2.2.1 células dendríticas (células de Langerhans e células dendríticas intersticiais)

Células dendríticas (CDs) formam um sistema de células apresentadoras de antígenos (CAAs) que é distribuído por todo o corpo. Estão presentes em pequenas populações em tecidos linfóides e não-linfóides e na circulação (Tabela 2.1). São caracterizadas por seu aspecto dendrítico e morfologia velada e por expressarem altos níveis de moléculas MHC (complexo principal de histocompatibilidade) classe II em sua superfície. São responsáveis por reconhecer, processar, reter, transportar os antígenos até sítios imunorreativos e apresentá-los aos linfócitos T (HEADINGTON; CÉRIO, 1990). São consideradas CAAs porque são as únicas capazes de iniciar

respostas imunes primárias, permitindo então o estabelecimento da memória imunológica (CUTLER; JOTWANI, 2004; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). Em seu estado imaturo, são eficientes células captadoras de antígenos e, em seu estado maduro, elas passam por alterações fenotípicas que facilitam sua migração através de órgãos linfóides para apresentação de antígenos às células T (NEUTRA, 1998; STEINMAN; PACK; INABA, 1997b; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

Tabela 2.1 Sistema de células dendríticas: distribuição e nomenclatura

Distribuição	Nomenclatura
Órgãos não-linfóides	Células de Langerhans, CDs intersticiais
Circulação	Células veladas de linfáticos aferentes, CDs sanguíneas
Órgãos linfóides	CDs linfóides, células interdigitantes

Hoje se sabe que, além da capacidade de estimular células T, as CDs apresentam importante papel no crescimento de células B e na secreção de imunoglobulinas (CAUX et al., 1997), podendo ativar diretamente células B naive e de memória. Acentuam a diferenciação de células B de memória voltada para células secretoras de IgG. Sendo assim, subtipos de CDs têm a capacidade de regular diretamente respostas de células B (BANCHEREAU et al., 2000).

Foram primeiramente visualizadas como células de Langerhans na pele em 1868, porém sua caracterização iniciou há cerca de 30 anos (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998), pouco se sabendo ainda hoje sobre suas diferenças fenotípicas, morfológicas e principalmente funcionais.

Segundo Peters et al. (1996) existem duas possíveis vias de desenvolvimento de CDs. Na primeira, as CDs derivam de um precursor mielóide que é comum na via

de desenvolvimento tanto de monócitos quanto de macrófagos. CDs descendem precocemente dentro desta linhagem e então aparecem no sangue como uma CD sanguínea, que completará sua diferenciação em CD após entrar no tecido. Na segunda, as CDs se desenvolveriam a partir de um monócito tardio, também chamado de célula indeterminada, a qual dependendo das citocinas presentes no microambiente, podem originar macrófagos ao invés de CDs.

O desenvolvimento de sistemas de cultura de CDs *in vitro* tem auxiliado os pesquisadores a desenvolver grandes quantidades de CDs altamente purificadas. Elas têm sido cultivadas através de células progenitoras hematopoiéticas CD34+ presentes na medula óssea ou no sangue periférico e também de 3 precursores sanguíneos diferenciados de progenitores CD34+: monócitos CD14+, precursores CD11c+ e precursores CD11c- (PETERS et al., 1996; CUTLER; JOTWANI, 2004).

Banchereau et al. (2000) verificaram em estudos de cultura de células que precursores mielóides CD34+ se diferenciam ou em monócitos (precursores de CDs CD14+ CD11c+) os quais produzem ou CDs imaturas em resposta ao fator estimulador de colônia granulócito/macrofágico (GM-CSF) e interleucina 4 (IL-4), ou em macrófagos em resposta ao fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) (via intersticial). Progenitores mielóides também se diferenciam em precursores CD11c+ CD14-, os quais produzem ou células de Langerhans em resposta ao GM-CSF, IL-4 e TGF β , ou macrófagos em resposta ao M-CSF. Esses precursores tardios podem espontaneamente se diferenciar em CDs quando em cultura. Precursores de CD CD14- CD11c- IL-3R α + podem originar-se de progenitores CD34+ linfóides e se diferenciar em CDs imaturas em resposta a IL-3. CDs imaturas se diferenciam em CDs maduras em resposta a citocinas ou a produtos de patógenos (como por exemplo, ao lipopolissacarídeo) (Figura 2.1).

Womer et al. (2005) estudaram os efeitos do transplante renal nas células dendríticas dos subtipos mielóide e linfóide do sangue periférico. Usando citometria de fluxo, os níveis de CDs do sangue periférico foram quantificados nos pacientes com doença renal em estágio final, antes do transplante e após o transplante. Os níveis de CDs nestes pacientes foram significativamente reduzidos quando comparados com indivíduos saudáveis. O uso de drogas imunossupressoras após o transplante renal resultou em uma dramática redução tanto das CDs mielóides quanto das CDs linfóides. Os níveis de ambos subtipos de CDs foram significativamente menores do que os encontrados em pacientes saudáveis. Os achados sugeriram que os níveis de CDs refletem o grau de imunossupressão dos pacientes transplantados em decorrência da terapia imunossupressora. Para os autores, o monitoramento dos níveis periféricos de CDs pode representar uma nova estratégia para prever resultados importantes tais como rejeição aguda, perda do órgão transplantado e complicações infecciosas, uma vez que esses eventos só ocorrem quando há uma queda no estado imunológico do indivíduo.

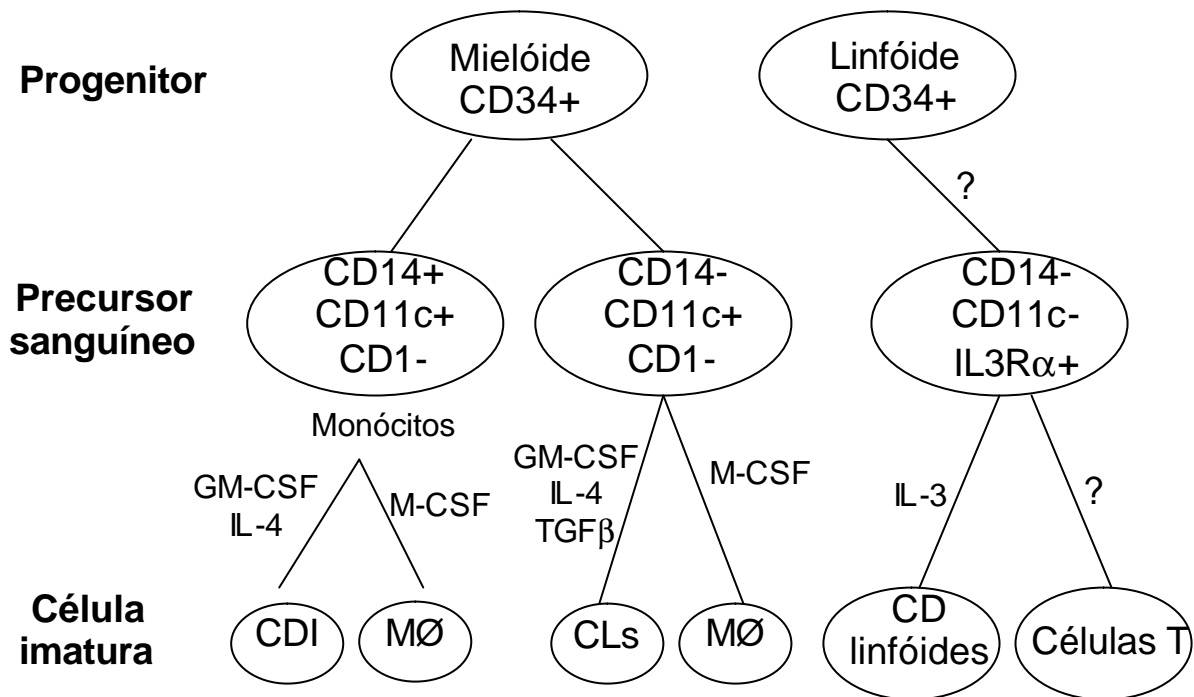


Figura 2.1- Possíveis vias de desenvolvimento de células dendríticas (adaptado de BANCHEREAU et al., 2000)

Em suma, o ciclo de vida das CDs (ou o processo de maturação) se inicia na medula óssea, através de células precursoras (CHAPUIS et al., 1997). Estas células precursoras migram para os tecidos periféricos e lá residem no estado imaturo. Neste estado, as CDs são eficientes células captadoras de antígenos e apresentam capacidade de processá-los. Posteriormente, passam por alterações fenotípicas que facilitam a migração aos órgãos linfóides, através da linfa ou do sangue. Nos órgãos linfóides, as CDs perdem a habilidade de capturação e processamento de antígenos e adquirem capacidade de apresentá-los aos linfócitos T. Nesta nova fase, as CDs são consideradas e denominadas de células dendríticas maduras (ROMANI; SCHULER, 1992; CHAPUIS et al., 1997).

2.2.1.1 células de Langerhans (CLs)

São as CDs não-linfóides mais bem caracterizadas e estudadas (STEINMAN, 1991) e são fortemente positivas para o anticorpo anti-CD1a. Estão localizadas nas camadas suprabasais do epitélio e constituem 2-8% das células intra-epiteliais. Epitélios não queratinizados requerem maior quantidade de CLs para proteger adequadamente o tecido (BARRETT; CRUCHLEY; WILLIAMS, 1996). Na gengiva, CLs estão presentes no epitélio sulcular mas não estão presentes no epitélio juncional, nem no epitélio juncional longo de bolsas periodontais (NEWCOMB; POWELL, 1986).

Apresentam em sua ultra-estrutura grânulos de Birbeck que, segundo Lappin, Kimber e Norval (1996) podem ser importantes na endocitose mediada por receptor e no processamento do antígeno intracelular. Contudo, há alguma evidência de que os grânulos de Birbeck podem não ser um requisito absoluto para a atividade funcional das células de Langerhans.

Kinane, Drummond e Chisholm (1990) avaliaram 7 pacientes com HGM induzida por fenitoína e compararam com 5 indivíduos com gengivite marginal crônica. Biópsias gengivais foram realizadas e os cortes congelados submetidos à técnica imunoistoquímica usando anticorpo monoclonal OKT6, e o número de CLs foi contado. Na HGM houve um marcante aumento nas CLs quando comparado com a gengivite crônica. Uma vez o tratamento periodontal terminado, ambos os grupos apresentaram uma redução no número de CLs. Contudo, os níveis de CLs na HGM permaneceram significativamente maiores do que na gengivite crônica. Os achados sugeriram que o número de células de Langerhans é elevado na gengivite crônica e

na hiperplasia gengival induzida pela fenitoína, em decorrência do acúmulo de placa bacteriana.

Nurmenniemi, Pernu e Knuutila (1999) comparando a distribuição de CLs CD1a+ presentes na gengiva normal e na HGM induzida por nifedipina e por drogas imunossupressoras, observaram que, o número de células CD1a+ foi significativamente menor nos grupos de pacientes medicados do que no grupo controle em todo epitélio analisado (epitélio oral, epitélio sulcular oral, epitélio sulcular) e também no tecido conjuntivo próximo ao epitélio sulcular. Além disso, houve significativamente menor quantidade de células CD1a+ no epitélio sulcular no grupo nifedipina quando comparado com o grupo de drogas imunossupressoras. Concluíram que o número reduzido de células CD1a+ encontrado na hiperplasia gengival induzida por nifedipina foi semelhante ao número reduzido de células CD1a+ encontrado na hiperplasia gengival induzida por drogas imunossupressoras.

Teunissen et al. (1991) investigaram os efeitos da CsA tanto na capacidade de células de Langerhans estimularem células T alogênicas quanto na apresentação de antígenos a células T autólogas. Células de Langerhans foram tratadas com CsA e o resultado foi uma diminuição dose-dependente (de até 90%) da capacidade funcional delas em estimular células T. Os autores concluem que a supressão da função imunoestimulatória seja um efeito direto da CsA nas células de Langerhans.

Séguier, Godeau e Brousse (2000a) fizeram análise imunoistoquímica e morfométrica de linfócitos intra-epiteliais e de CLs no tecido gengival humano saudável e doente. Gengiva de pacientes sem doença periodontal, gengiva de pacientes com gengivite e de pacientes com periodontite crônica foram quantitativamente analisadas para populações de células CD1a+, CD45RB+, CD3+, CD8+, CD20+, TIA-1+ e GrB+ e para a fração de área ocupada por fibras colágenas

no tecido conjuntivo gengival próximo ao epitélio. Os resultados mostraram que o número de linfócitos intra-epiteliais foi significativamente maior no grupo controle, exceto as células CD20+. Significante diminuição no número de células CD1a+ também foi encontrada nos grupos doentes quando comparados com o controle. Contudo, nenhuma diferença foi encontrada no número de células CD1a+ entre o grupo com gengivite e o grupo com periodontite. Este trabalho demonstrou uma diminuição no número de células CD1a+ de acordo com a agressividade da DP, estimada pelo número de CLs intra-epitelial e pela fração de área ocupada por fibras colágenas.

Análise morfológica quantitativa de CLs foi realizada por Séguier et al.(2000b) em gengiva humana saudável e doente. Foram utilizadas amostras gengivais de 11 controles saudáveis, 8 pacientes com gengivite e 12 pacientes com periodontite do adulto crônica. Os resultados mostraram que na camada basal dos grupos experimentais, o perímetro, a superfície e o diâmetro das LCs CD1a+ foram significativamente diminuídos quando comparados com aqueles das camadas suprabasais do epitélio do mesmo grupo. Além disso, CLs CD1a+ se tornaram mais arredondadas, quando localizadas próximo à membrana basal. Nas camadas suprabasais do grupo com periodontite o perímetro, a superfície e o diâmetro das LCs CD1a+ foram significativamente diminuídos e o fator forma significativamente aumentado quando comparado com o grupo controle. Este trabalho trouxe evidências para a presença de variações morfológicas importantes nas CLs CD1a+ de acordo com sua localização dentro do epitélio e a agressividade da DP. Os autores sugeriram que as alterações morfológicas observadas poderiam refletir uma adaptação celular durante a transmigração epitelial e eventualmente estarem envolvidas na estimulação imunológica durante a periodontite.

Mariani et al. (2004) estudaram as características ultra-estruturais do epitélio gengival em pacientes transplantados renais e, em particular, as células de Langerhans com o objetivo de verificar se modificações ultra-estruturais poderiam explicar a hiperplasia gengival. Usando microscopia eletrônica e marcador imunistoquímico S100 em microscopia ótica, examinaram espécimes gengivais obtidos de 18 pacientes transplantados renais que apresentavam hiperplasia gengival seguida do tratamento com CsA. A hiperqueratose mostrada pelo epitélio, e especialmente a ausência de grânulos de Birbeck nas células de Langerhans observadas nas seções seriadas permitiram os autores correlacionarem os dados da imunodeficiência que afetam o epitélio no complexo mecanismo determinante da hiperplasia. Concluíram que a responsabilidade da hiperplasia gengival não pode ser atribuída apenas ao tecido conjuntivo, mas também ao epitélio.

2.2.1.2 células dendríticas intersticiais

As CDs intersticiais (células FXIIIa+) são residentes normais da submucosa e derme. Acredita-se que tenham papel importante na regulação da resposta imunológica. Sua morfologia e expressão de HLA-DR sugerem que sejam capazes de processar e apresentar antígenos (CERIO et al., 1990). Tem sido postulado que estejam envolvidas na resposta imunológica e inflamatória de diversas lesões, bem como apresentam um importante papel nos processos reparativos (REGEZI et al., 1994).

Células FXIII^A representam populações específicas de CDs e são muitas vezes encontradas em associação com vasos sanguíneos. Parecem participar de lesões reativas orais e em neoplasias, como potente CAAs. Têm sido encontradas em maior número em várias condições inflamatórias, incluindo úlceras aftosas. Alterações em tamanho, forma e distribuição bem como a presença aumentada e localização perivascular poderiam indicar seu envolvimento em mecanismos inflamatórios locais (DEREKA et al., 2004).

Uma diferença funcional entre as células de Langerhans e as células dendríticas intersticiais é que apenas estas estimulam diretamente as células B naive a produzir anticorpos (CAUX et al., 1997).

Mosher et al. (1979) mostraram que a fibronectina é um substrato para o FXIII^A e ela pode ser substituída pelo colágeno tipo I e III através do FXIII^A. Utilizaram gel de eletroforese para investigar esta substituição da fibronectina para colágeno por intermédio do FXIII^A. Acreditam que essa substituição possa ser importante para a cicatrização normal de tecidos, para a fibrilogênese do colágeno e também para a embriogênese.

Toida et al. (1989) analisaram a distribuição de células FXIII^A em várias lesões bucais e maxilofaciais. Através de técnica imunoistoquímica, as seguintes lesões foram analisadas: 1 caso de HGM dilatínica, 3 casos de granuloma piogênico gengival, 3 casos de fibroma, 7 casos de carcinoma epidermóide, 2 casos de adenite submandibular esclerosante crônica e 1 caso de displasia fibrosa. Todos os espécimes apresentavam também uma porção de tecido não acometido pelas lesões e estas regiões também foram examinadas. Os resultados mostraram células FXIII^A esparsas nos tecidos normais, mas evidentemente abundantes no tecido conjuntivo fibroso de lesões inflamatórias e neoplásicas. Os autores sugerem que as

células FXIIIa+ apresentam um importante papel no processo de fibrose em várias lesões orais.

Regezi, Nickoloff e Headington (1992) determinaram a presença e distribuição de células FXIIIa+ e células CD34+ na submucosa oral e em algumas lesões fibrovasculares (fibroma, fibroma ossificante periférico, lesão periférica de células gigantes, granuloma piogênico, linfangioma, histiocitoma fibroso benigno, histiocitose idiopática, angiofibroma). Através da análise imunoistoquímica, observaram que as células FXIIIa+ foram abundantemente presentes em tecidos normais com distribuições características: associadas ao colágeno, aos vasos sanguíneos e aos vasos linfáticos. A porcentagem de células FXIIIa+ nas lesões orais foi: fibroma 10-30%, fibroma ossificante periférico 5-10%, lesão periférica de células gigantes 0-5%, granuloma piogênico 5-20%, linfangioma 0%, histiocitoma fibroso benigno 5-25%, histiocitose idiopática 0%, angiofibroma 10-20%. Com relação às células FXIIIa+, os autores concluíram que são células residentes normais da submucosa e que participam na formação de algumas lesões reativas e neoplásicas orais.

2.2.2) Macrófagos

Macrófagos fazem parte da resposta imune inata. Diferente das células B e T, eles não contêm nenhum receptor específico. Continuamente fagocitam proteínas próprias e células durante reparo tissular normal. Todas estas proteínas são degradadas e apresentadas ao complexo de histocompatibilidade principal classe II

(CHP-II). Essas proteínas próprias, contudo, não ativam células T porque na ausência de infecção, macrófagos expressam baixos níveis de CHP-II, e praticamente não apresentam papel co-estimulatório (JANEWAY Jr et al., 2001).

São importantes células fagocíticas que capturam microorganismos invasores e participam da sua eliminação tanto por citólise direta quanto pela apresentação de peptídeos a células T e indução de imunidade específica. Macrófagos também secretam citocinas e mediadores lipídicos que regulam a resposta imunológica, incluindo TNF- α , IL-1, IL-6, fator ativador de plaquetas (PAF), e PGE2 (AL-DARMAKI et al., 2003).

Manca, Kunkl e Celada (1985), observaram inibição da função acessória de macrófagos *in vitro* pela ciclosporina. Inicialmente, adicionaram à cultura de macrófagos, CsA. Após, células T foram introduzidas. Foi observada uma redução na proliferação de células T em 5% e, conseqüentemente, houve prejuízo na produção de interleucina-2. Os autores concluíram que a inibição induzida pela CsA nas funções de células T (proliferação e produção de IL-2) seja parcialmente devido ao efeito da droga nas funções acessórias dos macrófagos.

Palay et al. (1986) avaliaram *in vitro* a influência da ciclosporina na ativação de células T pelos macrófagos. A ativação de células T por antígenos derivados da *Listeria monocytogenes* foi monitorada através da produção de IL-2. Quando CsA foi adicionada na cultura de macrófagos, foi observada uma população celular com capacidade marcadamente diminuída de ativar linfócitos T. Contudo, não observaram diminuição na quantidade de macrófagos.

Topoll et al. (1989) investigaram se macrófagos funcionalmente diferentes estavam presentes na gengiva clinicamente saudável e durante gengivite experimental. Oito homens foram introduzidos em um programa de higiene oral até

que todos apresentaram índice de placa e índice gengival igual a zero. Durante os 19 dias subseqüentes, a higiene oral foi abandonada. Índices clínicos foram mensurados e biópsias gengivais foram realizadas nos dias 0, 2, 4, 7, 11 e 14. Os espécimes foram congelados e incubados com os seguintes anticorpos: 25F9 (macrófagos residentes), 27E10 (macrófagos inflamatórios) e RM 3/1 (macrófagos intermediários no tecido em cicatrização). Os macrófagos inflamatórios apresentaram uma redução significativa durante a fase de higiene oral e um significativo aumento durante a gengivite experimental. Uma vez que 27E10 representa um tipo de macrófago ativado, que é induzido por fatores ativadores de macrófagos (como LPS), o aparecimento deste subtipo reflete o influxo de macrófagos inflamatórios em resposta ao acúmulo de bactérias. Além disso, os autores acreditam que se este subtipo foi associado a altos valores de índice gengival, este macrófago pode ser o gatilho da resposta imune. Contudo, não pôde ser decidido se 27E10 atua como célula acessória pela indução de linfócitos T auxiliares ou como células efectoras por exercer efeitos citotóxicos nas bactérias. Com relação às células RM 3/1, houve um aumento significativo ao final da fase de higiene oral e uma diminuição durante a fase de gengivite experimental. Não houve diferenças no número de células 25F9+ durante todo o estudo. Os autores concluem que a inflamação gengival experimental é caracterizada pelo aparecimento e desaparecimento de subpopulações de macrófagos diferentes e que essas alterações podem estar associadas com lesões periodontais destrutivas.

Schlegel Gomez et al. (1995) analisaram imunoistoquimicamente o padrão de expressão dos antígenos 27E10 (macrófagos inflamatórios), 25F9 (macrófagos residentes) e RM3/1 (macrófagos intermediários no tecido em cicatrização) em 29 biópsias de espécimes de diferentes estágios de gengivite e periodontite.

Macrófagos de cada subtipo exibiram um padrão diferente de localização. A região suprabasal do epitélio de revestimento oral mostrou uma expressão constante de 27E10, independentemente do estágio de inflamação. Em contrapartida, todas as camadas do epitélio sulcular na gengivite e das bolsas periodontais na periodontite foram fortemente positivas para 27E10, indicando ativação imunológica. O antígeno 25F9 foi expresso na camada basal do epitélio independente do estágio de inflamação, ao passo que RM3/1 foi constantemente negativo nos queratinócitos. O padrão de expressão desses marcadores de macrófagos funcionalmente diferentes indica variação na diferenciação e ativação, sugerindo a participação destas células na resposta imune local em infecções periodontais.

Pernu e Knuutila (2001) avaliaram se havia diferenças nas subpopulações de macrófagos e linfócitos no tecido conjuntivo de hiperplasia gengival associada a nifedipina e CsA humana. Biópsias gengivais foram obtidas de 9 pacientes tratados com nifedipina e de 13 pacientes transplantados renais tratados com ciclosporina, sendo que 9 deles também recebiam nifedipina. Trinta espécimes gengivais de indivíduos saudáveis foram usados como controle. As células foram avaliadas usando técnica imunoistoquímica. Em relação aos macrófagos, eles observaram que, em ambos grupos de medicamentos, as proporções de células CD68+ foram maiores do que no grupo controle. Para os autores, o aumento no número de células CD68 confirma um papel dos macrófagos na hiperplasia gengival induzida por drogas.

Nurmenniemi et al. (2002) estudaram subpopulações de macrófagos na hiperplasia gengival induzida por nifedipina e medicação imunossupressora. Biópsias gengivais foram obtidas de 11 pacientes tratados com nifedipina, 22 pacientes transplantados renais tratados com medicação tripla (azatioprina,

prednisolona e ciclosporina) e de 28 pacientes saudáveis. Foram analisados: 27E10 (macrófagos inflamatórios), 25F9 (macrófagos residentes) e RM3/1 (macrófagos reparativos). As células estudadas foram avaliadas em 3 áreas: tecido conjuntivo próximo ao epitélio oral, tecido conjuntivo próximo ao epitélio sulcular e região central do tecido conjuntivo. Grande quantidade de macrófagos 27E10+ no tecido conjuntivo foi encontrada em todos os grupos de medicamentos (nifedipina; drogas imunossupressoras e nifedipina; drogas imunossupressoras) quando comparados com o grupo controle, exceto no tecido conjuntivo próximo ao epitélio sulcular no grupo de drogas imunossupressoras. Neste local, a maior quantidade de células 27E10+ foi no grupo com imunossupressão quando comparado com o grupo controle e o grupo da nifedipina. Número de células RM3/1+ próximo ao epitélio oral foi significativamente maior no grupo de drogas imunossupressoras do que no grupo controle. Macrófagos 25F9+ foram menos encontrados próximo ao epitélio sulcular no grupo de imunossupressão e mais encontrados no centro do tecido conjuntivo no grupo nifedipina quando comparado com o controle. Para os autores, os resultados mostraram que a natureza da hiperplasia gengival induzida por drogas difere de alguma forma entre as medicações imunossupressoras e a nifedipina.

3 PROPOSIÇÃO

Comparar quantitativamente a expressão de células apresentadoras de antígenos na hiperplasia gengival induzida por ciclosporina (HGIC) de indivíduos transplantados renais com a expressão de células apresentadoras de antígenos em espécimes de gengivite (G) de indivíduos normorreativos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Análise imunoistoquímica foi realizada em 14 espécimes de tecido gengival oriundos de HGIC de pacientes transplantados renais (grupo de estudo) e em 28 espécimes de gengivite de pacientes sistemicamente saudáveis (grupo controle), obtidos do arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP. O diagnóstico, tanto dos espécimes do grupo de estudo quanto dos espécimes do grupo controle, foi obtido por exame histopatológico, através de lâminas coradas pela Hematoxilina & Eosina. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP (protocolo 144/04) (ANEXO A).

Imunoistoquímica

Antes do processamento dos espécimes, os mesmos foram fixados em formol 10% por um período de 24 a 48 horas.

A análise das CDs foi feita pela técnica imunoistoquímica da streptavidina-biotina, segundo metodologia usada no Laboratório de Imunoistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP e recomendações dos fabricantes. Os seguintes antígenos foram pesquisados: CD68 (macrófagos), CD1a (células de Langerhans), FXIIIA (CDs intersticiais). A diluição de cada anticorpo primário, clone, células marcadas e fabricantes estão mencionados na Tabela 4.1.

As amostras, fixadas em formol a 10% e emblocadas em parafina, foram submetidas a cortes de 3µm e estes estendidos em lâminas de vidro previamente

limpas e desengorduradas, preparadas com uma solução de 3-aminotrietoxisilano (50ml) (Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA) e álcool absoluto (250ml), e permaneceram em estufa por um período de 24 horas.

Após a desparafinização em xilol à 60° C por 30 minutos e xilol à temperatura ambiente por 20 minutos, os cortes passaram por hidratação em cadeia descendente de etanol, a partir de 3 passagens em etanol absoluto, seguido por etanol 95%, 85%, 80%, durante 5 minutos cada. Com o objetivo de se retirar o pigmento formólico, os cortes foram submetidos à solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol 95% durante 10 minutos. Logo após, os preparados foram lavados em água corrente por 10 minutos e depois em duas passagens de água destilada.

Para receberem o anticorpo primário, a fim de que fosse feita a identificação do antígeno CD1a, as lâminas preparadas submeteram-se a um tratamento com ácido cítrico 10mM (pH 6) em banho-maria a 96.5°C por 30 minutos. Para o CD68, o tratamento foi realizado com ácido cítrico 10mM (pH 6) em microondas por 10 minutos. O FXIIIa não necessitou de tratamento, segundo instruções do próprio fabricante.

Em seguida, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena tecidual, por meio de duas passagens de 15 minutos cada em solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes com metanol (1:1). A partir de então, todos os procedimentos foram precedidos de lavagens em tampão TRIS pH 7.4 (Tris-hidroxi-metilaminometano, Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA).

Após a lavagem em TRIS, todos os procedimentos foram realizados em máquina (Dakoautostainer Universal staining system, DAKO). Para os anticorpos secundário e terciário, foi utilizado Kit Dako LSAB[®] + System. HRP (Dako Corporation, Carpinteria, CA93013 USA). A diaminobenzidina (D.A.B., DAKO) foi o

cromógeno de escolha. As lâminas foram contra-coloradas com Hematoxilina de Mayer.

Depois de retirada as lâminas da máquina, os cortes foram desidratados em cadeia crescente de etanol, diafanizados em xilol e montados em resina Permount® (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Para o controle negativo, algumas lâminas foram processadas sem o anticorpo primário. Controles internos foram usados como controle positivo para os anticorpos estudados.

As células positivas para cada anticorpo de cada espécime foram contadas por observador previamente calibrado, em microscópio ótico de luz, com auxílio de retículo de contagem quadriculado ($0,25 \text{ mm}^2$) a fim de se evitar a recontagem das células. As células consideradas CD1a+ e FIIIA+ foram àquelas marcadas pelo cromógeno que apresentaram corpos celulares com núcleo mostrando um ou mais prolongamentos citoplasmáticos, com aumento de 400X (SÉGUIER, GODEAU, BROUSSE, 2000a). As células CD68+ foram aquelas que apresentaram sua membrana citoplasmática marcada pelo cromógeno. Em aumento de 40X, cada campo histológico foi digitalizado por uma placa de aquisição de imagem chamada de Captivator e transferido para o software ImageLab 2000, no qual mensuramos a área em mm^2 . A quantidade de células marcadas foi então, mensurada por mm^2 (n° células/ mm^2).

As células positivas foram contadas em três regiões do tecido gengival: epitélio de revestimento bucal (ERB), epitélio sulcular (ES) e tecido conjuntivo (TC) (Figura 4.1). Para o anticorpo anti-FXIIIA, as regiões ERB e ES não foram incluídas na contagem, uma vez que as células FXIIIA+ não são encontradas nessas

localizações. Vale ressaltar que toda a extensão de todos os cortes histológicos foi contada.

Diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente através do teste de ANOVA comparando a média de células/mm². Significância estatística foi definida quando $p < 0,05$.

Tabela 4.1 - Anticorpos primários utilizados nos experimentos

Clone	Anticorpo	Células Marcadas	Diluição	Fabricante
KP1	CD68	Macrófagos	1/500	DAKO
010	CD1a	Células Langerhans	1/100	DAKO
Ab-1	FXIIIa	CDs intersticiais	1/500	Neo Markers

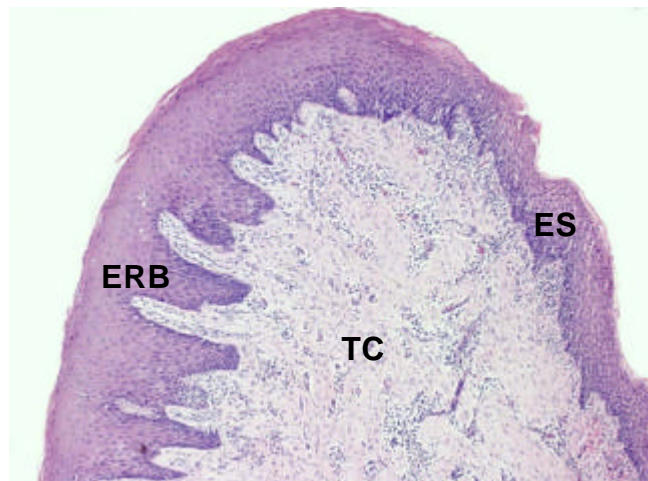


Figura 4.1 – Regiões do tecido gengival estudado: epitélio de revestimento bucal (ERB), epitélio sulcular (ES), tecido conjuntivo (TC)

5 RESULTADOS

O número de células CD68+/mm² foi significativamente maior na hiperplasia gengival quando comparado com a gengivite tanto no epitélio de revestimento bucal (1.3917 na HGIC e 0.6352 na G) quanto no tecido conjuntivo (15.7183 na HGIC e 13.6589 na G). As contagens de cada caso estudado estão expostas nos Anexos B, C e D. Não foi possível estabelecer uma correlação entre gengivite e hiperplasia gengival para células CD68+ no epitélio sulcular (Figura 5.1:b, c, e, f) (Gráfico 5.1).

O número de células FXIIIA+/mm² foi significativamente maior na hiperplasia gengival (37.734) quando comparado com a gengivite (13.6589) no tecido conjuntivo (Figura 5.1: h, i) (Gráfico 5.2).

O número de células CD1a+/mm² foi significativamente maior na gengivite quando comparado com a hiperplasia gengival nas três regiões estudadas: epitélio de revestimento bucal (7.0343 na G e 4.3336 na HGIC), epitélio sulcular (7.0493 na G e 2.3121 na HGIC) e tecido conjuntivo (9.2000 na G e 1.6820 na HGIC) (Figura 5.2: a, b, c, d, e, f) (Gráfico 5.3).

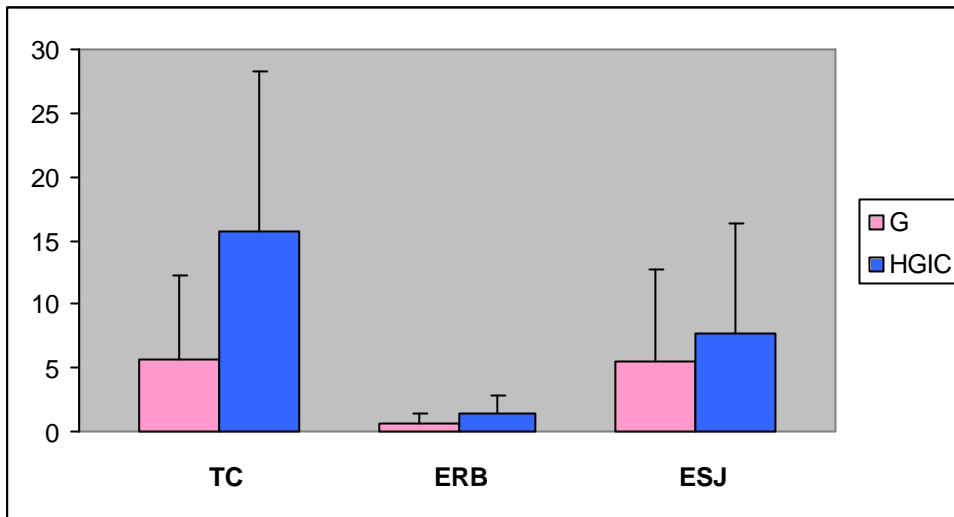


Gráfico 5.1 - Número médio de células CD68+ presentes na gengivite e na hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina nas três regiões estudadas e desvio padrão

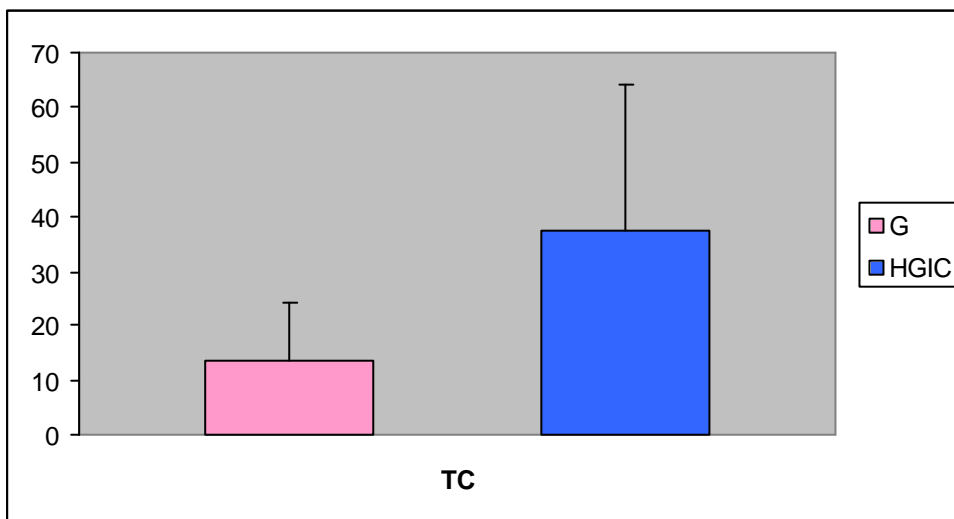


Gráfico 5.2 - Número médio de células FXIIIa+ presentes na gengivite e na hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina no tecido conjuntivo e desvio padrão

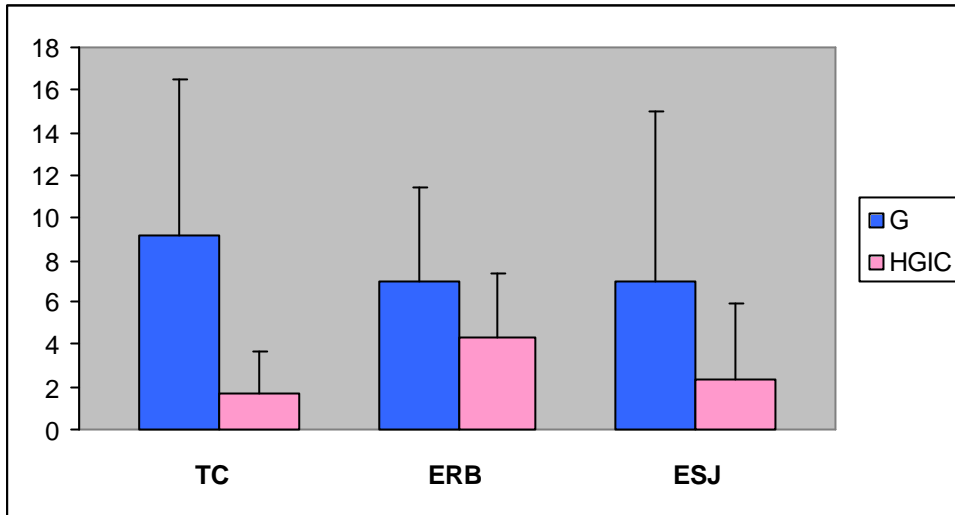


Gráfico 5.3 - Número médio de células CD1a+ presentes na gengivite e na hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina nas três regiões estudadas e desvio padrão

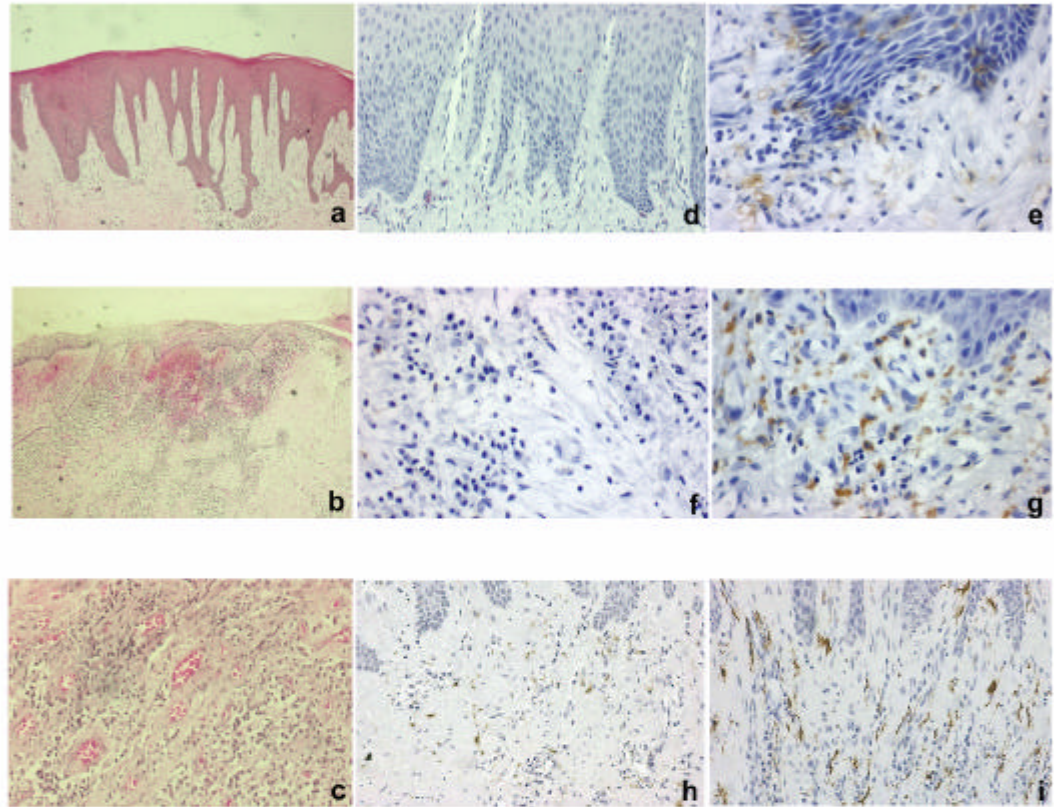


Figura 5.3: Regiões histológicas estudadas, células CD68+ e FXIII+ na HGIC e na G.

a – Aspecto histológico do epitélio de revestimento oral de uma hiperplasia gengival medicamentosa (corado pela hematoxilina e eosina).

b – Aspecto histológico de epitélio sulcular (corado pela hematoxilina e eosina).

c - Aspecto histológico de tecido conjuntivo (corado pela hematoxilina e eosina).

d - Células CD68+ no epitélio de revestimento oral de gengivite.

e – Células CD68+ no epitélio de revestimento oral de hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina.

f - Células CD68+ no tecido conjuntivo de gengivite.

g - Células CD68+ no tecido conjuntivo de hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina.

h – Células FXIII+ no tecido conjuntivo de gengivite.

i - Células FXIII+ no tecido conjuntivo de hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina.

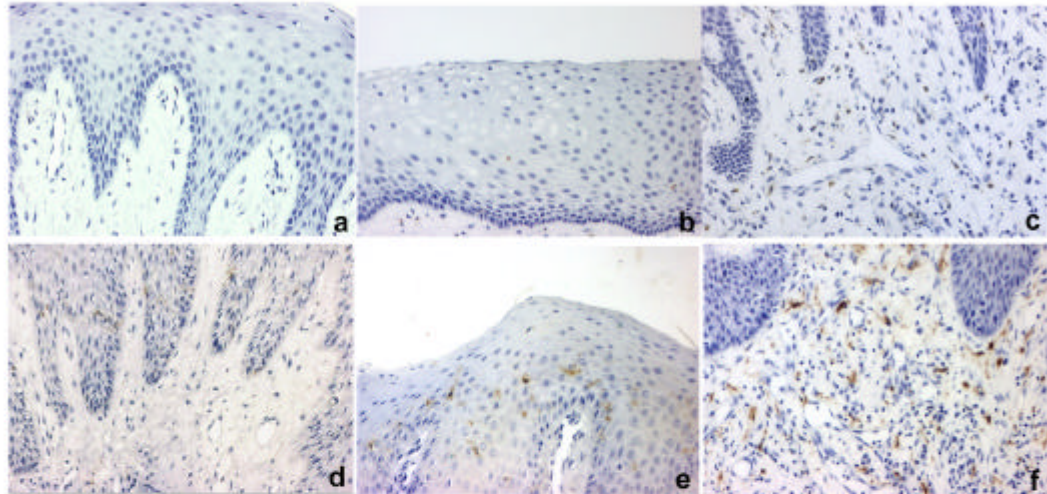


Figura 5.2 Células CD1a+ na HGIC e na G nas três regiões estudadas.

- a - Ausência de células CD1a+ no epitélio de revestimento bucal da HGIC;
- b - Ausência de células CD1a+ no epitélio sulcular da HGIC;
- c - Escassa quantidade de células CD1a+ no tecido conjuntivo da HGIC;
- d - Grande quantidade de células CD1a+ no epitélio de revestimento bucal da G;
- e - Grande quantidade de células CD1a+ no epitélio sulcular da G;
- f - Grande quantidade de células CD1a+ no tecido conjuntivo da G.

6 DISCUSSÃO

De modo geral, o presente estudo evidenciou alterações quantitativas de células apresentadoras de antígenos na hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina (HGIC) quando comparada com a gengivite de pacientes saudáveis, em todas as regiões estudadas. Estes achados mostram que a ciclosporina interfere na expressão de células apresentadoras de antígenos, o que nos leva a inferir que a resposta imunológica no tecido gengival de indivíduos transplantados é alterada pela ciclosporina.

CD1a+ é um marcador de células de Langerhans, caracterizado pela expressão de grânulos de Birbeck. O número de CDs CD1a+/mm² foi significativamente maior na gengivite de pacientes saudáveis quando comparado com a hiperplasia gengival de pacientes transplantados tanto no epitélio de revestimento oral, quanto no epitélio sulcular e no tecido conjuntivo.

Nurmenniemi, Pernu e Knuutila (1999) estudaram a densidade de células de Langerhans CD1a+ em gengiva humana normal e na hiperplasia gengival induzida por nifedipina e por medicação imunossupressora, encontrando resultados bastante semelhantes aos nossos. A expressão de células CD1a+ foi significativamente menor nos grupos medicados do que no grupo controle em todas as regiões epiteliais estudadas e no tecido conjuntivo próximo ao epitélio sulcular. A grande importância desses resultados está no fato de termos observarmos em espécimes gengivais o que Furue e Katz (1988) demonstraram em cultura de células de camundongos: ciclosporina inibe proliferação de células de Langerhans e prejudica a sua função.

Essa diminuição no número de células de Langerhans parece não ocorrer na hiperplasia gengival medicamentosa induzida pela fenitoína, como o observado em estudo realizado por Kinane, Drumond e Chisholm (1990). Comparando o número de células de Langerhans presente na hiperplasia gengival induzida pela fenitoína com a gengivite crônica de pacientes saudáveis, houve um marcante aumento nos espécimes de hiperplasia gengival. Os achados sugeriram que o número de células de Langerhans é elevado na gengivite crônica e na hiperplasia gengival induzida pela fenitoína, em decorrência do acúmulo de placa bacteriana e, principalmente, pelo fato do paciente não ser imunossuprimido nesses casos. Essas diferenças de achados entre estudos de tipos diferentes de hiperplasias gengivais medicamentosas se devem ao fato de os mecanismos pelos quais cada droga atua serem diferentes.

Em contrapartida, quando comparamos os nossos resultados com os resultados encontrados em outro grupo de indivíduos imunossuprimidos, os indivíduos HIV+, os quais apresentam grande suscetibilidade a periodontite crônica, encontramos similaridades. Myint, Yuan e Schenck (2000) observaram no epitélio gengival oral na periodontite crônica de pacientes HIV+ uma diminuição no número e no padrão de distribuição de células de Langerhans quando comparados com indivíduos HIV-. Considerando que pacientes HIV+ se tornam cada vez mais suscetíveis à periodontite crônica conforme a infecção pelo HIV prossegue, para os autores, os resultados deste estudo sugerem que o tecido gengival pode também ser afetado pela baixa da imunidade desses pacientes.

Células FXIII^{A+} representam CDs intersticiais. No presente estudo, o número de células FXIII^{A+} foi significativamente maior no grupo de hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina. Também tem sido demonstrado que células que contêm

FXIIIa estão aumentadas em lesões fibrosas, como na hiperplasia gengival dilatínica, fibromas, displasia óssea fibrosa (TOIDA et al., 1989). Os achados obtidos no presente estudo sugerem que células contendo FXIIIa apresentam importante papel no processo de fibrose da hiperplasia gengival. Esta hipótese é sustentada por Mosher, Schad e Kleinman (1979) que mostraram que a fibronectina e o colágeno servem de substrato para o FXIIIa, sugerindo um provável papel na organização do tecido conjuntivo e, conseqüentemente, no processo de fibrose desses tecidos. O que não se sabe, é se essa grande quantidade de células FXIIIa+ presente na hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina e nas outras fibromatoses representa um fator causal no desenvolvimento da hiperplasia ou se é apenas uma conseqüência natural após a hiperplasia do tecido. Nosso estudo não foi capaz de esclarecer essa questão.

Macrófagos são considerados os principais mediadores da renovação, manutenção e reparo do tecido conjuntivo (NURMENIEMI et al., 2002). Foram estatisticamente mais prevalentes no tecido conjuntivo e no epitélio de revestimento oral de pacientes transplantados que no tecido conjuntivo e no epitélio de revestimento oral de pacientes saudáveis. Este resultado está de acordo com Pernu; Knuutila (2001) que avaliaram se havia diferenças nas subpopulações de macrófagos e linfócitos no tecido conjuntivo de hiperplasia gengival induzida pela nifedipina e pela CsA. Com relação aos macrófagos, eles observaram que em ambos grupos medicados, a proporção de células CD68+ foi maior que a proporção de células no grupo controle. Para os autores, o aumento de células CD68 sustenta um papel dos macrófagos na indução da hiperplasia gengival induzida por drogas.

Basicamente, existem três subpopulações de macrófagos: macrófagos inflamatórios, residentes e reparativos. Segundo Pernu e Knuutila (2001) o aumento

no número de células CD68+ na gengiva especialmente próximo ao epitélio de revestimento oral sugere que a população de células seja formada por macrófagos reparativos e não por macrófagos inflamatórios. Para Schlegel Gomez et al. (1995) se células CD68+ fossem macrófagos inflamatórios/exsudativos, as células marcadas deveriam estar aumentadas próximo ao epitélio sulcular, o que não foi observado em nosso estudo.

Manca, Kunkl e Celada (1985) observaram inibição da função acessória de macrófagos *in vitro* pela ciclosporina. Inicialmente, adicionaram à cultura de macrófagos, CsA. Após, células T foram introduzidas. Foi observada uma redução na proliferação de células T em 5% e, conseqüentemente, a produção de interleucina-2 foi prejudicada. Os autores concluíram que a inibição induzida pela CsA nas funções de células T (proliferação e produção de IL-2) seja parcialmente devido ao efeito da droga nas funções acessórias dos macrófagos.

Palay et al. (1986) avaliaram *in vitro* a influência da ciclosporina na ativação de células T pelos macrófagos. A ativação de células T por antígenos derivados da *Listeria monocytogenes* foi monitorada através da produção de IL-2. Quando CsA foi adicionada na cultura de macrófagos, foi observada uma população celular com capacidade marcadamente diminuída de ativar linfócitos T. Contudo, não observaram diminuição na quantidade de macrófagos.

Topoll et al. (1989) investigaram se macrófagos funcionalmente diferentes estavam presentes na gengiva clinicamente saudável e durante gengivite experimental. Oito homens foram introduzidos em um programa de higiene oral até que todos apresentaram índice de placa e índice gengival igual a zero. Durante os 19 dias subseqüentes, a higiene oral foi abandonada. Índices clínicos foram mensurados e biópsias gengivais foram realizadas nos dias 0, 2, 4, 7, 11 e 14. Os

espécimes foram congelados e incubados com os seguintes anticorpos: 25F9 (macrófagos residentes), 27E10 (macrófagos inflamatórios) e RM 3/1 (macrófagos intermediários no tecido em cicatrização). Os macrófagos inflamatórios apresentaram uma redução significativa durante a fase de higiene oral e um significativo aumento durante a gengivite experimental. Uma vez que 27E10 representa um tipo de macrófago ativado, que é induzido por fatores ativadores de macrófagos (como LPS), o aparecimento deste subtipo reflete o influxo de macrófagos inflamatórios em resposta ao acúmulo de bactérias. Além disso, os autores acreditam que se este subtipo foi associado a altos valores de índice gengival, este macrófago pode ser o gatilho da resposta imune. Contudo, não pôde ser decidido se 27E10 atua como célula acessória pela indução de linfócitos T auxiliares ou como células efectoras por exercer efeitos citotóxicos nas bactérias. Com relação às células RM 3/1, houve um aumento significativo ao final da fase de higiene oral e uma diminuição durante a fase de gengivite experimental. Não houve diferenças no número de células 25F9+ durante todo o estudo. Os autores concluem que a inflamação gengival experimental é caracterizada pelo aparecimento e desaparecimento de subpopulações de macrófagos diferentes e que essas alterações podem estar associadas com lesões periodontais destrutivas.

Com relação à presença significativamente maior de macrófagos no tecido conjuntivo da hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina quando comparada com a gengivite de pacientes saudáveis, nossos achados estão de acordo com Nurmenniemi et al. (2002) que também encontraram maiores quantidades de macrófagos inflamatórios (27E10+) no tecido conjuntivo nos 3 grupos medicados estudados (nifedipina, tripla medicação com nifedipina e apenas tripla medicação) quando comparados com o grupo controle.

Na literatura, algumas pesquisas têm mostrado que pacientes transplantados usuários de drogas imunossupressoras apresentam maior risco de desenvolver infecções, uma vez que as drogas imunossupressoras utilizadas por estes indivíduos reduzem sua resposta imune. Na mucosa bucal, ou melhor, na hiperplasia gengival destes pacientes, não ocorre diferente. Tem-se mostrado a presença de infecções por algumas bactérias específicas e também por alguns vírus, como o CMV, EBV (AMMATUNA et al., 1998) em hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina (NOWZARI et al., 2003).

Nowzari et al. (2003) observaram a presença de CMV na saliva de 21% dos pacientes transplantados renais estudados e em 18% no fluido crevicular gengival. Os autores acreditam que pacientes transplantados renais com periodontite são pacientes de risco para replicação de CMV dentro das bolsas periodontais em decorrência da terapia imunossupressora.

Worm et al. (2004) observaram uma alta prevalência de infecção por *Chlamydia pneumoniae* em tecido de hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina em pacientes transplantados renais.

Esse achado de que pacientes transplantados usuários de drogas imunossupressoras apresentam maior tendência de desenvolver infecções, pode ser justificado, ao menos em parte, pelo presente estudo, onde encontramos alterações quantitativas na expressão de células apresentadoras de antígenos presentes na hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina quando comparada com a gengivite de indivíduos saudáveis. Além disso, nossos resultados nos permitem inferir que a maior quantidade de macrófagos encontrada nas HGIC pode representar um mecanismo compensatório à menor quantidade de células de Langerhans, uma vez

que o paciente transplantado é imunossuprimido e por essa razão mais susceptível a infecções, inclusive na gengiva.

Acreditamos que o fato de termos encontrado na hiperplasia gengival o que outros autores encontraram em estudos *in vitro* (MANCA; KUNKL; CELADA, 1985; PALAY ET AL., 1986; FURUE; KATZ, 1988; CHEN ET AL, 2004) trouxe um maior embasamento para que estudos futuros possam ser desenvolvidos, no intuito de trazer maiores esclarecimentos sobre o papel não só das células apresentadoras de antígenos, mas sim de todo sistema imunológico dos pacientes transplantados, além de maior esclarecimento sobre os efeitos que essas alterações imunes trazem para a vida desses indivíduos.

7 CONCLUSÕES

- 1) Os 3 tipos de células apresentadoras de antígenos estudados estão alterados na HGIC em relação à G;
- 2) A menor expressão de células de Langerhans nas 3 regiões do tecido gengival estudado na HGIC é coerente com a ação imunossupressora direta da ciclosporina sobre estas células;
- 3) A fibromatose observada nas hiperplasias gengivais induzidas por ciclosporina está relacionada com o aumento de células dendríticas intersticiais;
- 4) O aumento dos macrófagos na HGIC sugere a existência de um mecanismo compensatório, para a resposta imunológica tecidual dos indivíduos imunossuprimidos por ciclosporina.

REFERÊNCIAS¹

Afonso M, Bello V, Soares J. Crescimento gengival em pacientes transplantados renais sob terapia com Ciclosporina A. Relato de um caso clínico. Disponível em: <http://www.ibemol.com.br/ciodf2001/349.asp> [2005 set.25].

Al-Darmaki S, Schenkein HA, Tew JG, Barbour SE. Differential expression of platelet-activating factor acetylhydrolase in macrophages and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2003;170:167-73.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811. Review.

Barrett AW, Cruchley AT, Williams DM. Oral mucosal Langerhans' cells. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996;7:36-58.

Beveridge T, Grantwohl A, Michot F. Cyclosporin A: pharmacokinetics after a single dose in man and serum levels after multiple dosing in recipients of allogeneic bone-marrow grafts. *Curr Ther Res* 1981;30:5-18.

1

Busque S, Demers P, Saint-Louis G, Boily JG, Tousignant J, Lemieux F, Martin G, Smeesters C, Corman J, Daloz P. Hypertrichosis and gingival hypertrophy regression in renal transplants following the substitution of cyclosporin by tacrolimus. *Ann Chir* 1999;53:687-9.

¹ De acordo com Estilo Vancouver – Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. Nature 1992;360:258-61.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cells pathways in response to GM-CSF+TNF α : bifunctional analysis. Blood 1997;90:1458-70.

Cerio R, Spaul J, Oliver G, Wilson-Jones E. A study of factor XIIIa and MAC 387 immunolabeling in normal and pathological skin. Am J Dermatopathol 1990;12:221-33.

Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC. Differentiation of human dendritic cells from monocytes *in vitro*. Eur J Immunol 1997;27:431-41.

Chen T, Guo J, Yang M, Han C, Zhang M, Chen W, et al. Cyclosporin A impairs dendritic migration by regulating chemokine expression and inhibiting cyclooxygenase-2 expression. Blood 2004;103:413-21.

Cutler CW, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. Periodontol 2000 2004;35:135-57.

Dereka XE, Tosios KI, Chrysomali E, Angelopoulou E. Factor XIIIa+ dendritic cells and S-100 protein+ Langerhans' cells in adult periodontitis. J Periodontal Res 2004;39:447-52.

Ferguson RM, Fidelus-Gort. The immunosuppressive action of cyclosporine in man. Transpl Proceedings 1983;15:2350-6.

Furie M, Katz S. The effect of cyclosporine on epidermal cells. J Immunol 1988;140:4139-43.

Harikrishnan P, Harden PN. Tacrolimus can resolve cyclosporine-induced gingival hyperplasia. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1805-6.

Headington JT, Cerio R. Dendritic cells and the dermis: 1990. *Am J Dermatopathol* 1990;12:217-20.

Hesselink DA, Vaessen LMB, Hop WCJ, Schoordijk W, Ilzermans JNM, Baan CC, et al. The effects of renal transplantation on circulating dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2005;140:384-93.

Janeway Jr CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5th ed. New York; 2001.

Kohnle M, Lutkes P, Zimmermann U, Philipp T, Heemann U. Conversion from cyclosporine to tacrolimus in renal transplant recipients with gum hyperplasia. *Transplant Proc* 1999;31:44S-5S.

Kinane DF, Drummond JR, Chisholm DM. Langerhans cells in human chronic gingivitis and phenytoin-induced gingival hyperplasia. *Arch Oral Biol* 1990;35:561-4.

Knight SC, Balfour B, O'Brien J, Buttifant L. Sensitivity of veiled (dendritic) cells to cyclosporine. *Transplantation* 1986;41:96-100.

Lappin MB, Kimber I, Norval M. The role of dendritic cells in cutaneous immunity. *Arch Dermatol Res*. 1996;288:109-21. Review.

Manca F, Kunkl A, Celada F. Inhibition of the accessory function of murine macrophages in vitro by cyclosporine. *Transplantation* 1985;39:644-9.

Margiotta V, Pizzo I, Pizzo G, Barbaro A. Cyclosporin-and nifedipine-induced gingival overgrowth in renal transplant patients: correlations with periodontal and pharmacological parameters, and HLA-antigens. *J Oral Pathol Med* 1996;25:128-34.

Mariani G, Calastrini C, Aleotti A, Carnevale E, Stabellini G. Ultrastructural changes in Langerhans cells in gingival overgrowth in cyclosporin A-treated renal transplant patients. *Pathology* 2004;36: 242-6.

Marshall RI, Bartold PM. Medication-induced gingival overgrowth. *Oral Dis* 1998;4:130-51.

McGaw WT, Lam S, Coates J. Cyclosporine -induced gingival overgrowth: correlation with dental plaque scores, gingivitis scores, and cyclosporine levels in serum and saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987;64:293-7.

Myint M, Yuan ZN, Schenck K. Reduced number of Langerhans cells and increased HLA-DR expression in keratinocytes in the oral gingival epithelium of HIV -infected patients with periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;27:513-19.

Mosher DF, Schad PE, Kleinman HK. Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation factor XIIIa. *J Clin Invest* 1979;64:781-7.

Neutra MR. Current concepts in mucosal immunity. V Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. *Am J Physiol* 1998;274:G785-91.

Newcomb GM, Powell RN. The ultrastructure of human gingival Langerhans cells in health and disease. *Arch Oral Biol* 1986;31:727-34.

Nowazari H, Jorgensen MG, Aswad S, Khan N, Osorio E, Safarian A, et al. Human cytomegalovirus-associated in renal transplant patients. *Transplant Proc* 2003;35:2949-52.

Nurmenniemi PK, Pernu HE, Knuutila MLE. Density of CD1a-labeled Langerhans' cells in normal human gingiva and in nifedipine- and immunosuppressive medication-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 1999; 70:752-6.

Nurmenniemi PK, Pernu HE, Laukkanen P, Knuutila ML. Macrophage subpopulations in gingival overgrowth induced by nifedipine and immunosuppressive medication. *J Periodontol* 2002;73:1323-30.

O'Valle F, Mesa FL, Gómez-Morales M, Aguilar D, Caracuel MD, Medina-Cano MT, et al. Immunohistochemical study of 30 cases of cyclosporin A-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 1994;65:724-30.

Palay DA, Cluff CW, Wentworth PA, Ziegler HK. Cyclosporine inhibits macrophage-mediated antigen presentation. *J Immunol* 1986;136:4348-53.

Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol*. 1998;160:4587-95.

Pernu HE, Knuutila ML. Macrophages and lymphocyte subpopulations in nifedipine – and cyclosporine A-associated human gingival overgrowth. *J Periodontol* 2001;72:160-6.

Peters JH, Gieseler R, Thiele B, Steinbach F. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today* 1996;17:273-8.

Ramalho VLC, Ramalho HJ, Cipullo JP, Burdmann EA. Hiperplasia gingival induzida por ciclosporina A. *Rev Assoc Med Bras* 2003;49:210-3.

Regezi JA, Nickoloff BJ, Headington JT. Oral submucosal dendrocytes: factor XIIIa+ and CD34+ dendritic cell populations in normal tissue and fibrovascular lesions. *J Cutan Pathol* 1992;19:398-406.

Regezi JA, Daniels TE, Saeb F, Nickoloff BJ. Increased submucosal factor XIIIa-positive dendrocytes in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1994;23:114-8.

Romani N, Schuler G. The immunologic properties of epidermal Langerhans cells as a part of the dendritic cell system. *Springer Semin Immunopathol* 1992;13:265-79.

Schlegel Gomez R, Langer P, Pelka M, von den Driesch P, Johannessen AC, Simon Jr M. Variational expression of functionally different macrophage markers (27E10, 25F9, RM3/1) in normal gingiva and inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1995;22:341-6.

Séguier S, Godeau G, Brousse N. Immunohistological and morphometric analysis of intra-epithelial lymphocytes and Langerhans cells in healthy and diseased human gingival tissues. *Arch Oral Biol* 2000a;45:441-52.

Séguier S, Godeau G, Leborgne M, Pivert G, Brousse N. Quantitative morphological analysis of Langerhans cells in healthy and diseased human gingiva. *Arch Oral Biol* 2000b;45:1073-81.

Seymour RA, Smith DG, Rogers SR. The comparative effects of azathioprine and cyclosporine on some gingival health parameters of renal transplant patients. *J Clin Periodontol* 1987;14:610-3.

Seymour RA, Smith DG. The effect of a plaque control program on the incidence and severity of cyclosporine-induced gingival changes. *J Clin Periodontol* 1991;18:107-10.

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

Teunissen MBM, de Jager MH, Kapsenberg ML, Bos JD. Inhibitory effect of cyclosporin A on antigen and alloantigen presenting capacity of human epidermal Langerhans cells. *Br J Dermatol* 1991;125:309-16.

Thomson AW, Webster LM. The influence of cyclosporine A on cell-mediated immunity. *Clin Exp Immunol* 1988;71:369-76.

Toida M, Watanabe F, Tsai C, Okutomi T, Tatematsu N, Oka N. Factor XIIIa-containing cells and fibrosis in oral and maxillofacial lesions: an immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989;68:293-9.

Topoll HH, Zwadlo G, Lange DE, Sorg G. Phenotypic dynamics of macrophage subpopulations during human experimental gingivitis. *J Periodont Res* 1989;24:106-12.

Wilkinson PC, Higgins A. Cyclosporin A inhibits mitogen-activated but not phorbol ester-activated locomotion of human lymphocytes. *Immunology*. 1987;61:311-6.

Womer KL, Peng R, Patton PR, Murawski MR, Bucci M, Kaleem A, et al. The effects of renal transplantation on peripheral blood dendritic cells. *Clin Transplant* 2005;19:659-67.

Worm HC, Wirnsberger GH, Mauric A, Holzer H. High prevalence of *Chlamydia pneumoniae* infection in cyclosporine A-induced post-transplant gingival overgrowth tissue and evidence for the possibility of persistent infection despite short-term treatment with azithromycin. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1890-4.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 144/04

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Análise comparativa da expressão de células dendríticas no periodonto de pacientes transplantados e sistemicamente saudáveis**", de responsabilidade da Pesquisadora **Juliana Yuri Kawamura**, sob orientação da Profa. Dra. **Marina Helena C.G. Magalhães**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 01 de setembro de 2004

Profª Drª **ROSÁ HELENA MIRANDA GRANDE**
Coordenadora do CEP-FOUSP

ANEXO B - Número de células CD1A+/mm² na gengivite e na HGIC nas 3 regiões estudadas

EO		ES		TC	
Gengivite	HGIC	Gengivite	HGIC	Gengivite	HGIC
11.56	9.27	2.56	0.57	6.5	0.068
5.31	4.15	2.17	6.11	4.56	0.71
12.38	5.59	5.45	0.86	29.68	2.96
4.34	5.02	0	3.59	10.59	2.18
13.59	2.63	9.25	0	7.78	2.11
9.86	6.36	15.51	0	6.43	1.66
3.4	4.86	7.63	5.46	7.35	7.66
3.5	0.45	22.57	0.85	6.97	1.75
5.34	1.33	0.85	0.35	3.61	0.55
4.65	2.99	1.84	0	3.1	0.16
8.45	1.28	12.31	1.44	2.43	0.67
6.37	3.12	0.98	0	5.23	0.3
2.94	2.5	22.09	0.62	5.59	0.84
1.22	11.12	1.68	12.520	0.67	1.93
7.95		0		3.3	
15.18		27.56		21.35	
3.04		1.8		6.54	
5.27		2.43		21.31	
7.66		12.18		23.38	
2.08		0.65		5.71	
15.43		2.99		9.64	
4.23		0.96		7.39	
14.28		3.87		7.6	
12.12		12.45		18.01	
3.19		18.97		5.9	
1.85		0		1.97	
3.57		8.63		9.41	
8.2		0		15.6	

Anexo C - Número de células FXIII^{A+}/mm² na gengivite e na HGIC no tecido conjuntivo.

Gengivite	HGIC
13.2	13.3
25.9	63.3
6.72	39.9
23.9	12.01
6.4	33.7
41.6	31.5
6.61	41.8
23.1	18.3
14.6	7.3
10.7	16.3
6.2	44.3
29.5	55.8
14.1	52.5
19.9	25.5
9.89	110.57
26.8	
21.2	
19.1	
10.7	
8.03	
1.85	
1.07	
3.04	
17.1	
3.64	
2.02	
1.92	