

VANESSA NASCIMENTO PIMENTEL

**LÍQUEN PLANO ORAL E DOENÇA DO ENXERTO
CONTRA O HOSPEDEIRO CRÔNICA DA MUCOSA ORAL:
análise histológica e imuno-histoquímica**

CAMPINAS

Unicamp

2010

VANESSA NASCIMENTO PIMENTEL

**LÍQUEN PLANO ORAL E DOENÇA DO ENXERTO
CONTRA O HOSPEDEIRO CRÔNICA DA MUCOSA ORAL:
análise histológica e imuno-histoquímica**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração Anatomia Patológica

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA LETÍCIA CINTRA

CAMPINAS

Unicamp

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

P649I	<p>Pimentel, Vanessa Nascimento Líquen plano oral e doença do enxerto contra o hospedeiro crônica da mucosa oral: análise histológica e imuno-histoquímica / Vanessa Nascimento Pimentel. Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Maria Letícia Cintra Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p style="text-align: center;">1. Apoptose. 2. Citotoxicidade. 3. Medula óssea - transplante. I. Cintra, Maria Letícia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
-------	---

Título em inglês: Oral lichen planus and oral chronic graft-versus-host disease: histological and immunohistochemical analysis

Keywords:

- Apoptosis
- Cytotoxicity
- Bone marrow, transplantation

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Área de concentração: Anatomia Patológica

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Letícia Cintra

Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Furuse

Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

Data da defesa: 17-03-2010

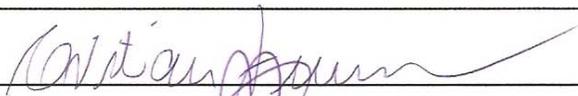
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Vanessa Nascimento Pimentel

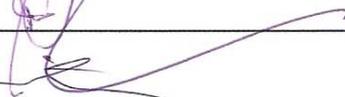
Orientadora: Profa. Dra. Maria Leticia Cintra

Membros:

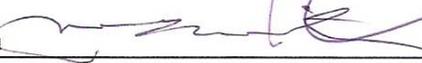
1. **Profa. Dra. Cristiane Furuse**



2. **Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho**



3. **Profa. Dra. Maria Leticia Cintra**



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17/03/2010

DEDICATÓRIA

*A Deus,
que abençoa a minha vida e
me dá forças para
concretizar os meus sonhos;*

*À minha família,
alicerce da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Maria Letícia Cintra, pela disposição, paciência e por todos os ensinamentos. Um verdadeiro exemplo de mestre dedicado e de pessoa generosa.

Aos meus pais, Mércia e Enoch, meus exemplos de vida, pelo amor, apoio e incentivo constantes.

Aos meus irmãos, Mirella e Enoch, por estarem sempre ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso.

Ao meu noivo, Gustavo, pelo amor, compreensão e incentivo em todos os momentos.

À Dra. Maria Elvira Pizzigatti Correa, pelo auxílio nos momentos necessários.

Ao Dr. Konradin Metze, pelo exemplo de entusiasmo com a ciência e pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Ao Dr. Randall Luis Adam, pelo auxílio com os programas de imagem.

A Lissa Sabino de Matos, pela ajuda na fase inicial do trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica, em especial, a Maria do Carmo, a Claudia Piazza e a Luzia Ribeiro, pela ajuda e paciência.

Ao Adilson Piazza, pelo auxílio com as fotografias.

Aos colegas da pós-graduação, em especial a Tânia e a Michelle, pela amizade e incessante ajuda.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão financeira que viabilizou a realização deste trabalho.



RESUMO

O líquen plano oral (LPO) e o acometimento oral da doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (DECHc) apresentam características clínicas e histológicas semelhantes, apesar da etiologia distinta. A apoptose, induzida por linfócitos T citotóxicos, tem sido proposta como o tipo de morte dos ceratinocitos, em ambas as doenças. A citotoxicidade celular é mediada, dentre outros mecanismos, por grânulos contendo granzima B e perforina. Poucos trabalhos foram desenvolvidos demonstrando o papel destas moléculas no líquen plano; dentre estes, alguns estudaram a interação das células que expressam estas moléculas com os demais componentes do infiltrado. Contudo, há raros estudos sobre este tema na DECHc. Considerando que as características em comum podem refletir similaridades nos mecanismos imunológicos, o objetivo do nosso estudo foi correlacionar os achados morfológicos e imuno-histoquímicos do LPO e da DECHc oral, na tentativa de compreender melhor a patogênese destas doenças. Foram analisadas 29 amostras de LPO e 27 de DECHc oral, coletadas no período de 1994 a 2007, de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas e na Unidade de Transplante de Medula Óssea da UNICAMP. Novos cortes foram corados por H&E e pela técnica imuno-histoquímica para CD4, CD8, MAC 387, ICAM-1, granzima B e perforina. O número de células CD4-positivas foi estatisticamente maior no LPO do que na DECHc ($p < 0,0001$), enquanto as médias totais (do epitélio + do tecido conjuntivo) de células positivas para granzima B e perforina foram maiores na DECHc que no LPO ($p < 0,05$). Foi observado também que, quanto maior o número de células perforina+, maior era o número de células granzima B+, tanto no epitélio como no tecido conjuntivo, nos dois grupos de doenças ($p < 0,05$). No LPO, o número de corpos apoptóticos isolados mostrou uma correlação positiva com a granzima B e negativa com a perforina do tecido conjuntivo ($p < 0,01$). Inversamente, nas lesões orais da DECHc, o número de corpos apoptóticos agrupados apresentou uma correlação positiva com a perforina do tecido conjuntivo. Não houve diferença entre o LPO e a DECHc oral com relação ao número de corpos apoptóticos (isolados ou agrupados), nem quanto à extensão da degeneração hidrópica da camada basal, e nem mesmo com relação ao número de células imunomarcadas para CD8, ICAM-1 e MAC 387.

Estes achados indicam que a apoptose, no LPO, parece correlacionar-se com a ação da granzima B, enquanto que, na DECHc oral, a perforina parece ser mais atuante. Embora o LPO e a DECHc oral apresentem similaridades clínicas e histológicas, parece haver diferenças na patogênese destas doenças. Os resultados encontrados podem ser úteis para aprimorar a compreensão dos mecanismos imunológicos, bem como podem embasar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o controle da apoptose e redução da morbidade associada a estas doenças.



ABSTRACT

Oral lesions in lichen planus (OLP) and chronic graft-*versus*-host disease (cGVHD) have similar clinical and histological features, but distinct etiology. Apoptosis induced by cytotoxic T lymphocyte has been proposed as the form of keratinocytes death. The cell cytotoxicity is mediated, among other mechanisms, by granules containing granzyme B and perforin. Few studies have been published showing the role of those molecules in lichen planus, as well as their relationship with other inflammatory infiltrate components. However, rare works were reported about this theme in cGVHD. Since common features can reflect similarities in immunological mechanisms, the purpose of our study was to correlate the morphological and immunohistochemical findings of OLP and cGVHD to better understand the pathogenesis of these diseases. We analyzed 29 samples of OLP and 27 of oral cGVHD collected in the period between 1994 and 2007, from patients treated at the University Hospital and Bone Marrow Transplant Unit of UNICAMP. Additional sections were obtained and stained for H&E and immunohistochemical technique targeting CD4, CD8, MAC 387, ICAM-1, perforin and granzyme B. The number of CD4-positive cells number was significantly higher in OLP than in cGVHD ($p < 0,0001$), while the total means (epithelium plus connective tissue number) of the granzyme B- and perforin-positive cells were significantly higher in cGVHD ($p < 0,05$). Also, it was found that the higher the number of perforin+ cells, the higher the number of granzyme-B + cells in the epithelium and in the connective tissue for both groups ($p < 0,05$). In OLP, the number of single apoptotic bodies had a positive correlation with connective tissue granzyme B immunostaining and a negative correlation with perforin ($p < 0,01$). On the contrary, in oral cGVHD, the number of apoptotic body clusters presented a positive correlation with connective tissue perforin ($p < 0,01$). Our findings indicate that apoptosis in OLP seems to be correlated with granzyme B release, while in oral cGVHD, perforin seems to be more important. There were no significant differences between OLP and cGVHD oral regarding the following features: the amount of apoptotic bodies (isolated o clusters), the extension of hydropic basal cell degeneration, and the number of positive cells for CD8, ICAM-1 and MAC-387. These results indicate that apoptosis, in OLP, seems to correlate with granzyme B release while, in oral

cGVHD, perforin is preponderant. Although OLP and oral cGVHD present clinical and histological similarities, differences seem to exist in the pathogenesis of these diseases. Our results might help to better understand the immunological mechanisms of these two conditions, as well as supporting the development of new therapeutic strategies for controlling apoptosis and reducing morbidity associated with them.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Anemia aplástica
APC	Antigen presenting cell
CEC	Carcinoma espinocelular
CLs	Células de Langerhans
DAB	Diaminobenzidina-HCl
DBx	Dia (pós transplante de medula óssea) da coleta da biopsia
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DECHa	Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda
DECHc	Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica
DHC	Doença hepática crônica
ELAM-1	Endothelial leukocyte adhesion molecule-1
Ext	Extensa
F	Feminino
Foxp3	Forkhead box p3
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
H&E	Hematoxilina & Eosina
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês <i>Human leucocyte antigen</i>)

HPN	Hemoglobinúria paroxística noturna
HSP	Heat shock protein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
LFA-1	Lymphocyte function - associated antigen 1
LLA	Leucemia linfóide aguda
LLC	Leucemia linfóide crônica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
Loc	Localizada
LP	Líquen plano
LPO	Líquen plano oral
LTCs	Linfócitos T citotóxicos
M	Masculino
MAC-1	Macrophage adhesion ligand-1
MHC	Major Histocompatibility Complex
MM	Mieloma múltiplo
MO	Medula óssea

MPM	Metaloproteinases da matriz
NK	Natural killer
r	Coeficiente de correlação (Pearson)
R²	Coeficiente de determinação corrigido (regressão linear múltipla)
OR	Odds ratio
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
SP	Sangue periférico
Th1	T helper 1
TMO	Transplante de medula óssea
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
VCAM-1	Vascular adhesion molecule-1
VHC	Vírus da hepatite C
VLA-4	Very late antigen-4

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Anticorpos primários, diluição e recuperação antigênica empregadas.....	84
Tabela 2 Células/mm ² positivas para os marcadores imuno-histoquímicos nas amostras de líquen plano oral e doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral.....	93
Tabela 3 Análise dos marcadores agrupados segundo a fase da lesão nos pacientes com líquen plano oral.....	98
Tabela 4 Análise dos marcadores agrupados segundo a fase da lesão nos pacientes com doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral.....	99
Tabela 5 Características clínicas e histológicas dos pacientes com líquen plano oral.....	135
Tabela 6 Características clínicas e histológicas dos pacientes com doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral.....	137

	Pág.
Figura 1 Líquen plano: acometimento oral (lesão erosiva sobre placa leucoceratósica na mucosa jugal) e ungueal (pterígio na lâmina ungueal do 2º quirodáctilo).....	46
Figura 2 Corte histológico de líquen plano oral (paciente 21): metaplasia cornificada do epitélio, com as camadas córnea e granulosa bem desenvolvidas, hipergranulose, acantose irregular, degeneração hidrópica da camada basal e infiltrado inflamatório mononuclear subepitelial intenso (H&E, aumento original x 100).....	48
Figura 3 Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral: estriações esbranquiçadas no assoalho da boca.....	59
Figura 4 Corte histológico de mucosa oral na doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral (paciente 5): infiltrado inflamatório na interface do epitélio com o tecido conjuntivo, com intensa agressão à camada basal e corpos eosinófilos apoptóticos (setas). No <i>inset</i> , corpo apoptótico com linfócito satélite, correspondente ao maior aumento da área delimitada pelo retângulo (H&E, aumento original x 100).....	60
Figura 5 Corte histológico de líquen plano oral (paciente 17) demonstrando as características de uma lesão em regressão: camada basal do epitélio recuperada, fibrose, neovascularização e incontinência pigmentar no tecido conjuntivo superficial (H&E, aumento original x 100).....	79

Figura 6	Corte histológico de doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral (paciente 12) com destaque para a presença de fenda na junção entre o epitélio e o tecido conjuntivo (seta) (H&E, aumento original x 100).....	80
Figura 7	Corte histológico de doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral (paciente 5): degeneração hidrópica em quase toda extensão da camada basal do epitélio, com corpos apoptóticos agrupados (seta), onde observa-se satelitose, ou isolados (cabeça de seta) (H&E, aumento original x 400).....	82
Figura 8	Corte histológico de doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral (paciente 26): corpos apoptóticos agrupados (seta) e isolados (cabeça de seta) (H&E, aumento original x 400).....	83
Figura 9	Reação imuno-histoquímica para CD8 em líquen plano oral (paciente 7). (A) observa-se uma área da imagem não preenchida pelo tecido. (B) segmentação da imagem, por meio do <i>Imagelab</i> , para o cálculo da área selecionada (em azul) (aumento original x 400).....	86
Figura 10	Reação imuno-histoquímica para CD4 em amostra de líquen plano oral (paciente 29) (A) e de doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral (paciente 17) (B) (aumento original x 400).....	90
Figura 11	Reação imuno-histoquímica para CD8 em amostra de líquen plano oral (paciente 1) (A) e de doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral (paciente 6) (B) (aumento original x 400).....	91

Figura 12	Reação imuno-histoquímica para ICAM-1 em amostra de líquen plano oral (paciente 28) (A) e de doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral (paciente 25) (B) (aumento original x 400).....	91
Figura 13	Reação imuno-histoquímica para MAC 387 em amostra de líquen plano oral (paciente 11) (A) e de doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral (paciente 21) (B) (aumento original x 400).....	92
Figura 14	Reação imuno-histoquímica para perforina em amostra de líquen plano oral (paciente 11) (A) e de doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral (paciente 25) (B) (aumento original x 400).....	94
Figura 15	Reação imuno-histoquímica para granzima B em amostra de líquen plano oral (paciente 29) (A) e de doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral (paciente 25) (B) (aumento original x 400).....	95

	Pág.
Gráfico 1 <i>Box plot</i> demonstrando células/mm ² imunomarcadas pela granzima B (esquerda) e perforina (direita) na espessura do epitélio, nas amostras de líquen plano oral e doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral (Teste t de Student, $p < 0.05$).....	94
Gráfico 2 Número de células perforina-positivas e granzima B-positivas no epitélio do líquen plano oral (esquerda) e da doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral (direita) (Coeficiente de Pearson, $p < 0,05$).....	96
Gráfico 3 Número de células perforina-positivas e granzima B-positivas no tecido conjuntivo do líquen plano oral (esquerda) e da doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral (direita) (Coeficiente de Pearson, $p < 0,05$).....	96

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1 Classificação clínica da doença do enxerto contra o hospedeiro crônica, segundo Shulman et al., 1980.....	129
Quadro 2 Graduação histológica da doença do enxerto contra o hospedeiro crônica da mucosa oral, de acordo com Horn et al., 1995.....	131

	Pág.
RESUMO	xi
ABSTRACT	xv
1- INTRODUÇÃO	43
1.1- Líquen plano oral	45
1.1.1- Aspectos clínicos e histológicos.....	45
1.1.2- Etiologia e patogênese.....	48
1.2- Doença do enxerto contra o hospedeiro	54
1.2.1- Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda.....	56
1.2.2- Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica.....	57
1.3- A resposta imunológica no LPO e na DECHc oral	61
1.3.1- O papel dos macrófagos.....	61
1.3.2- A transmigração celular.....	61
1.3.3- O papel da ICAM-I no LPO e na DECHc oral.....	63
1.3.4- Perforina e granzima B.....	64
a) A apoptose e o significado funcional da perforina e da granzima B.....	64
b) Granzima B: como se processa a liberação na sinapse imunológica..	65
c) O papel da granzima B e da perforina no LPO e na DECHc oral.....	67

1.4- Justificativa do trabalho.....	69
2- OBJETIVOS.....	71
2.1- Objetivo geral.....	73
2.2- Objetivos específicos.....	73
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	75
3.1- Seleção da amostra.....	77
3.1.1- Pacientes com LPO.....	77
3.1.2- Pacientes com DECH crônica oral.....	77
3.2- Avaliação histopatológica.....	78
3.3- Imuno-histoquímica.....	83
3.3.1- Quantificação imuno-histoquímica.....	85
3.4- Análise estatística.....	86
4- RESULTADOS.....	87
4.1- Dados clínicos e histológicos qualitativos.....	89
4.2- Dados histológicos semiquantitativos e quantitativos.....	89
4.3- Dados imuno-histoquímicos.....	90
5- DISCUSSÃO.....	101
6- CONCLUSÃO.....	111

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
8- ANEXOS.....	127
9- APÊNDICES.....	133



1- INTRODUÇÃO

O líquen plano oral (LPO) e o acometimento oral na doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (DECHc) são duas entidades de etiologias distintas, porém que compartilham características clínicas e histológicas semelhantes (1, 2). Apresentam-se como estomatite de interface (ou liquenóide). Apesar de serem reconhecidas, clinicamente, com relativa facilidade, ainda representam um desafio no manejo terapêutico (3).

1.1- Líquen plano oral

1.1.1- Aspectos clínicos e histológicos

O líquen plano (LP) é uma doença inflamatória frequente, que pode afetar a pele, os anexos e as mucosas. A prevalência é desconhecida, mas acredita-se que acometa de 0,5 a 1% da população (4). A lesão cutânea elementar clássica do LP é uma pápula poligonal achatada, pruriginosa, de cor levemente eritematosa a violácea, com rede reticulada ou pontilhada, branca, fina, conhecida como estrias de Wickham (5). As lesões têm distribuição geralmente simétrica e bilateral. Localizam-se, preferencialmente, na face flexora dos punhos, mas podem ser encontradas nos membros, no tronco, couro cabeludo, genitália, unhas e mucosas (4). A disposição das pápulas pode seguir o trajeto de escoriações ou outros traumatismos, tendendo a linearidade. Esta reprodução da dermatose, a partir de estímulos mecânicos, é conhecida como fenômeno de Koebner (6). O acometimento ungueal resulta em *pitting* (depressões puntiformes), formação de pterígio (Figura 1) e perda permanente da lâmina ungueal (7). O líquen plano pilar caracteriza-se por pápulas foliculares ceratósicas típicas, levando à alopecia (5).

O LPO pode se apresentar nas formas bolhosa, erosivo-ulcerativa, papulosa, atrófica, tipo placa e reticular. Algumas variantes podem ser identificadas em um mesmo paciente (Figura 1) (2, 5). Afeta de 1 a 2% da população adulta e é a doença mais comum nos ambulatórios especializados em

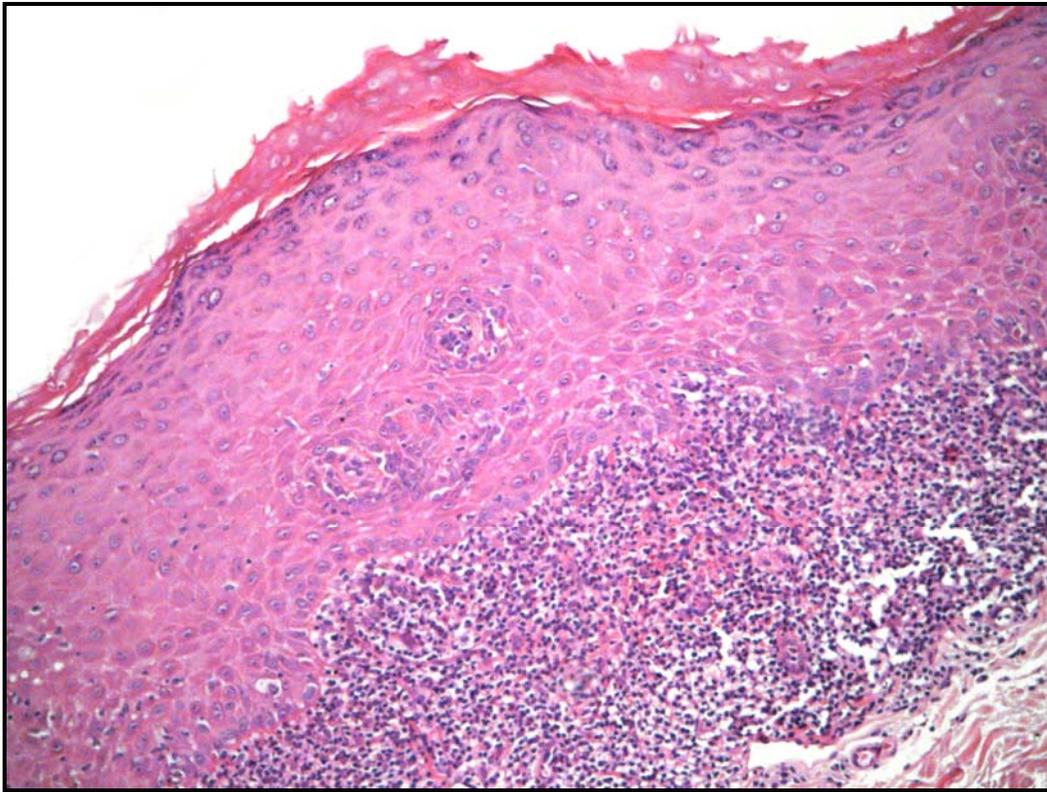
estomatologia (8). O acometimento oral ocorre em, aproximadamente, 60 a 70% dos pacientes com líquen plano, e esta pode ser a única manifestação da doença em 20 a 30% dos casos (5). Ocorre mais no sexo feminino, na proporção aproximada de 1,4 mulheres para 1 homem, e na faixa etária acima de 40 anos (7). O padrão reticular é considerado o mais comum, mas, nas clínicas de medicina oral, as formas erosivas predominam devido à sintomatologia e à cronicidade (5). Geralmente dor e sensação de queimação acompanham as lesões erosivas, atróficas ou bolhosas (2). As mucosas lingual, gengival e labial são as áreas mais frequentemente afetadas. O palato, assoalho da boca, coxins retromolares e lábios também podem ser acometidos. A lesão gengival pode tomar a forma de estomatite gengival ou gengivite descamativa (5). A mucosa de outros órgãos - genitália, faringe, laringe, esôfago, conjuntiva, estômago, cólon e bexiga - pode também abrigar a doença (4).



Figura 1- LP: acometimento oral (lesão erosiva sobre placa leucoqueratósica na mucosa jugal) e ungueal (pterígio na lâmina ungueal do 2º quirodáctilo).

Existe considerável controvérsia se o líquen plano oral tem potencial maligno inerente. Acredita-se que o risco de malignização seja baixo, porém alguns fatores poderiam aumentá-lo, como: doença de longa duração, forma atrófica ou erosiva e uso de tabaco. Descreve-se o desenvolvimento de CEC *in situ* ou invasor bem diferenciado em 0,5 a 5% dos pacientes com LPO no acompanhamento a longo prazo (5).

A histologia do LPO caracteriza-se por: infiltrado denso linfo-histiocitário subepitelial, maior número de linfócitos intra-epiteliais e degeneração liquefativa das células da camada basal associados à presença de corpos redondos e acidófilos (Figura 2). Estes corpos são denominados de colóides, hialinos, citóides ou de Civatte. Estudos ultraestruturais têm demonstrado que os corpos colóides são exemplos típicos de morte celular por apoptose (7, 2). Alterações na camada basal são comuns no LPO e incluem interrupções, ramificações e duplicações. Além disso, os elementos que ancoram o ceratinócito basal - hemidesmossomos, filamentos e fibrilas - estão defectivos, produzindo fraqueza na junção dermoepidérmica. A representação histológica e clínica deste fenômeno são, respectivamente, as fendas na interface e as bolhas na mucosa oral (líquen plano bolhoso). Paraceratose, acantose e cristas epidérmicas em “dentes de serra” podem ser encontradas. Linfócitos B e plasmócitos são infrequentes no LPO, e depósitos de imunoglobulinas ou complemento não são característicos. Alguns casos mostram depósitos de fibrinogênio e fibrina de padrão linear na zona da membrana basal. Corpos colóides podem ser positivos para fibrina, IgM, C3, C4 e ceratina. Colorações negativas para laminina e fibronectina nas áreas de maior depósito de fibrina e dos corpos colóides sugerem agressão da membrana basal. Os achados de imunofluorescência no LPO não são diagnósticos (7).



(H&E, aumento original x 100)

Figura 2- Corte histológico de LPO (paciente 21): metaplasia cornificada do epitélio, com as camadas córnea e granulosa bem desenvolvidas, hipergranulose, acantose irregular, degeneração hidrópica da camada basal e infiltrado inflamatório mononuclear subepitelial intenso.

1.1.2- Etiologia e patogênese

A etiologia do LPO é desconhecida, mas diversas teorias foram propostas. É provável que tanto fatores endógeno-genéticos quanto exógeno-ambientais, como drogas ou infecções, possam interagir para desencadear a doença (5).

Parece existir uma susceptibilidade genética ao LP idiopático, de acordo com alguns relatos de casos familiares e em gêmeos monozigóticos (9). HLA-B8 é mais comum em pacientes com LPO como manifestação única, e o

HLA-Bw35 é fortemente associado ao LP cutâneo. Em uma amostra da população britânica, HLA-B27, B51 e Bw57 foram encontrados associados ao LPO. Dos antígenos da classe II, HLA-DR1, DR9 e DQ1 são encontrados mais frequentemente (5).

Quanto à teoria infecciosa, vários agentes, incluindo alguns vírus e *Helicobacter pylori*, têm sido associados ao LPO, porém algumas vezes com base em dados duvidosos. Na família dos Herpes vírus, por exemplo, o herpes simples 1, o Epstein-Barr, o citomegalovírus e o herpes vírus 6 têm sido implicados no LPO. Pequenas séries detectaram fragmentos de DNA destes vírus em lesões de LPO, principalmente no tipo erosivo. Contudo, não existe diferença estatisticamente importante na prevalência de anticorpos (IgM e IgG) para alguns destes vírus entre pacientes com LPO e controles. Além disso, muitas vezes não está claro se o vírus atua na patogênese ou se é secundário às lesões de LPO. Poucos casos de lesões liquenóides foram relatados em pacientes infectados pelo HIV e a maioria destas lesões poderia estar relacionada à terapia com zidovudine ou cetoconazol (10).

A frequente associação de LP com doença hepática crônica (DHC) está bem documentada em pacientes do Mediterrâneo, enquanto estudos prospectivos do Reino Unido e da Escandinávia não revelaram qualquer correlação do LPO com doenças do fígado. Existem poucos relatos de erupção liquenóide, principalmente cutânea, após a administração de vacinas contra a hepatite B e a maioria dos pacientes com LP e DHC não estão infectados por este vírus. Outras doenças hepáticas como hemocromatose, colangite esclerosante primária, doença de Wilson e deficiência de α 1-antitripsina têm sido raramente associadas ao LP, e a relação com cirrose biliar primária parece ocorrer principalmente devido à administração de penicilamina durante o tratamento. A associação entre LP e infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) tem sido proposta por diversos estudos. Em uma revisão sistemática recente incluindo estudos controlados, a proporção de pacientes VHC positivos foi maior no grupo de LP quando comparado ao controle em 20 dos 25 estudos, com *odds ratio* (OR) de 4.80 (intervalo de

confiança de 3,25-7.09), mostrando uma diferença estatisticamente significativa. Porém, quando OR foi calculado para pacientes apenas com LPO, esta diferença não foi substancial, sendo considerável somente em estudos oriundos do Mediterrâneo e do norte europeu, porém sem significância estatística (10).

Sensibilizantes de contato e haptenos podem também ter um papel na etiologia do líquen plano. Exposição crônica de pequena intensidade ao mercúrio inorgânico, um componente do amálgama dentário, e possivelmente a outros metais, como o ouro, pode estimular a reação linfocítica que se manifesta como LPO (5). Estudos recentes têm sugerido que as lesões parecem ser decorrentes de hipersensibilidade celular de contato aos materiais dentários em indivíduos suscetíveis que foram sensibilizados ao longo do tempo. Estes materiais, em contato com a mucosa oral, podem alterar diretamente a antigenicidade dos ceratinocitos basais pela liberação de mercúrio ou outros produtos. Na hipersensibilidade tipo IV, atuam macrófagos e linfócitos T que são sensibilizados ao antígeno (hapteno), porém ainda é desconhecido como o mercúrio e outros haptenos metálicos dentários são capazes de ativar a resposta imune (2).

Nenhuma associação marcante foi documentada entre estresse emocional ou uso de tabaco no líquen plano, embora alguns trabalhos tenham sugerido que o tabaco possa agravar o LPO (5).

A patogênese do LPO decorre de um desequilíbrio na regulação imune em que atua, principalmente, a resposta celular. O infiltrado inflamatório consiste primariamente de células T e macrófagos. A maioria das células T, na espessura do epitélio e adjacente aos ceratinocitos lesados, são linfócitos CD8+ ativados, enquanto a maioria dos linfócitos na lâmina própria são CD4+ (10). Os linfócitos T CD8+ podem ser ativados, pelo menos em parte, por um antígeno associado ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC do inglês *major histocompatibility complex*) classe I dos ceratinocitos basais, e a ativação destes linfócitos, por sua vez, desencadeia a apoptose dos ceratinocitos. O número de células de Langerhans (CLs) está aumentado nas lesões de LPO,

com maior expressão do MHC classe II. Os ceratinocitos no LPO também expressam antígenos de MHC classe II. Desta forma, tanto as CLs como os ceratinocitos basais apresentam antígeno associado ao MHC classe II às células T CD4+. Altos níveis de expressão antigênica, a coexpressão de CD40 e CD80 e a secreção de interleucina (IL) 12 pelas CLs promovem uma resposta *T helper-1* (Th1) nas células T CD4+, que passam a secretar IL-2 e o interferon-gama (IFN- γ). Estas citocinas, por sua vez, ligam-se a seus respectivos receptores nos linfócitos CD8+. Desta forma, as células CD8+ citotóxicas podem ser ativadas pela combinação de: (1) antígeno associado ao MHC classe I no ceratinocito basal e (2) IL2 e IFN- γ derivados das células Th1 CD4+ (10). A expressão do antígeno pelo ceratinocito pode ser induzida por infecção viral, produtos bacterianos, trauma mecânico, drogas de ação sistêmica, sensibilidade de contato ou outro agente não identificado (2, 7). Contudo, a natureza do antígeno permanece incerta. Os linfócitos T CD8+ ativados então desencadeiam a apoptose do ceratinocito basal. Como parte da resposta ao IFN- γ , os ceratinocitos mantêm a expressão do MHC classe II, aumentando suas interações com as células T helper, e são estimulados a expressar moléculas de adesão intercelular (ICAM-1, CD54), o que contribui para a cronicidade do LPO (5, 10).

Os mastócitos também atuam no evento celular do LPO. A degranulação destas células libera diversos mediadores pró-inflamatórios como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), quimase e triptase. O TNF- α , por sua vez, pode aumentar a expressão de moléculas de adesão endotelial (CD62E, CD54 e CD106), que são necessárias à adesão do linfócito à superfície luminal do vaso sanguíneo e subsequente migração. Além disso, grupos de mastócitos e linfócitos T CD8+ intra-epiteliais são vistos em sítios de interrupção da membrana basal, sugerindo que estas células podem ter um papel na agressão a esta membrana (7, 10, 11). Metaloproteinases da matriz (MPM) são secretadas como proenzimas inativas e são rapidamente degradadas depois da ativação. A principal função das MPMs é a degradação das proteínas da matriz do tecido conjuntivo. As MPM-2 e MPM-3 foram expressas principalmente no epitélio do LPO. A MPM-9 foi

identificada no infiltrado inflamatório na lâmina própria, com eventual positividade no epitélio. As células T no LPO podem estimular a secreção de MPM-9, via TNF- α . A MPM-9, por sua vez, pode participar da agressão ao epitélio da membrana basal. Em adição, a interrupção da membrana basal induzida pela MPM-9 pode facilitar a passagem de células T CD8+ citotóxicas e antígeno-específicas para o interior do epitélio do LPO, onde estas ativariam a apoptose dos ceratinocitos (7). Quimase, uma protease do mastócito, é um conhecido ativador da MPM-9. Assim, a agressão à membrana basal no LPO pode ser mediada por proteases mastocitárias direta ou indiretamente via ativação de células T e de MPM-9 (7, 10).

O infiltrado de células T e os ceratinocitos expressam uma variedade de diferentes quimiocinas. Recentemente, a RANTES (do inglês *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*), uma das quimiocinas mais estudadas, tem sido implicada na patogênese do LPO. A RANTES, secretada por células T, no LPO, pode atrair mastócitos para a lesão e subsequentemente estimular sua degranulação. Os mastócitos liberam TNF- α que, então, estimula a secreção de RANTES pela célula T. Desta forma, a RANTES acaba contribuindo para a manutenção do infiltrado inflamatório e para a cronicidade da doença (9, 10).

O antígeno no LP é desconhecido. Dentro das diversas possibilidades, o antígeno pode ser um peptídeo próprio, o que definiria o LP como uma verdadeira doença autoimune. O papel da autoimunidade na patogênese da doença é apoiado por diversas características do LPO, incluindo: sua cronicidade, início na vida adulta, predileção feminina, associação com outras doenças autoimunes, ocasional acometimento de outros tipos de tecidos, depressão na imunidade supressora em pacientes com LPO e a presença de clones de linfócitos T autocitotóxicos nas lesões de LP (7,10).

Antígenos que são apresentados pelo MHC classe II são processados através da via celular endossômica. Em contraste, antígenos apresentados pelo MHC classe I são processados por via celular citosólica. Assim, o provável

antígeno apresentado pelo MHC classe II aos linfócitos T CD4+ *helper* no LPO pode ser diferente do apresentado pelo MHC classe I aos linfócitos T CD8+ citotóxicos. Alternativamente, um mesmo antígeno pode ganhar acesso a ambas vias celulares, citosólica e endossômica, durante a sua apresentação, como ocorre com algumas proteínas virais. Independentemente de um ou dois antígenos diferentes atuarem na patogênese do LPO, sabe-se que a apresentação simultânea aos linfócitos T CD8+ e CD4+ é necessária para o desenvolvimento do infiltrado inflamatório e para a atividade dos linfócitos T CD8 citotóxicos (7, 10).

Os ceratinocitos, no LPO, mostram uma expressão aumentada de HSP (*heat shock protein*). Tal fato pode ser um epifenômeno associado ao processo inflamatório pré-existente ou uma via final comum ligando uma variedade de agentes exógenos (drogas sistêmicas, alérgenos de contato, trauma mecânico, infecção bacteriana ou viral) na patogênese do LPO. Neste contexto, a expressão de HSP pelos ceratinocitos orais pode ser autoantigênica. A suscetibilidade ao LPO pode resultar de um desequilíbrio na expressão do gene HSP por algum tipo de estímulo nos ceratinocitos orais ou de uma incapacidade em suprimir a resposta imune decorrente do reconhecimento da própria HSP (7, 10). Outro fato de grande interesse é que, conforme demonstrado por estudos recentes, linhagens de células neoplásicas de humanos e ratos apresentam constitutivamente níveis elevados de HSP. Assim, alguns casos de transformação maligna de lesões de LPO podem representar uma resposta inicial liquenóide a células em fase precoce de transformação maligna, expressando níveis elevados de HSP, seguida pelo desenvolvimento clínico e histológico da malignidade (7).

As lesões do LP apresentam uma distribuição bem definida clinicamente e existe uma demarcação clara entre o tecido acometido e a área sã. Uma possível explicação para isto é a de que os ceratinocitos expressam o antígeno do LP apenas no sítio da lesão, ou seja, a distribuição clínica do LP seria determinada pela distribuição do antígeno. Após a expressão deste antígeno pelo ceratinocito alterado, as células T CD4+ e CD8+ antígeno-específicas poderiam

(1) encontrá-lo na vigilância de rotina do epitélio ao acaso (hipótese do *encontro ao acaso*) ou (2) serem atraídos ao epitélio por quimiocinas produzidas pelo ceratinocito (hipótese da *migração direcionada*). A hipótese do *encontro ao acaso* é apoiada pelo achado de linfócitos T CD8+ na epiderme humana normal e pela degeneração da camada basal mesmo na ausência de denso infiltrado inflamatório nas lesões de LP. Contrariamente, a hipótese da *migração direcionada* tem suporte na expressão natural de receptores para quimiocinas pelos linfócitos T e pelo fato do infiltrado dérmico de células T anteceder o aparecimento intraepitelial de linfócitos e o dano epidérmico nas lesões de LP (10).

A apoptose tem sido proposta como mecanismo de morte do ceratinocito no LPO (12). No entanto, a forma exata utilizada pelos linfócitos T CD8+ citotóxicos para desencadear este processo ainda é desconhecida. Possíveis mecanismos incluem:

- 1- TNF- α secretado por linfócito T liga-se ao seu receptor (TNF R1) na superfície do ceratinocito;
- 2- CD95L (Fas ligante) da superfície do linfócito T liga-se ao CD95 (Fas) na superfície do ceratinocito;
- 3- Grânulos citotóxicos contendo granzima B e perforina secretados por linfócito T atuam conjuntamente no ceratinocito.

Todos estes mecanismos podem ativar a cascata das caspases, resultando na apoptose do ceratinocito (2, 7, 10).

1.2- Doença do enxerto contra o hospedeiro

O transplante de medula óssea (TMO) é reconhecido atualmente como terapia de escolha para diversas doenças hematológicas como leucemias, linfomas e síndromes de falência de medula óssea, assim como para deficiências

imunes e alguns tumores sólidos. De acordo com o tipo de doador das células hematopoiéticas, o transplante pode ser classificado como: singênico (quando o doador é um irmão gêmeo univitelínico), alogênico (quando as células progenitoras vêm de um irmão, parente ou até de indivíduo não aparentado, porém geneticamente compatível) ou autólogo (quando a medula foi obtida do próprio doador) (13).

A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes tratados pelo transplante alogênico de medula óssea (14, 15). Tradicionalmente tem sido classificada, de acordo com o período de aparecimento das primeiras manifestações clínicas, em: aguda (DECHa), se estas aparecem dentro dos primeiros 100 dias subsequentes ao TMO, e crônica (DECHc) se ocorrem após este período (14). Recentemente, tem surgido uma tendência à classificação da DECH em aguda e crônica com base nas características clínicas e patológicas (16).

Em 1966, Billingham (17) descreveu as três condições necessárias ao desenvolvimento de DECH: **1-** o enxerto transplantado deve conter células imunocompetentes **2-** o hospedeiro deve expressar antígenos teciduais que são reconhecidos como estranhos pelas células imunocompetentes do doador **3-** o hospedeiro deve ser incapaz de reagir e rejeitar o enxerto. Os linfócitos T são as células imunocompetentes do enxerto que preenchem a primeira condição. Os antígenos do complexo de histocompatibilidade menor frequentemente preenchem a segunda condição. No período que antecede o TMO alogênico, os pacientes passam por regimes de condicionamento que consistem na administração de altas doses de quimioterápicos associados ou não à irradiação corpórea total. O objetivo principal do condicionamento é prevenir que o hospedeiro rejeite as células progenitoras infundidas. Esta assertiva associada à imunossupressão, determinada pela profilaxia de DECH, garantem a terceira condição (13).

1.2.1- Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda

O quadro de DECHa geralmente se inicia no período entre 7 e 100 dias após o transplante e compromete a pele, o fígado e o intestino (18).

A patogênese da DECHa compreende 3 fases: **(1)** Dano tecidual do receptor decorrente da quimioterapia ou radioterapia do regime de condicionamento pré-transplante. Nesta fase, ocorre liberação de citocinas inflamatórias que ativam as células apresentadoras de antígenos (APC do inglês *antigens presenting cells*) do receptor; **(2)** Reconhecimento de antígenos dos tecidos lesados do receptor pelas células T do doador. Estes antígenos são apresentados pelas APCs, com consequente ativação e expansão clonal das células T. Por sua vez, as células T ativadas do doador produzem citocinas inflamatórias, incluindo IL-2, IFN- γ e TNF- α ; **(3)** Fase efetora, onde o dano ao tecido do hospedeiro é induzida diretamente pelas células T citotóxicas, células *natural killer* (NK), fagócitos mononucleares e neutrófilos ou através de complexos imunes e respostas inflamatórias (16, 19).

A primeira manifestação clínica geralmente caracteriza-se por um *rash* cutâneo máculo-papuloso, pruriginoso ou acompanhado por uma sensação de queimação. A distribuição do *rash* é característica, sendo precoce o acometimento das regiões palmares, plantares e dos pavilhões auriculares (15). As lesões podem coalescer e generalizar-se, inclusive com formação de bolhas. Nos casos mais graves, o quadro pode se assemelhar à necrólise epidérmica tóxica. Podem ocorrer congestão conjuntival, no aparelho ocular, e enantema, erosões e ulcerações na mucosa oral (6).

O acometimento hepático e intestinal manifesta-se por anormalidades laboratoriais hepáticas, diarreia, cólicas abdominais e vômitos (6).

1.2.2- Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica

A DECHc é a complicação tardia mais comum dos pacientes tratados pelo TMO alogênico (15) e é a principal causa de mortalidade não relacionada à recidiva da doença de base (16). Geralmente desenvolve-se de 3 a 15 meses após o transplante, afetando cerca de 50% dos adultos e 20% das crianças transplantadas, com frequência variável nos diversos serviços (20).

A incidência e a gravidade da DECHc dependem de alguns fatores como a compatibilidade do Antígeno Leucocitário Humano (HLA do inglês *human leukocyte antigens*), idade e sexo do doador e do receptor, tipo do doador, fonte das células progenitoras, manipulações do enxerto (especialmente depleção de células T), DECHa prévia e uso de células precursoras periféricas nos transplantes alogênicos (16, 21, 22).

A apresentação clínica pode ocorrer de três formas: **1-** progressiva: como evolução de DECHa; **2-** quiescente: após resolução de DECHa; **3-** de novo: quando não é precedida por DECHa (13). Pacientes com a forma progressiva de DECHc apresentam menor sobrevida (15).

A patogênese da DECHc é complexa e ainda mal compreendida. Alguns autores acreditam que a sua etiologia deva-se ao reconhecimento imunológico de antígenos do complexo menor de histocompatibilidade (alorreatividade) e, portanto, uma manifestação tardia de DECHa. Argumentos que suportam esta teoria baseiam-se nas altas incidências de DECHc em pacientes que tiveram DECHa ou no desenvolvimento simultâneo das formas aguda e crônica em alguns pacientes. Outros acreditam que o seu aparecimento deva-se a um estado de autoimunidade surgido após o transplante. Apóiam esta teoria o desenvolvimento *de novo* da DECHc e a semelhança com outras doenças autoimunes (15). Estudos recentes têm sugerido que a agressão ao epitélio do timo prejudica a deleção de linfócitos T autorreativos. Essa agressão pode ser provocada pelo regime de condicionamento, por drogas, pelas células T do doador ou mesmo pela atrofia que ocorre com a idade (20, 23). As células T autorreativas

são liberadas no sangue periférico e podem reconhecer tanto os antígenos de histocompatibilidade classe II do doador, quanto do hospedeiro (24). A agressão aos tecidos do receptor pode ser produzida diretamente por essas células T através de citocinas inflamatórias, ataque citotóxico e fibrose e/ou através da ativação de linfócitos B com produção de autoanticorpos (16).

As manifestações clínicas da DECHc variam de acordo com os órgãos acometidos. Ocorrem: lesões liquenóides ou esclerodermia-símiles na pele; estomatite liquenóide na mucosa oral; obstrução dos ductos biliares, fibrose periportal e necrose no fígado; síndrome *sicca*, Sjögren-símile, nas glândulas salivares, lacrimais e no trato respiratório superior; e bronquiolite obliterante nos pulmões, dentre outras manifestações (15).

a) Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral

A mucosa oral pode ser o primeiro ou único sítio acometido no desenvolvimento da DECHc (13), representando a complicação com maior impacto na qualidade de vida dos pacientes (25). Dentre os achados mais comuns destacam-se eritema, atrofia de mucosa, alterações liquenóides, ulcerações pseudomembranosas, mucoceles e fibrose perioral (13, 16). As estriações esbranquiçadas, semelhantes às estrias de Wickham observadas no LPO, ocorrem em 80 a 100% dos pacientes com DECHc (Figura 3) (20). A dor pode ser o primeiro sintoma apresentado e a xerostomia é relatada em 50% dos pacientes (13).



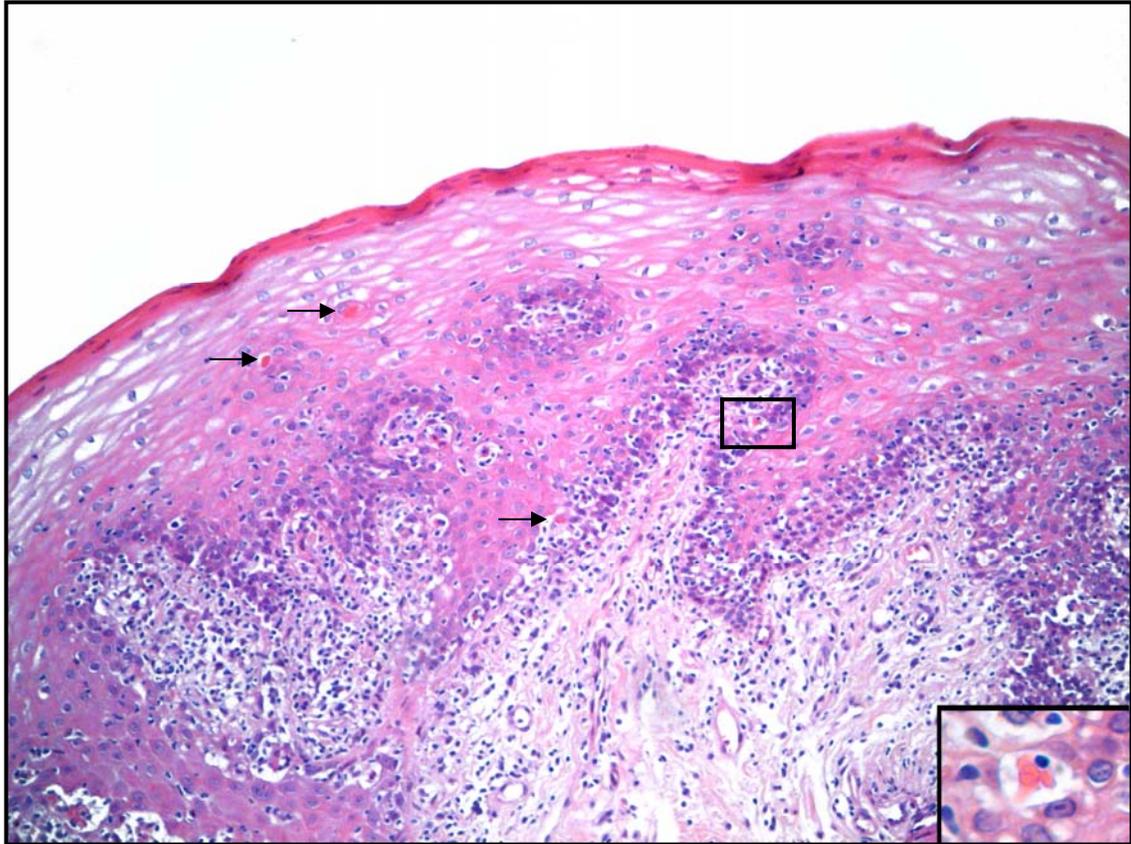
Figura 3- DECHc oral: estriações esbranquiçadas no assoalho da boca.

Já foi demonstrado que, dentre as diversas alterações encontradas no exame clínico da cavidade oral, apenas a presença de lesões liquenóides mostra relação estatisticamente significativa com o diagnóstico de DECHc. Além disso, o estudo histológico da mucosa oral e das glândulas salivares é de grande valor, tanto na definição do diagnóstico precoce, como na avaliação do *status* da DECHc (14, 20, 26).

A participação dos linfócitos T citotóxicos na patogênese das lesões liquenóides orais já está bem estabelecida, porém não se conhece ainda o exato mecanismo como se processam essas alterações. Acredita-se que as CLs possam ter um papel importante na ativação das células T CD8-positivas (1, 25), apesar de desaparecerem rapidamente após o TMO alogênico (25).

O exame histológico da mucosa oral apresenta atrofia do epitélio, degeneração hidrópica da camada basal, corpos apoptóticos com satelitose, infiltrado linfocitário subepitelial e focal ou total clivagem entre o epitélio e o tecido

conjuntivo (Figura 4). O infiltrado inflamatório é composto de macrófagos, células CD4 e CD8 positivas, com predomínio dos linfócitos CD8 e macrófagos na epiderme, junção dermoepidérmica e na derme superior (14, 27, 28).



(H&E, aumento original x 100)

Figura 4- Corte histológico de mucosa oral na DECHc (paciente 5): infiltrado inflamatório na interface do epitélio com o tecido conjuntivo, com intensa agressão à camada basal e corpos eosinófilos apoptóticos (setas) No *inset*, corpo apoptótico com linfócito satélite, correspondente ao maior aumento da área delimitada pelo retângulo.

1.3- A resposta imunológica no LPO e na DECHc oral

1.3.1- O papel dos macrófagos

As APC participam do desencadeamento do processo inflamatório em várias dermatoses imunomediadas. Estas células convertem antígenos protéicos em peptídeos e apresentam os complexos peptídeo-MHC em uma forma que pode ser reconhecida pelo receptor antigênico das células T (29). Esta interação tem um papel crucial na ativação das células T e na resposta imunomediada por estes linfócitos (29, 30). Entre as APC mais conhecidas destacam-se as células dendríticas e os fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos). As células do sistema fagocitário mononuclear se originam na medula óssea, circulam pelo sangue, amadurecem e são ativadas nos diferentes tecidos. O monócito é o primeiro tipo celular totalmente diferenciado que entra no sangue periférico depois de deixar a medula óssea. Nos tecidos, essas células amadurecem e se tornam macrófagos, recebendo nomes especiais para designar localizações específicas. Na pele, por exemplo, são chamados de histiócitos (29).

O LPO e a DECHc da mucosa oral são doenças caracterizadas à histopatologia por apresentar infiltrado inflamatório composto principalmente por linfócitos T, que são reconhecidos como os principais efetores da agressão aos ceratinócitos basais. Além disso, um maior número de macrófagos e células dendríticas é encontrado na interface entre o epitélio e o tecido conjuntivo em ambas as doenças, quando comparados à mucosa normal, sugerindo uma participação destas células na apresentação de alo ou autoantígenos e, portanto, na patogênese das mesmas (1, 27, 30, 31).

1.3.2- A transmigração celular

O recrutamento dos leucócitos aos sítios da inflamação e o início da resposta imunológica dependem de uma cascata de eventos. Atualmente, sabe-se que a aderência e a transmigração celular são determinadas basicamente pela

ligação de moléculas de adesão complementares nas superfícies leucocitária e endotelial, e que os mediadores químicos afetam esses processos modulando a expressão superficial ou avidéz dessas moléculas de aderência. Os receptores de adesão pertencem principalmente a quatro famílias moleculares: as selectinas, as imunoglobulinas, as integrinas e as glicoproteínas semelhantes à mucina (32).

Acredita-se que as selectinas atuem na fase inicial da adesão celular entre os leucócitos e o endotélio, resultando numa aderência rápida e relativamente frouxa (32, 33).

A família das imunoglobulinas inclui duas moléculas de adesão endoteliais: ICAM-1 (do inglês *intercellular adhesion molecule*) e VCAM-1 (do inglês *vascular adhesion molecule*). Estas interagem com as integrinas encontradas nos leucócitos (32).

As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas transmembranas constituídas por duas cadeias polipeptídicas chamadas cadeias α e β . Os principais receptores de integrinas para a ICAM-1 são as β -integrinas LFA-1 (do inglês *leukocyte function-associated antigen-1*) e MAC-1 (do inglês *macrophage adhesion ligand-1*), e para VCAM-1 é a integrina VLA-4 (do inglês *very late antigen-4*). Estas moléculas atuam na aderência firme entre os leucócitos e as células endoteliais e são necessárias à transmigração celular (32, 33).

Existem três mecanismos que modulam a adesão leucocitária durante a inflamação: a redistribuição das moléculas de adesão na superfície celular, a indução de moléculas de adesão no endotélio por citocinas e o aumento da avidéz de ligação das integrinas. Neste contexto, por exemplo, a IL-1 e TNF- α aumentam a expressão de ICAM-1 e VCAM-1, que estão presentes em baixos níveis no endotélio normal. Por outro lado, a LFA-1 está presente nos leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos), mas não se adere a seu ligante ICAM-1 no endotélio. Para se tornarem firmemente aderidos, os neutrófilos precisam ser ativados, de modo que a LFA-1 seja convertida de um estado de ligação de baixa

para um de alta afinidade em relação à ICAM-1, o que ocorre através de uma alteração da configuração da molécula de integrina. Os principais agentes responsáveis por essa ativação leucocitária são agentes quimiotáticos (incluindo as quimiocinas) produzidos pelo endotélio ou outras células provenientes do local da lesão. Assim, durante a inflamação, a afinidade aumentada da LFA-1 sobre o leucócito ativado, combinada à maior expressão de ICAM-1 no endotélio, prepara o terreno para uma forte ligação LFA-1/ ICAM-1. Esta interação LFA-1/ICAM-1, por sua vez, causa adesão firme ao endotélio e permite à subsequente transmigração celular (32).

1.3.3- O papel da ICAM-1 no LPO e na DECHc oral

O recrutamento dos linfócitos ao sítio ativo das doenças inflamatórias requer uma maior expressão, mediada por citocinas, de moléculas de adesão pelas células endoteliais, bem como de moléculas receptoras pelos linfócitos e macrófagos (31).

As moléculas de ICAM-1 são expressas tanto pelas células endoteliais, como também por ceratinocitos, linfócitos, fibroblastos e por outras células epiteliais. Uma maior expressão destas moléculas também foi encontrada em CLs, macrófagos e células dendríticas (34, 35). A interação entre ICAM-1 e seu ligante LFA-1 é importante como sinal coestimulatório durante a ativação dos linfócitos T (35, 36) e também para a regulação do contato entre a célula efetora e a célula alvo, incluindo a citólise (19). Além disso, esta interação é importante na indução da sensibilização de antígenos ao MHC e na rejeição de enxertos (37). Desta forma, ICAM-1 participa não somente do recrutamento das células inflamatórias, como também do controle de suas funções, da manutenção destas células na pele e da sua transmigração (38).

No líquen plano, a expressão aumentada da ICAM-1 nos ceratinocitos basais está associada ao acúmulo de linfócitos T na camada basal e a ativação de CLs, o que sugere a participação desta molécula na etiopatogênese da doença

(39, 40). Foi demonstrado também uma maior expressão de ELAM-1 (do inglês, *endothelial leukocyte adhesion molecule*), ICAM-1, VCAM-1 e P-selectina nos compartimentos microvasculares de pacientes com LP quando comparados a fragmentos de tecidos normais, sugerindo a importância dessas moléculas na manutenção ou persistência das lesões (31).

Dados sobre a expressão de moléculas de adesão na DECH em humanos são limitados. Apesar disso, também já foi demonstrada maior expressão de ICAM-1 em ceratinócitos epidérmicos e em linfócitos T em amostras tanto de DECH aguda como de DECH crônica oral (41).

1.3.4- Perforina e granzima B

a) A apoptose e o significado funcional da perforina e da granzima B

Linfócitos T citotóxicos (LTCs) e células NK reconhecem e eliminam células infectadas por patógenos intracelulares ou células tumorais via exocitose granular e/ou via receptor-ligante (42-44). Os dois mecanismos requerem contato direto entre a célula efetora e a célula alvo. Na primeira via, grânulos citotóxicos, contendo predominantemente perforina e uma família de proteases estruturalmente relacionadas à serina (granzimas), com vários substratos específicos, são secretados por exocitose na sinapse imunológica formada entre o efector e o seu alvo. A granzima B, um dos subtipos mais importantes, cliva as proteínas da célula alvo em resíduos específicos de aspartato e leva à morte celular tanto pela ativação da cascata caspase-dependente quanto pela via caspase-independente. Na ausência de perforina, a molécula de granzima pode entrar no citoplasma, mas não consegue provocar a morte celular de forma eficiente. Portanto, estas moléculas trabalham em conjunto para induzir a apoptose da célula alvo. A segunda via cursa com a agregação do receptor da superfície da célula alvo, denominado Fas (CD95), com seu ligante correspondente na superfície da célula citotóxica, chamado ligante de Fas (Fas L),

resultando na clássica apoptose caspase-dependente. A principal função da via Fas-Fas L é eliminar linfócitos T autorreativos (43, 44).

A perforina é uma proteína formadora de poro cálcio-dependente de aproximadamente 67 kDa, cuja expressão é regulada durante a diferenciação dos linfócitos por ativação de receptores através de sinais (como receptor da célula T e NKG2D) e citocinas (como IL-2, IL-15 e IL-21) (45). Embora a perforina tenha similaridades a componentes do complemento, particularmente C9, sua sequência primária é única (45, 46). A importância desta proteína tem sido demonstrada por diversos estudos com ratos perforina-deficientes, que são profundamente imunocomprometidos e apresentam grande susceptibilidade a infecções virais e câncer. Pacientes com linfocitose hemofagocítica familiar humana, causada por mutações bialélicas na perforina, também são intensamente imunodeficientes (46, 47, 48). Mais recentemente, tem sido demonstrado *in vivo* o papel da perforina como mediador crucial da vigilância imune de células transformadas espontaneamente e na regulação da homeostase das células B e das células T de memória. (43, 49, 50).

Apesar da importância vital na atividade citotóxica, as funções moleculares e celulares da perforina e a base do sinergismo entre perforina e granzima permanecem pouco compreendidas (43).

b) Granzima B: como se processa a liberação na sinapse imunológica

Tanto em humanos quanto em roedores, a perforina é indispensável para a liberação de granzimas e seus substratos pró-apoptóticos dentro da célula alvo. Embora exista um consenso geral de que o fluxo de granzimas para dentro do citosol da célula alvo seja dependente da atividade citolítica da perforina, o mecanismo pelo qual a granzima entra na célula permanece controverso (45).

Diversos modelos têm sido propostos desde a década de 80, quando a perforina foi clonada pela primeira vez (43). À microscopia eletrônica, as células expostas à perforina apresentam poros. Desta forma, no modelo original,

a perforina, homóloga ao complemento, liberaria granzima via multimerização na membrana celular, onde formaria poros para a passagem da granzima. Recentemente, este modelo tem sido questionado. Embora, em altas concentrações, a perforina forme grandes poros na membrana que poderiam matar as células por necrose, concentrações sublíticas desta molécula são requeridas para a transferência de granzima, e os poros nestas condições, se é que são formados, podem ser muito pequenos ($\leq 50\text{nm}$ de diâmetro) para garantir a passagem de moléculas globulares tão grandes como as de granzima. Além disso, foi descoberto que granzima B pode se ligar à célula alvo e sofrer endocitose ou macropinocitose independentemente da perforina, que então atuaria como uma endossomolisina (44, 46, 48).

Em 2000, o receptor manose 6-fosfato foi proposto como candidato a receptor de superfície celular para a granzima B. Embora a existência de um receptor específico para esta molécula fosse interessante, para garantir a eliminação das células-alvos, a granzima B deveria manter a capacidade de se ligar a múltiplas estruturas da superfície celular (51). Além disso, faltam estudos demonstrando uma associação direta entre a granzima B e um receptor de superfície celular (44). Assim que, posteriormente, foi proposta a idéia de que um complexo macromolecular contendo perforina, granzima e serglicina (uma proteoglicana primária de grânulos citotóxicos) seria liberado na sinapse entre a célula efetora e a célula-alvo. Esse complexo seria capaz de se ligar e penetrar na célula-alvo através de endocitose. A serglicina contribuiria para a apoptose mediada por grânulos por atuar como carreador, facilitando a internalização da granzima e/ou da perforina (51, 52). Dentro das vesículas citosólicas, a perforina alteraria a membrana endocítica, facilitando a liberação da granzima no citosol e o seu transporte em direção ao núcleo. A formação de poros nesta etapa também é controversa na literatura (43, 44, 46, 51).

Mais recentemente um modelo híbrido foi proposto por Pipkin e Lieberman (46), em que a perforina formaria pequenos poros na membrana celular que, então, ativaria o influxo de cálcio para dentro da célula. Como os níveis de

cálcio citosólico são normalmente baixos, o aumento representaria um dano à membrana, determinando uma resposta de reparo. Vesículas intracelulares, incluindo endossomos e lisossomos, seriam mobilizadas em segundos, doando suas membranas para tentar restabelecer a área lesada. O próximo passo incluiria rápida coendocitose de granzima e perforina em endossomos gigantes, seguido da liberação de granzima mediada pela perforina no citosol. Já foi demonstrado que quando a perforina encontra-se em concentrações consideradas sublíticas, como acontece no ataque por linfócitos T citotóxicos, uma rápida resposta de reparo é ativada com pronta restauração da integridade da membrana plasmática, seguida pela coliberação de granzimas que, por sua vez, induzem um lento processo de apoptose. Quando a dose de perforina é lítica, a resposta de reparo é incapaz de competir com o dano à membrana, assim o influxo de cálcio persiste e a célula morre rapidamente por necrose. Quando a resposta de reparo da membrana é inibida, células tratadas com granzima B e perforina, mesmo em concentrações sublíticas, têm mais chance de morrer por necrose do que por apoptose. Mesmo no modelo híbrido, algumas questões permanecem desconhecidas, como o que ativaria a rápida endocitose das moléculas citotóxicas, se poros de perforina desestabilizariam as membranas dos endossomos causando o seu rompimento ou se os poros formados nessas membranas seriam largos o suficiente para permitir a passagem das moléculas de granzima para o citosol (46).

c) O papel da granzima B e da perforina no LPO e na DECHc oral

Considerando as evidências atuais, a citotoxicidade mediada por linfócitos T tem sido proposta como mecanismo de apoptose nas lesões orais do LP e da DECHc. Estudos ultraestruturais têm demonstrado que os corpos colóides encontrados nestas estomatites de interface são formados no processo de morte dos ceratinocitos basais e suprabasais, e apresentam características morfológicas típicas da apoptose (53, 54).

Um importante marcador da atividade citolítica destas células é a expressão da granzima B e da perforina *in situ*. Estudos imuno-histoquímicos demonstraram infiltrados celulares, principalmente de linfócitos CD8+, contendo granzima B e perforina nas lesões de LP (54, 55, 56). Santoro et al. (57) encontraram um número significativamente maior destas moléculas citotóxicas nas lesões de LPO quando comparadas à mucosa normal e mesmo às lesões cutâneas de LP. Através de microscopia eletrônica, moléculas de granzima B foram observadas sendo secretadas de um linfócito para um ceratinócito em processo de apoptose (54). Técnicas capazes de mensurar a expressão *in situ* de mRNA de granzima B demonstraram ser esta 100 a 200x maior nas lesões de LP comparativamente à pele normal (58) .

Já foi demonstrado também que a expressão de linfócitos T contendo perforina é muito maior na fase de exacerbação do líquen plano quando comparada à fase de remissão da doença ou ainda à pele normal de indivíduos controles (55, 56). Esses achados sugerem um importante papel da perforina e granzima B no processo de apoptose dos ceratinócitos no LP.

Diversos modelos animais também têm sugerido a participação da granzima/perforina, ao lado da via Fas/Fas ligante, como mecanismo de citotoxicidade celular mediada na DECH (50, 59, 60). Poucos trabalhos sobre o papel destas moléculas citotóxicas em fragmentos de DECH cutâneo humano têm sido relatados na literatura (61, 62, 63). Em 2001, Higaki et al. (62) demonstraram que granzima B estava presente nos linfócitos CD8+ e no espaço intercelular próximo à camada basal em espécimes de quase todos os pacientes estudados com DECHc, com poucas células apresentando positividade para a perforina. Imanguli et al. (63) obtiveram resultados semelhantes, quanto à granzima B, em amostras de DECHc oral. Estes achados sugerem que, como no líquen plano, essas moléculas citotóxicas podem participar do processo de apoptose dos ceratinócitos na DECHc.

1.4- Justificativa do trabalho

As lesões liquenóides da DECHc oral e do LPO podem ser indistinguíveis tanto do ponto de vista clínico como histológico (2, 14). Estas características em comum podem refletir similaridades nos mecanismos imunopatogênicos participantes (1).

Alguns estudos demonstrando o papel da granzima/perforina na citotoxicidade celular do LP foram publicados. Comparativamente, há poucos trabalhos na DECHc, principalmente no que diz respeito a estudo com espécimes obtidos de humanos.

O estudo do papel destas moléculas e a sua interação com as demais células inflamatórias, nestas doenças, poderá otimizar a compreensão da imunopatogênese. Consequentemente, os resultados poderão agregar conhecimento que propicie novas perspectivas terapêuticas, com possível redução na morbidade e melhora da qualidade de vida desses doentes.



2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Analisar os achados morfológicos e imuno-histoquímicos (CD4, CD8, MAC 387, ICAM-1, granzima B e perforina) de pacientes com LPO e DECHc de mucosa oral, tratados em nosso serviço no período de 1994 a 2007, correlacionando-os entre si, com o intuito de compreender melhor a imunopatogênese dessas doenças.

2.2- Objetivos específicos

- 1- Comparar as lesões de LPO e DECHc quanto às características morfológicas, em cortes corados pela hematoxilina e eosina, segundo critérios padronizados;
- 2- Comparar as lesões de LPO e DECHc quanto à expressão dos marcadores imuno-histoquímicos CD4 e CD8, que identificam subpopulações de linfócitos T;
- 3- Comparar as lesões de LPO e DECHc quanto à expressão do marcador imuno-histoquímico MAC 387, que identifica uma população de histiócitos jovens;
- 4- Comparar as lesões de LPO e DECHc quanto à expressão do marcador imuno-histoquímico ICAM-1, que é uma molécula de adesão intercelular;
- 5- Comparar as lesões de LPO e DECHc quanto à expressão dos marcadores imuno-histoquímicos granzima B e perforina, que são moléculas citotóxicas;
- 6- Estudar a correlação entre as variáveis analisadas, com vistas à patogênese do LPO e DECHc oral.



3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Seleção da amostra

3.1.1- Pacientes com LPO

Trata-se de estudo retrospectivo. Dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica (DAP) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) foram obtidos os nomes de todos os pacientes atendidos no período de 1996 a 2007 de quem tinham sido coletadas amostras de mucosa oral com suspeita clínica e/ou diagnóstico histopatológico de LPO, totalizando 47 pacientes. Foram consultados os respectivos prontuários médicos para conferir o diagnóstico nosológico definido pelo conjunto de dados (clínico, histopatológico e de evolução). A seguir, os blocos correspondentes às biopsias selecionadas foram resgatados dos arquivos. Foram excluídos do estudo todos os casos em que o diagnóstico nosológico não foi definido ao exame clínico e histológico, cujos prontuários ou blocos não foram localizados, ou mesmo cujos blocos não continham material suficiente para novos cortes. Permaneceram no estudo 29 casos. Informações clínicas importantes e pertinentes foram coletadas dos prontuários destes pacientes.

3.1.2- Pacientes com DECH crônica oral

Dos arquivos da unidade de transplante de medula óssea da UNICAMP foram obtidos os registros de todos os pacientes tratados com o TMO alogênico no período de 1994 a 2006 totalizando 364 pacientes. Todos estes pacientes receberam enxertos HLA idênticos, de doadores aparentados e sistema ABO compatível. Foram selecionados 132 pacientes que desenvolveram DECH crônica oral e de quem haviam sido coletadas biopsias do lábio inferior para a confirmação do diagnóstico. As biopsias foram realizadas na data em que a doença foi clinicamente diagnosticada. Elas foram obtidas do lábio inferior a 10mm da comissura labial e a 10mm do fórnice vestibular ou no local com sinais clínicos da DECHc. Dos prontuários foram obtidas as informações clínicas pertinentes,

incluindo a classificação quanto à extensão clínica das lesões, segundo Shulman et al. (64) (Quadro 1 do Anexo 1).

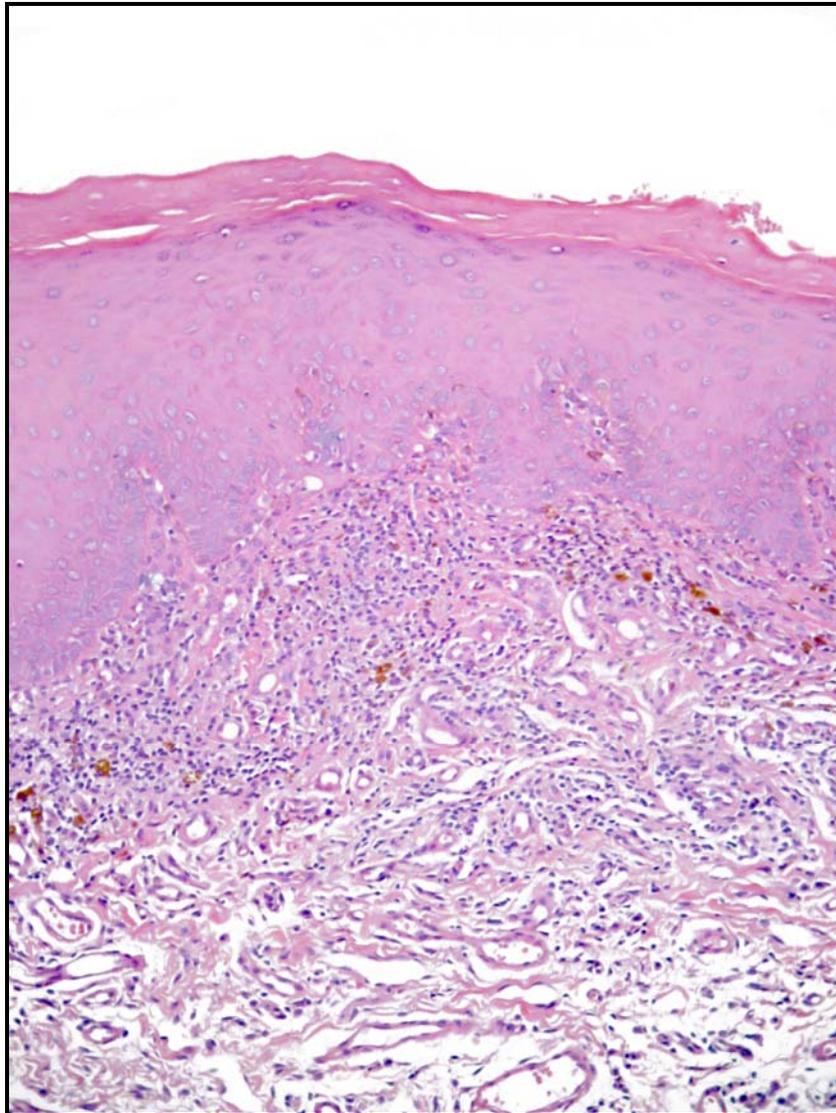
Os blocos de parafina contendo o material de biopsia foram recuperados do DAP. Foram incluídos no estudo as amostras de DECH crônica oral que apresentavam pelo menos grau 2 de acometimento mucoso, segundo a graduação de Horn et al.(65) (Quadro 2 do Anexo 2). O diagnóstico de DECHc foi definido por critério clínico e histológico, e não apenas pela relação temporal com o dia do transplante. Foram excluídos todos os casos cujos blocos não foram localizados ou que não continham material suficiente para novos cortes. Ao final da seleção permaneceram no estudo 27 casos.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas.

3.2- Avaliação histopatológica

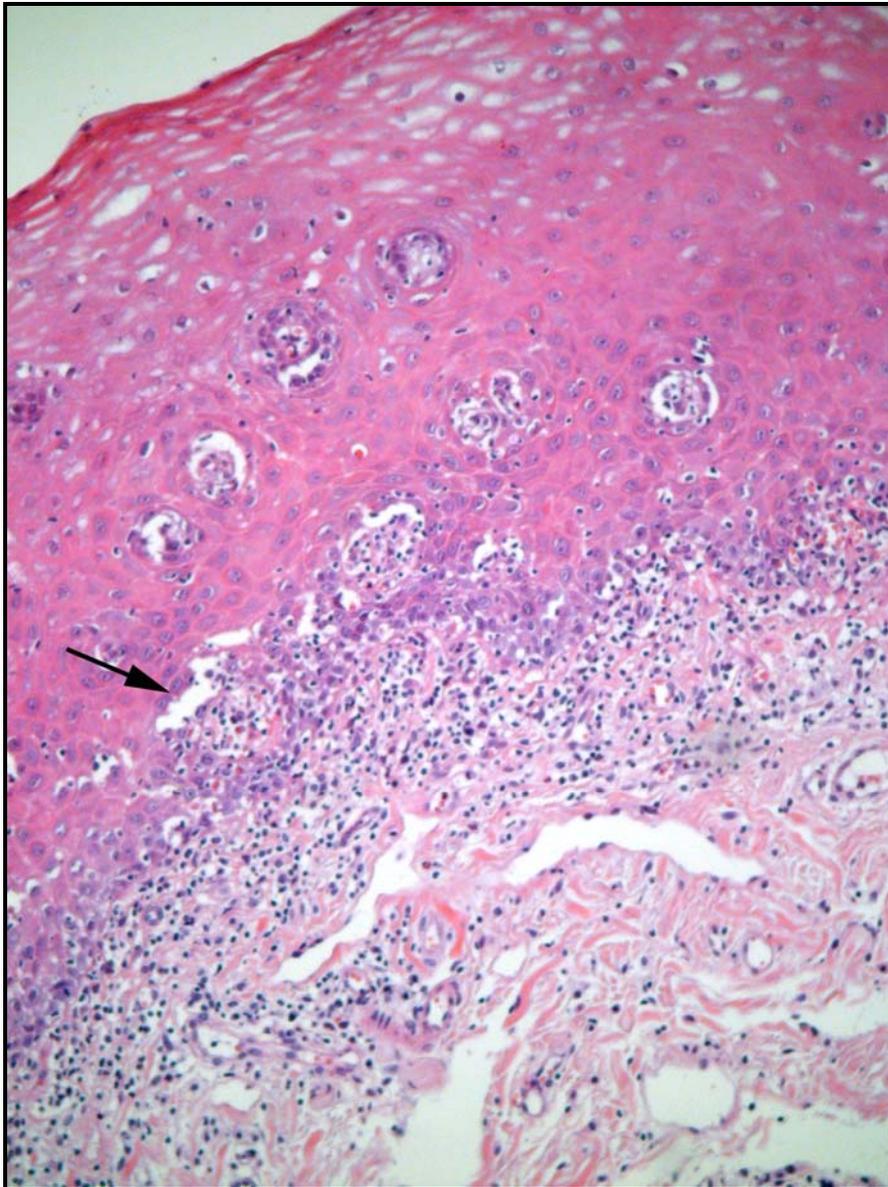
Novos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E) foram obtidos para todos os 56 casos. Posteriormente, uma análise qualitativa foi realizada para cada uma das lâminas de forma cega e aleatória por um mesmo observador. Os seguintes aspectos foram avaliados:

- A-** Metaplasia cornificada: ausente ou presente;
- B-** Fase da lesão: ativa (Figuras 2 e 4) ou em regressão (Figura 5);
- C-** Fenda: ausente ou presente (Figura 6);
- D-** Intensidade do infiltrado inflamatório: leve ou moderada/intensa;
- E-** Distribuição do infiltrado inflamatório: superficial ou superficial e profunda.



(H&E, aumento original x 100)

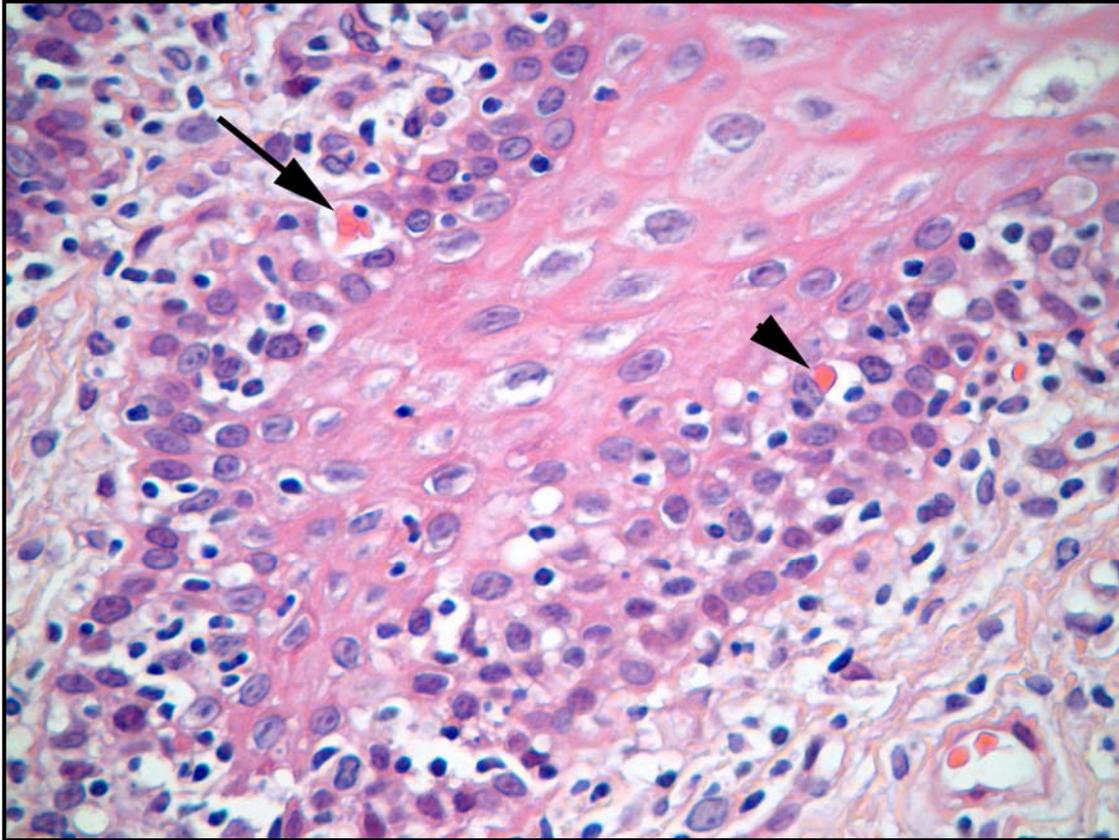
Figura 5- Corte histológico de LPO (paciente 17) demonstrando as características de uma lesão em regressão: camada basal do epitélio recuperada, fibrose, neovascularização e incontinência pigmentar no tecido conjuntivo superficial.



(H&E, aumento original x 100)

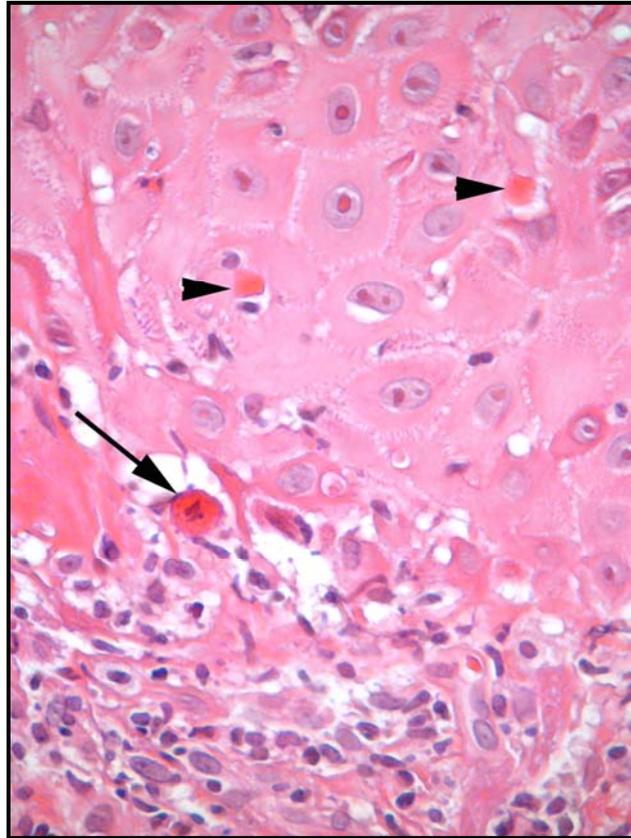
Figura 6- Corte histológico de DECHc oral (paciente 12) com destaque para a presença de fenda na junção entre o epitélio e o tecido conjuntivo (seta).

Foi realizada, ainda, uma análise semiquantitativa para o grau de degeneração hidrópica da camada basal e uma análise quantitativa para os corpos apoptóticos (isolados ou agrupados) na junção entre o epitélio e o tecido conjuntivo (Figuras 7 e 8). Estas análises também foram feitas de forma cega, por um mesmo observador, utilizando um microscópio óptico Olympus CH30 com objetiva de 40x e em toda extensão do fragmento representado na amostra. Para a avaliação do grau de degeneração hidrópica, foi estimada a porcentagem da membrana afetada em cada campo avaliado e a soma destes resultados foi dividida pelo número total de campos de cada amostra. O número de corpos apoptóticos isolados ou agrupados também foi contado em cada campo analisado. Para padronizar esta contagem, a área correspondente à camada basal foi posicionada no meio do campo. Depois o número total de corpos apoptóticos contados de cada amostra foi dividido pela área total estudada, obtendo-se um resultado referente a corpos apoptóticos/mm². Para o cálculo desta área, o número total de campos avaliados de cada caso foi multiplicado pela fórmula πr^2 , já que cada campo na ocular do microscópio tem formato circular.



(H&E, aumento original x 400)

Figura 7- Corte histológico de DECHc oral (paciente 5): degeneração hidrópica em quase toda extensão da camada basal do epitélio, com corpos apoptóticos agrupados (seta), onde observa-se satelitose, ou isolados (cabeça de seta).



(H&E, aumento original x 400)

Figura 8- Corte histológico de DECHc oral (paciente 26): corpos apoptóticos agrupados (seta) e isolados (cabeça de seta).

3.3- Imuno-histoquímica

Cortes histológicos (4µm de espessura) foram obtidos a partir de blocos de parafina contendo a amostra, desparafinados em xilol e reidratados. A reação imuno-histoquímica foi realizada com o método polimérico.

Os anticorpos monoclonais primários utilizados foram o OPD4 (sc-59375, Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:50, o CD8 (clone C8/144B, Dako) na diluição 1:50, o ICAM-1 (G5:sc-8439, Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:8000, o MAC 387 (clone MAC 387, Dako) na diluição 1:200, a Perforina (clone 5B10, Novocastra) na diluição 1:20, a Granzima B (clone GrB-7,

Dako) na diluição 1:100 (Tabela 1). A recuperação antigênica foi realizada pelo método do calor úmido utilizando-se tampão de citrato (LABSYNTH) pH 6,0 para o ICAM-1, Perforina e MAC 387. Já para o CD8, OPD4 e Granzima B, a recuperação antigênica foi realizada utilizando-se Tris-EDTA (LABSYNTH) pH 9,0 (Tabela 1). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com incubação em peróxido de hidrogênio 10 volumes à temperatura ambiente em todos os casos. Para a Granzima B, foi realizado um bloqueio complementar da peroxidase com bloqueador de proteína Dako (*protein block serum free* Dako). O polímero Advance TM HRP Enzyme (Dako) foi utilizado para amplificar a reação. A revelação foi feita com 3,3-diaminobenzidina-HCL (DAB) (Dako) e, a contracoloração, com hematoxilina de Mayer. Foram utilizados controles positivos e negativos apropriados. As lâminas insatisfatórias para a análise foram excluídas e o processo repetido até a obtenção de reações adequadas.

Tabela 1- Anticorpos primários, diluição e recuperação antigênica empregadas.

Anticorpo	Clone	Isotipo	Diluição	Marca	Recuperação antigênica
OPD4 (T CD4)	OPD4	IgG1	1:50	Santa Cruz	Tris-EDTA
CD8	C8/144B	IgG1	1:50	Dako	Tris-EDTA
ICAM-1	54C04	IgG2a	1:8000	Santa Cruz	Citrato
MAC 387	MAC 387	IgG1	1:200	Dako	Citrato
Perforina	5B10	IgG1	1:20	Novocastra	Citrato
Granzima B	GrB-7	IgG2a	1:100	Dako	Tris-EDTA

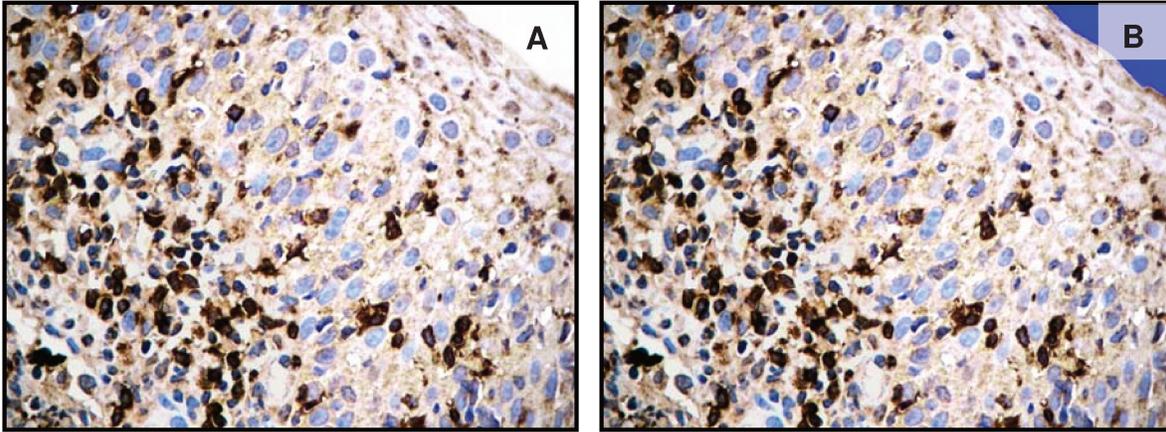
3.3.1- Quantificação imuno-histoquímica

Para os marcadores Granzima B e Perforina, as células imunomarcadas foram contadas por um único observador de forma cega e aleatória em toda extensão da amostra, utilizando-se um microscópio óptico Olympus CH30 em um aumento de 400x. Depois o resultado foi dividido pela área total avaliada (de forma semelhante ao descrito anteriormente para a contagem de corpos apoptóticos), obtendo-se um resultado relativo a células positivas/mm². Este procedimento foi adotado devido à melhor identificação destes marcadores diretamente ao microscópio.

Para todos os demais marcadores, foram capturadas fotografias digitais em toda a extensão da amostra, em campos de 400x, por um mesmo observador usando um microscópio Nikon E200 equipado com câmera Canon A630. Posteriormente as células imunomarcadas foram contadas de forma cega e aleatória por um mesmo observador utilizando o programa Sociologia¹.

Para cada marcador, nos casos que apresentaram um número menor ou igual a 10 imagens capturadas, a contagem das células positivas foi realizada em todas as fotografias. Já nos casos com mais de 10 imagens obtidas, foram selecionadas, de forma aleatória, apenas 10 fotografias para a contagem. O número total de células positivas também foi dividido pela área válida de cada fotografia. Para o cálculo desta área foram utilizadas ferramentas do programa *Imagelab 2000*, quando as fotografias analisadas apresentavam áreas não completamente preenchidas por tecido. Este software permite a segmentação manual da imagem, fornecendo o valor da área segmentada. Este dado posteriormente era subtraído do valor correspondente à área total da imagem, obtendo-se o valor da área válida (Figura 9). No total foram analisadas 2015 fotografias. Tanto na contagem direta ao microscópio quanto na obtenção das imagens digitais, a área correspondente à camada basal foi posicionada no meio do campo.

¹Programa desenvolvido pelo pesquisador colaborador Dr. Randall Luis Adam, com o apoio do Instituto de Computação da UNICAMP. Este programa em breve será registrado no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial).



(aumento original x 400)

Figura 9- Reação imuno-histoquímica para CD8 em LPO (paciente 7).
A: observa-se uma área da imagem não preenchida pelo tecido (canto superior direito). **B:** segmentação da imagem, por meio do *Imagemlab*, para o cálculo da área selecionada (em azul).

3.4- Análise estatística

A diferença entre os grupos foi analisada por meio do teste do χ^2 para as variáveis categóricas, que se referem aos critérios histológicos (metaplasia cornificada, fase da lesão, fenda, intensidade e distribuição do infiltrado inflamatório). Para as demais variáveis, foi utilizado o teste *t* de *Student* por meio do programa WINSTAT, com correção para variâncias heterogêneas, já que todos os subgrupos apresentavam uma boa aproximação da distribuição de GAUSS. Em cada grupo de doença algumas variáveis foram comparadas pelo teste T dependente. As correlações entre as variáveis, segundo o grupo de doença estudada (LPO ou DEHCc), foram avaliadas por meio da análise do coeficiente de correlação de Pearson e por regressões lineares múltiplas. O nível de significância utilizado entre os testes foi de 5% ($p < 0,05$).



4- RESULTADOS

O presente estudo comparou 29 amostras de LPO e 27 de DECHc oral.

4.1- Dados clínicos e histológicos qualitativos

Os dados clínicos e histológicos dos pacientes em estudo estão discriminados nas Tabelas 5 e 6 do Apêndice.

A média de idade foi de 46,9 anos para os pacientes com LPO e de 37,1 anos para os pacientes com DECHc, com diferença significativa entre os grupos ($p=0,005$).

Com relação à avaliação histológica qualitativa (presença de metaplasia cornificada, fase da lesão, presença de fenda, intensidade e distribuição do infiltrado inflamatório) foram observadas diferenças entre os grupos nas variáveis referentes à fase da doença ($p=0,01$), intensidade ($p=0,0001$) e distribuição ($p=0,01$) do infiltrado inflamatório. No grupo de pacientes com LPO, 44,82% das amostras apresentavam-se na fase ativa, 96,55% mostravam infiltrado inflamatório de moderado a intenso e, em 65,51% delas, este infiltrado era superficial. Já no grupo de DECHc, 81,48% das amostras encontravam-se na fase ativa, 3,7% mostravam infiltrado inflamatório de moderado a intenso e, em 100% delas, este infiltrado era superficial.

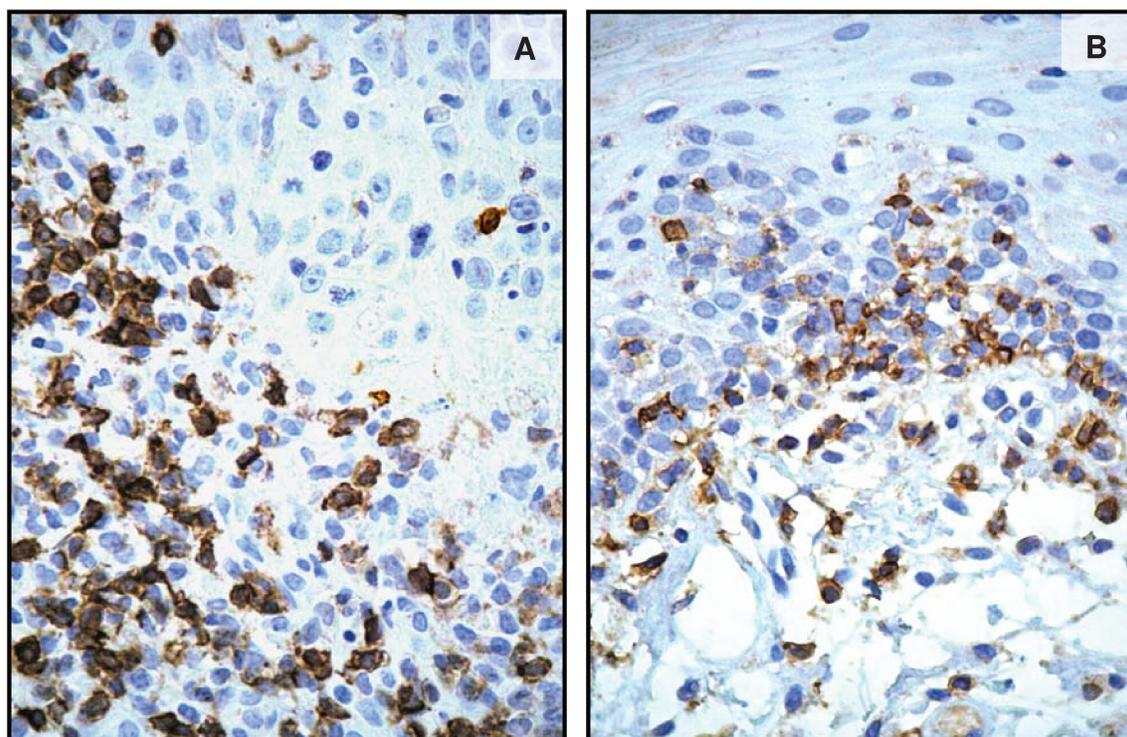
4.2- Dados histológicos semiquantitativos e quantitativos

Não houve diferença estatisticamente importante entre os grupos com relação à quantidade de corpos apoptóticos isolados ou agrupados, nem em relação à extensão da degeneração hidrópica da camada basal. Nas amostras de ambas as doenças, a quantidade de corpos apoptóticos isolados foi significativamente maior do que a de corpos apoptóticos agrupados ($p<0,0001$).

4.3- Dados imuno-histoquímicos

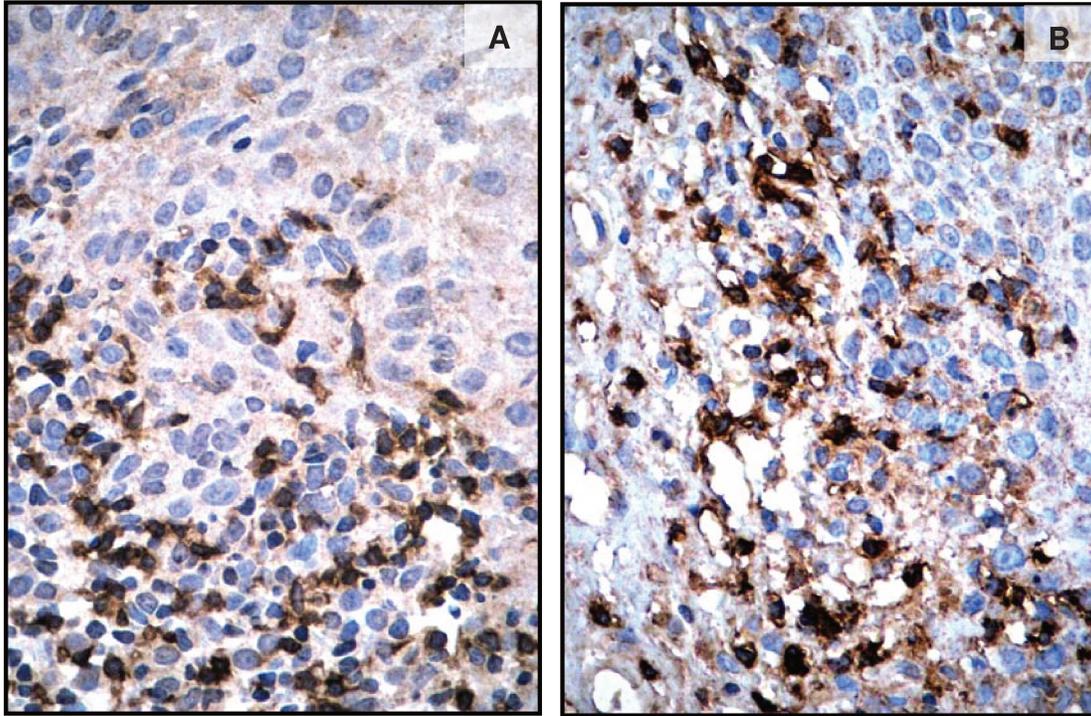
O número médio de células CD4-positivas foi estatisticamente maior no grupo de pacientes com LPO ($p < 0,0001$) (Figura 10). Não houve diferença importante entre os grupos com relação às células imunomarcadas para CD8 (Figura 11), ICAM-1 (Figura 12) e MAC 387 (Figura 13) (Tabela 2).

A razão entre as células positivas para CD4 e as células positivas para CD8 foi de 1,48 para o grupo do LPO e de 0,35 para o grupo de DECHc ($p < 0,0001$).



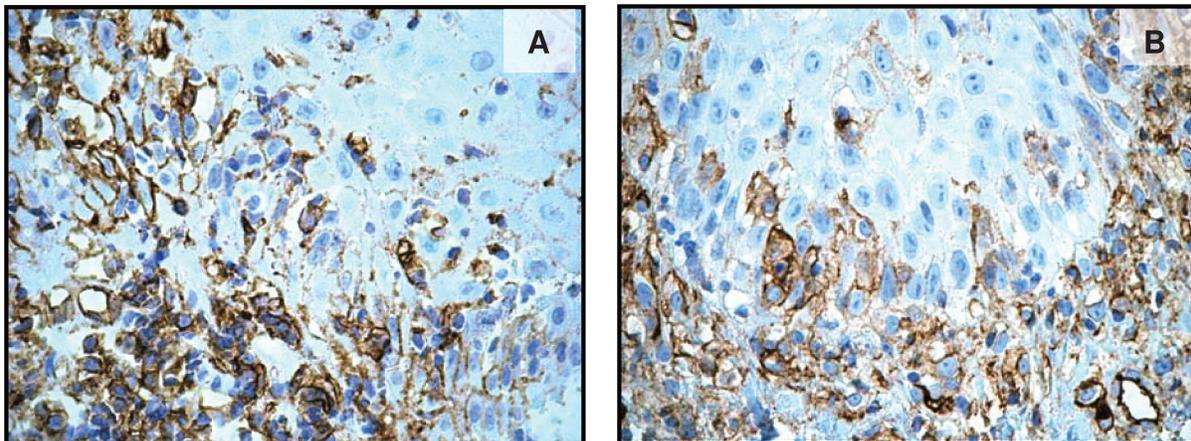
(aumento original x 400)

Figura 10- Reação imuno-histoquímica para CD4 em amostra de LPO (paciente 29) **(A)** e de DECHc oral (paciente 17) **(B)**.



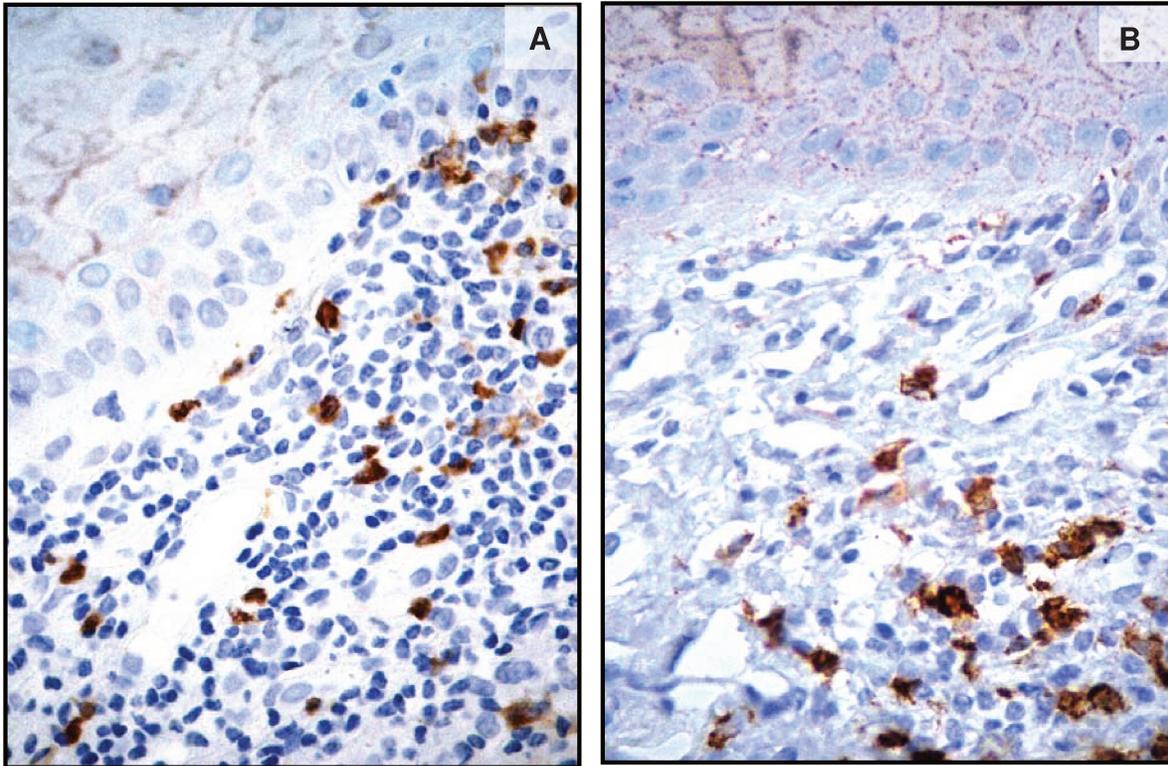
(aumento original x 400)

Figura 11- Reação imuno-histoquímica para CD8 em amostra de LPO (paciente 1) (A) e de DECHc oral (paciente 6) (B).



(aumento original x 400)

Figura 12- Reação imuno-histoquímica para ICAM-1 em amostra de LPO (paciente 28) (A) e de DECHc oral (paciente 25) (B).



(aumento original x 400)

Figura 13- Reação imuno-histoquímica para MAC 387 em amostra de LPO (paciente 11) **(A)** e de DECHc oral (paciente 21) **(B)**.

Observou-se que o número de células perforina-positivas e granzima B-positivas no epitélio das amostras de DECHc foi significativamente maior do que nas amostras de LPO ($p=0,01$ e $p=0,006$ respectivamente) (Tabela 2 e Gráfico 1). No cório subepitelial, essa diferença não se reproduziu. A soma das células positivas no epitélio e no cório, tanto para perforina (Figura 14) como para granzima B (Figura 15), também foi estatisticamente maior na DECHc do que no LPO ($p=0,03$ e $p=0,02$, respectivamente). Nas amostras de ambas as doenças, o número de células positivas tanto para granzima ($p=0,0001$ no LPO e $p=0,0004$ na DECHc) quanto para perforina ($p<0,0001$ no LPO e $p=0,03$ na DECHc) foi maior no cório do que no epitélio.

Tabela 2- Células/mm² positivas para os marcadores imuno-histoquímicos nas amostras de LPO e DECHc oral.

Marcadores	LPO (média ± DP)	DECHc (média ± DP)	Valor de p
CD4	2812,36 ± 1461,00	685,16 ± 561,32	p<0,0001
CD8	2208,68 ± 876,28	2005,69 ± 798,68	p=0,37
CD4/CD8	1,48 ± 1,05	0,35 ± 0,24	p<0,0001
ICAM-1	1631,59 ± 1186,71	1421,34 ± 871,20	p= 0,45
MAC 387	317,97 ± 316,39	291,93 ± 264,25	p=0,73
Granzima B epitélio	27,87 ± 33,70	69,01 ± 74,44	p=0,01
Granzima B tecido conjuntivo	93,95 ± 88,79	145,30 ± 134,92	p=0,10
Granzima B total	121,83 ± 107,49	214,31 ± 195,82	p=0,03
Perforina epitélio	24,72 ± 31,52	68,29 ± 71,97	p=0,006
Perforina tecido conjuntivo	58,73 ± 50,56	93,11 ± 91,75	p=0,09
Perforina total	83,44 ± 74,70	161,41 ± 154,40	p=0,02

DP: Desvio-padrão

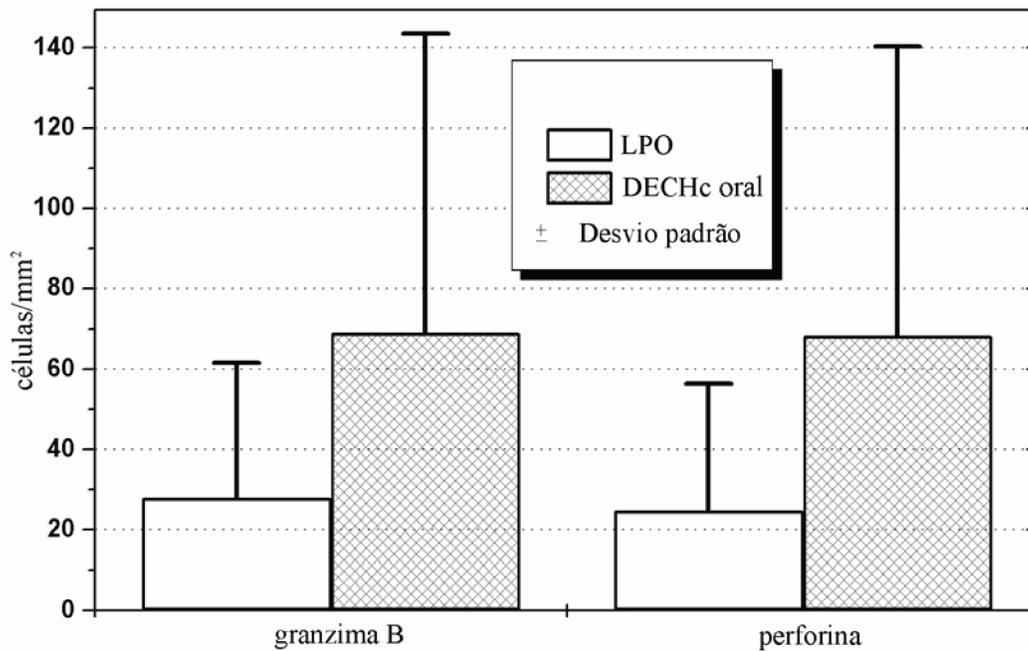
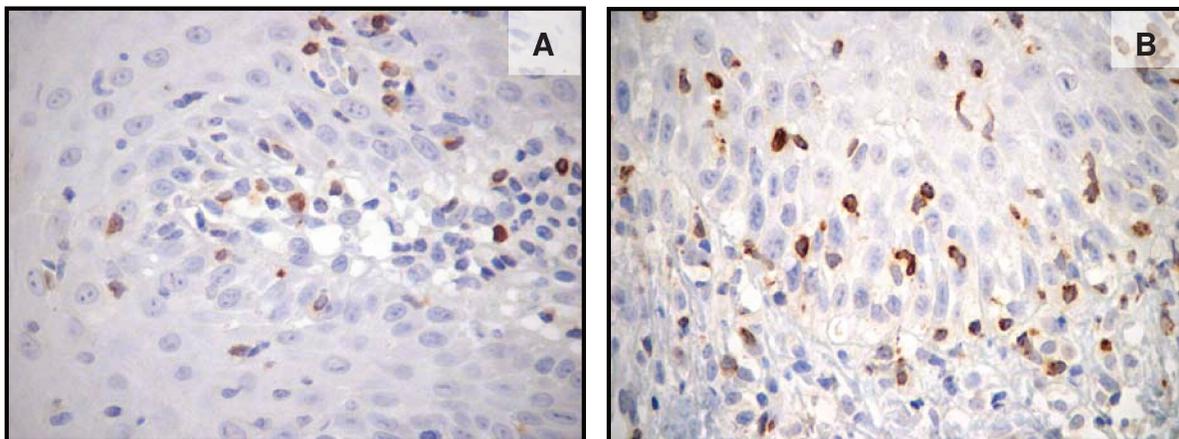
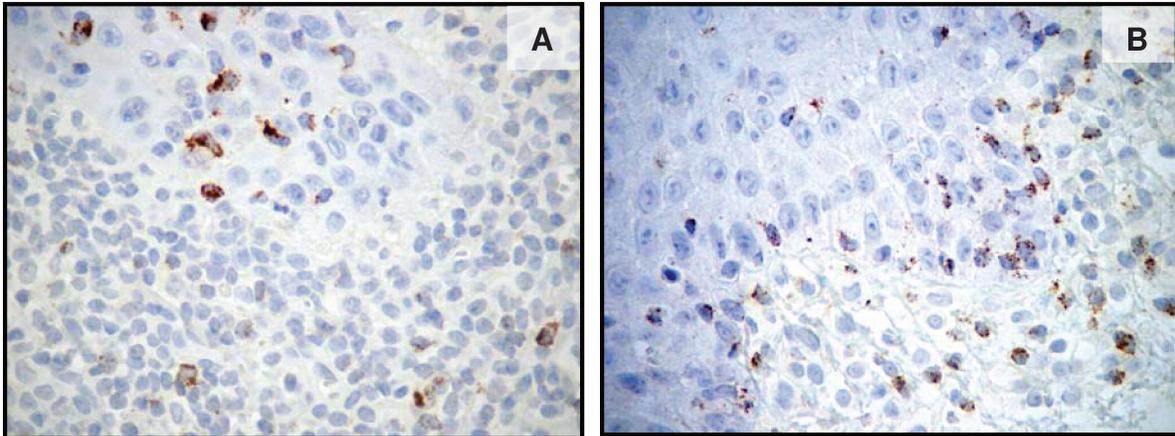


Gráfico 1- *Box plot* demonstrando células/mm² imunomarcadas pela granzima B (esquerda) e perforina (direita) na espessura do epitélio, nas amostras de LPO e DECHc oral (Teste t de *Student*, $p < 0,05$).



(aumento original x 400)

Figura 14- Reação imuno-histoquímica para perforina em amostra de LPO (paciente 11) **(A)** e de DECHc oral (paciente 25) **(B)**.



(aumento original x 400)

Figura 15- Reação imuno-histoquímica para granzima B em amostra de LPO (paciente 29) **(A)** e de DECHc oral (paciente 25) **(B)**.

Por meio da análise do coeficiente de correlação de Pearson, observou-se que quanto maior o número de células perforina-positivas, maior o número de células granzima-B positivas tanto no epitélio ($r=0,42$ no LPO e $r=0,57$ na DECHc) como no tecido conjuntivo subepitelial ($r=0,43$ no LPO e $r=0,51$ na DECHc) nos dois grupos de doenças ($p<0,05$) (Gráficos 2 e 3).

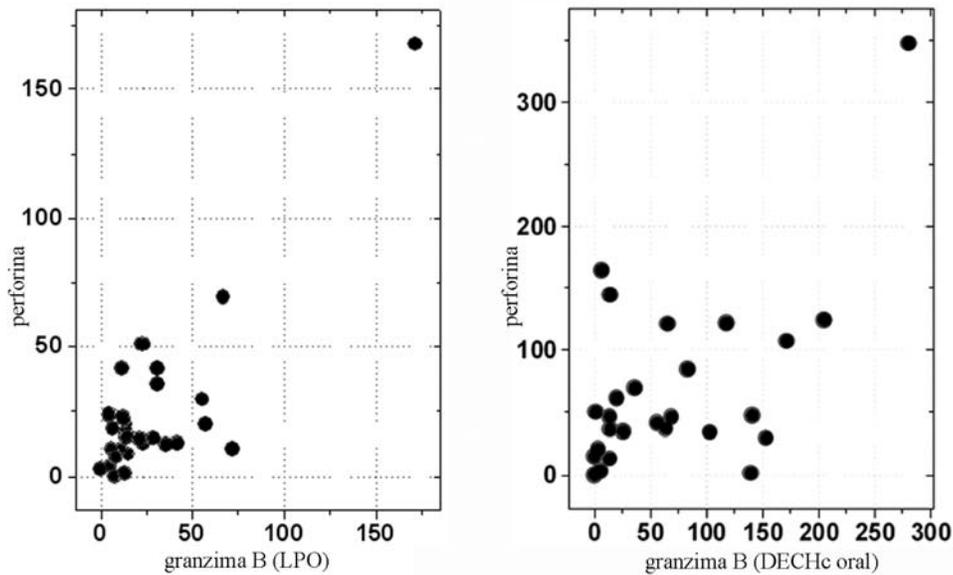


Gráfico 2- Número de células perforina-positivas e granzima B-positivas no epitélio do LPO (esquerda) e da DECHc oral (direita) (Coeficiente de Pearson, $p < 0,05$).

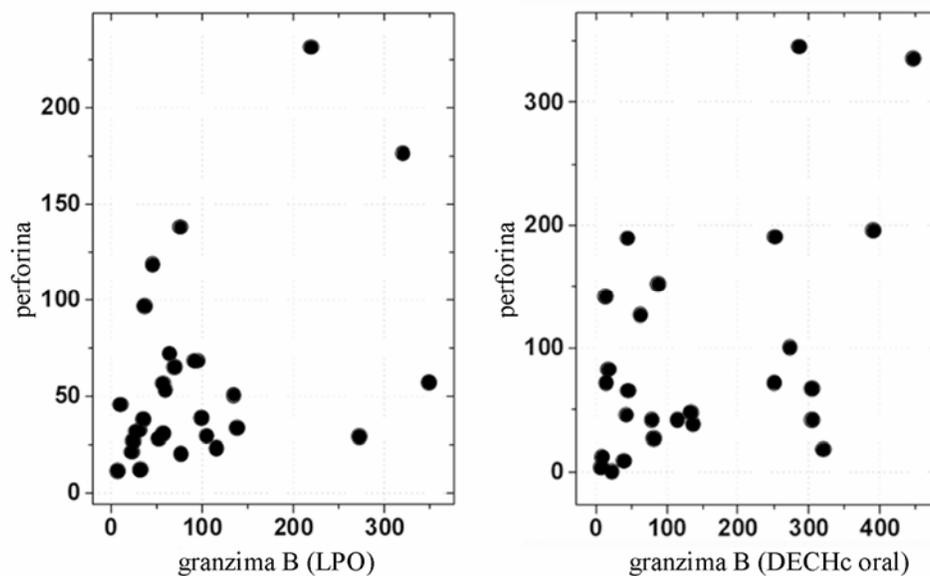


Gráfico 3- Número de células perforina-positivas e granzima B-positivas no tecido conjuntivo do LPO (esquerda) e da DECHc oral (direita) (Coeficiente de Pearson, $p < 0,05$).

Nos pacientes com LPO, quando as lesões foram agrupadas segundo a fase de desenvolvimento (ativas e em regressão), não foram encontradas diferenças significantes quanto ao número de células positivas para granzima B, perforina, CD8, ICAM-1 e MAC 387, nem para a quantidade de corpos apoptóticos isolados ou para a intensidade de degeneração hidrópica da camada basal (Tabela 3). No entanto, foi encontrada maior quantidade de células CD4-positivas nas lesões ativas ($p=0,03$) e maior quantidade de corpos apoptóticos agrupados nas lesões em regressão ($p=0,005$).

Nos pacientes com DECHc, foi encontrado maior número de células CD8-positivas nas lesões ativas quando comparadas às lesões em regressão ($p=0,02$), maior número de células perforina-positivas no epitélio das lesões ativas ($p=0,008$) e maior quantidade de corpos apoptóticos agrupados nas lesões em regressão ($p=0,03$). Não houve diferença significativa para as demais variáveis (Tabela 4).

Tabela 3- Análise dos marcadores agrupados segundo a fase da lesão nos pacientes com LPO.

Marcadores	Lesão ativa (média ± DP)	Lesão em regressão	Valor de p
CD4	3459,35 ± 1415,73	2286,68 ± 1312,81	p=0,03
CD8	2455,93 ± 779,65	2007,78 ± 922,52	p=0,16
ICAM-1	1548,70 ± 1233,18	1698,94 ± 1183,81	p=0,74
MAC 387	340,55 ± 331,47	299,62 ± 313,30	p=0,73
Granzima B epitélio	37,20 ± 45,66	20,29 ± 17,75	p=0,22
Granzima B tecido conjuntivo	105,30 ± 71,85	84,73 ± 101,91	p=0,53
Granzima B total	142,5 ± 103,17	105,03 ± 111,27	p=0,35
Perforina epitélio	30,93 ± 45,35	19,69 ± 12,20	p=0,40
Perforina tecido conjuntivo	59,50 ± 56,16	58,11 ± 47,43	p=0,94
Perforina total	90,41 ± 99,48	77,79 ± 49,25	p=0,68
Corpos apoptóticos isolados	28,27 ± 23,09	20,98 ± 22,68	p=0,40
Corpos apoptóticos agrupados	0,28 ± 0,50	1,26 ± 1,13	p=0,005
Degeneração hidrópica	71,19 ± 15,99	67,05 ± 22,03	p=0,56

DP: Desvio-padrão

Tabela 4- Análise dos marcadores agrupados segundo a fase da lesão nos pacientes com DECHc oral.

Marcadores	Lesão ativa (média ± DP)	Lesão em regressão (média ± DP)	Valor de p
CD4	716,16 ± 584,74	548,73 ± 473,66	p=0,52
CD8	2131,49 ± 819,33	1451,65 ± 388,93	p=0,02
ICAM-1	1514,90 ± 902,54	1009,66 ± 629,94	p=0,17
MAC 387	268,14 ± 242,44	396,63 ± 358,46	p=0,48
Granzima B epitélio	70,45 ± 77,80	62,98 ± 65,69	p=0,83
Granzima B tecido conjuntivo	145,26 ± 138,00	145,48 ± 136,23	p=1,00
Granzima B total	215,71 ± 199,49	208,44 ± 201,60	p=0,94
Perforina epitélio	77,37 ± 76,99	28,34 ± 10,57	p=0,008
Perforina tecido conjuntivo	99,15 ± 95,47	66,56 ± 76,04	p=0,43
Perforina total	176,53 ± 164,31	94,90 ± 80,17	p=0,13
Corpos apoptóticos isolados	35,43± 28,27	26,46 ± 23,32	p=0,48
Corpos apoptóticos agrupados	2,30 ± 4,13	10,08 ± 15,13	p=0,03
Degeneração hidrópica	80,02 ± 22,51	47,58 ± 32,07	p=0,08

DP: Desvio-padrão

A análise por meio do coeficiente de correlação de Pearson mostrou, nos pacientes com LPO, uma correlação positiva e significativa entre as células positivas para CD4 e para CD8 ($r=0,38$; $p=0,04$).

Nos pacientes com DEVHc também foi encontrada uma correlação positiva e significativa entre as células positivas para CD4 e CD8 ($r=0,39$; $p=0,04$), e uma correlação negativa entre as células imunomarcadas para CD8 e a idade ($r=-0,53$; $p=0,004$), ou seja, quanto maior a idade dos pacientes, menor o número de células CD8-positivas e vice-versa. Foram ainda observadas correlações positivas e significantes entre as células positivas para CD8 com as positivas para ICAM-1 ($r=0,53$; $p=0,004$), com o número de corpos apoptóticos isolados ($r=0,57$;

p=0,0016) e com o grau de degeneração hidrópica da camada basal (r=0,52; p=0,0056). Correlações positivas e estatisticamente importantes também foram encontradas entre as células positivas para MAC 387 e aquelas positivas para perforina no tecido conjuntivo (r=0,59; p=0,001) e com o número de corpos apoptóticos agrupados (r=0,59; p=0,001).

Na análise por meio da regressão linear múltipla, o número de corpos apoptóticos isolados dos pacientes com LPO apresentou uma correlação positiva e significativa ($R^2=0,30$) com o número de células positivas para a granzima B do tecido conjuntivo (p= 0,003) e negativa com o número de células imunomarcadas para perforina do tecido conjuntivo (p=0,005), ou seja, quanto maior o número de corpos apoptóticos isolados maior o número de células positivas para granzima e menor o número de células positivas para a perforina no tecido conjuntivo. Neste mesmo grupo, foi encontrado que os corpos apoptóticos agrupados apresentavam uma correlação positiva ($R^2=0,34$) com as lesões em regressão (p=0,01) e negativa com a perforina do tecido conjuntivo (p=0,03). Para os pacientes com DECHc, foi demonstrada uma correlação negativa ($R^2=0,25$) entre os corpos apoptóticos isolados e a idade (p=0,009). Além disso, os corpos apoptóticos agrupados mostraram uma correlação positiva ($R^2=0,32$) com a perforina do tecido conjuntivo (p=0,009) e com as lesões em regressão (p=0,01).



5- DISCUSSÃO

O sistema imune tem uma participação fundamental na patogênese das lesões liquenóides orais da DECHc e do LP (1, 2, 7). Em ambas as doenças, o infiltrado inflamatório consiste principalmente de linfócitos T. Estudos ultraestruturais têm demonstrado íntimo contato entre os linfócitos T e as células epiteliais em processo de degeneração (53, 54), sugerindo a sua participação na indução da apoptose dos ceratinocitos.

É conhecido que as biopsias de mucosa oral, nos pacientes com DECHc, exibem um infiltrado inflamatório com um número menor de células T CD3+ quando comparadas às de LPO, que mostram um infiltrado celular intenso. Os resultados encontrados no presente estudo alinham-se aos da literatura (66, 67). Adicionalmente, em 34,5% das amostras de LPO, o infiltrado se estendia profundamente no tecido conjuntivo, enquanto que, em 100% das amostras de DECH esse infiltrado estava limitado à superfície. Uma hipótese para explicar a diferença na intensidade do infiltrado entre as doenças é a diminuição no número das células inflamatórias secundária ao estado de imunossupressão que estes pacientes com DECHc apresentam. A doença do enxerto contra o hospedeiro, na fase crônica, alia dois estados: de autoimunidade e imunossupressão. Soma-se a isto, a depleção imune decorrente do período de condicionamento pré-transplante e do tratamento instituído, para a profilaxia da DECH, no período pós-TMO. A ciclosporina, por exemplo, atua inibindo a produção de IL-2 pelos linfócitos T (1). Essa citocina é o principal fator de crescimento autócrino e de diferenciação para a maioria das células T (29), e a sua inibição, portanto, resulta em importante diminuição na reatividade destas células. Os corticóides, por outro lado, diminuem diversas atividades importantes dos leucócitos circulantes (1). Por isto, a associação de ciclosporina com prednisona é frequentemente utilizada como terapia de profilaxia pós-TMO (68), como o foi nestes pacientes.

Existem diversos estudos sobre o infiltrado de células T em ambas as doenças, porém com resultados conflitantes, ora mostrando predomínio de linfócitos T CD4, ora maior acúmulo de linfócitos T CD8. No presente estudo, o número de células CD4-positivas foi estatisticamente maior no grupo de

pacientes com LPO, não sendo observada diferença importante entre os grupos quanto ao número de células CD8-positivas. Além disso, a razão CD4/CD8 foi de 1,48 nos pacientes com LPO e de 0,35 nos pacientes com DECHc, demonstrando um predomínio dos linfócitos T CD8+ neste último grupo. Mattsson et al. (66) encontraram um número estatisticamente maior tanto de linfócitos CD4 quanto de CD8 nas amostras de LPO quando comparadas às de DECHc oral, porém com predomínio de linfócitos T CD4+ em ambos os grupos. A razão CD4/CD8 encontrada por estes autores foi de 5:1 nas amostras de LPO e de 6:1 nas amostras de DECHc oral. Hasséus et al. (1) encontraram resultados semelhantes a Mattsson et al. (66), porém com taxas de CD4/CD8 de 1,17 e de 1,94 no tecido conjuntivo e no epitélio das lesões de LPO, respectivamente, e taxas de 1,21 e de 0,74 no tecido conjuntivo e epitélio das lesões de DECHc oral. Já Sato et al. (25) não encontraram diferenças importantes entre as doenças tanto em relação ao número de células CD4+ quanto ao número de células CD8+, porém observaram um predomínio de linfócitos CD8+ em ambos os grupos. Em estudos analisando cada doença separadamente, predomínio de linfócitos CD4+ em amostras cutâneas de LP também foi encontrado por Kastelan et al. (56), Ammar et al. (58) e Prpic Massari et al. (55) e maior número de células CD8+ em amostras de DECHc oral foi demonstrado por Fujii et al. (53) e por Soares et al. (27). As razões para a diversidade entre as taxas encontradas de linfócitos T auxiliares/T citotóxicos são desconhecidas, porém podem estar relacionadas a diferenças na técnica de imuno-histoquímica utilizada, ao número de amostras incluídas em cada estudo ou ainda a diferenças nas características das amostras avaliadas (27). Outro fator que pode interferir na composição do infiltrado inflamatório é a fase de atividade da amostra coletada (1, 69). No presente estudo, foi encontrado um maior número de linfócitos CD4+ nas lesões ativas do LPO e maior número de linfócitos TCD8+ nas lesões orais ativas da DECHc quando comparadas às lesões em regressão, não alterando portanto os resultados globais encontrados. Além disso, uma correlação positiva entre estes dois subtipos de linfócitos foi observada em ambas as doenças, ou seja, quanto maior o número células CD4+, maior o número de células CD8+ e vice-versa. Independentemente do grupo de

células predominante, os resultados encontrados sugerem uma interação funcional entre os dois subtipos de linfócitos no desenvolvimento de ambas as doenças (56), já que na fase inicial das lesões ocorre a apresentação de antígenos associados ao MHC classe II aos linfócitos auxiliares T CD4+, seguido pela apoptose dos ceratinocitos desencadeada pelos linfócitos citotóxicos T CD8+. O ponto de equilíbrio entre essas ações, auxiliar e citotóxica, dos subtipos de linfócitos T, pode determinar o comportamento clínico da doença (8).

Os linfócitos T CD8+ têm sido considerados os principais efetores das lesões liquenóides estudadas. Em estudos ultraestruturais de DECHc oral, demonstrou-se que ceratinocitos ligados a células expressando marcador de linfócito T citotóxico apresentavam vários graus de degeneração, enquanto ceratinocitos ligados a células expressando marcador de padrão T auxiliar mostravam-se preservados (53). Além disso, em amostras de LPO, foi demonstrado que, nas regiões de integridade da membrana basal, os linfócitos T CD8 concentravam-se na lâmina própria com poucas células intraepiteliais. Em contraste, grupos de linfócitos T CD8 foram encontrados na camada basal nas áreas de interrupção da membrana, sendo o número total destas células significativamente maior do que nas áreas de membrana preservada (11). No presente trabalho, foi observado que, nas amostras de DECHc oral, as células CD8-positivas apresentaram uma correlação positiva e importante com o número de corpos apoptóticos isolados e com o grau de degeneração hidrópica da camada basal, reafirmando as evidências encontradas na literatura.

Diversos estudos têm abordado a importância das células T regulatórias na prevenção de doenças autoimunes em modelos experimentais com ratos. São linfócitos CD4+ que expressam altos níveis de receptor de cadeia α de IL-2 (CD25) (29). Estas células parecem ter um papel crucial no controle da resposta imune, facilitando o estabelecimento da tolerância dos linfócitos T a allo e a autoantígenos associados ao complexo maior de histocompatibilidade.

Uma das dificuldades para a melhor compreensão e caracterização das células T regulatórias CD4+CD25+ é a ausência de um marcador específico, já que células T efetoras CD4+ e CD8+ também podem expressar CD25+ quando ativadas (24, 70). Neste sentido, um avanço importante foi a identificação de que as células T regulatórias expressam preferentemente um fator de transcrição nuclear chamado Foxp3 (do inglês *forkhead box p3*) (71). Estudos recentes têm demonstrado que pacientes que desenvolveram doença do enxerto (allogênico ou autólogo) contra o hospedeiro crônica têm níveis de transcrição de RNAm de Foxp3 significativamente menor do que pacientes sem qualquer evidência clínica de DECH. Nos pacientes com DECH aguda, demonstrou-se que a expressão do Foxp3 correlacionou-se inversamente com o grau desta doença. A análise sequencial de pacientes que desenvolveram DECH aguda e evoluíram para DECH crônica revelou que os níveis de Foxp3 estavam consideravelmente reduzidos durante a fase de atividade da doença, retornando aos níveis normais depois da resolução da DECH. Os níveis da expressão do gene Foxp3 também estavam reduzidos de forma significativa em pacientes que desenvolveram DECH crônica após o TMO allogênico (24).

Hasséus et al. (1) encontraram um número significativamente maior de células CD25+ nas amostras de LPO do que nas amostras orais de DECHc. Porém o fenótipo destas células não foi caracterizado com relação ao Foxp3. Na amostra do presente trabalho, esta caracterização também seria interessante, já que foi encontrado um número estatisticamente maior de células CD4+ nos espécimes de LPO do que nos espécimes de DECHc. Estas células podem representar tanto células T efetoras ativadas, quanto células T regulatórias.

Neste trabalho, foi utilizado o anticorpo monoclonal MAC 387 para avaliar os macrófagos. Este anticorpo identifica pequenos histiócitos derivados do sangue, ativados e recém-chegados ao sítio inflamatório. Sua presença indica inflamação crônica em plena atividade, associada à produção de citocinas (72). Na amostra estudada, não foi encontrada diferença importante entre LPO e DECHc oral com relação ao número de macrófagos MAC 387+. Mattson et al. (66)

relataram uma frequência menor que 1% para os macrófagos no infiltrado inflamatório das suas amostras de ambas as doenças. Já Sato et al. (25) encontraram resultados semelhantes ao do presente trabalho, tendo sido utilizado como marcador o CD68. O resultado encontrado, associado à demonstração, por outros autores (25, 27), de um número maior de macrófagos em ambas as doenças quando comparadas à mucosa normal, sugere um importante papel destas células como apresentadoras de allo e/ou autoantígenos no LPO e na DECHc.

Foi observado ainda que, no tecido conjuntivo das amostras com DECHc, as células expressando MAC 387 demonstraram uma correlação positiva com o número de células imunomarcadas para perforina e com o número de corpos apoptóticos agrupados. Este achado pode sugerir uma participação mais importante dos macrófagos no desencadeamento da apoptose nesta doença. Embora a expressão de granzima B *in vivo* já tenha sido demonstrada em macrófagos (73, 74), a expressão de perforina nestas células, até o momento, só foi demonstrada em uma subpopulação de macrófagos CD4+CD8+ em modelo experimental com ratos (75).

A expressão da ICAM-1 não se mostrou diferente entre as amostras de LPO e de DECHc. Alguns estudos têm demonstrado a maior expressão desta molécula em amostras de ambas as doenças quando comparadas a fragmentos de tecidos normais (31, 41), o que é um resultado esperável. Como as moléculas de adesão celular participam tanto do recrutamento das células inflamatórias, como também do controle e manutenção destas células no sítio da inflamação (38), tem sido sugerido uma importante atuação destas moléculas na cronicidade das lesões (31).

Uma correlação positiva e importante foi encontrada entre o número de células expressando a ICAM-1 e os de linfócitos TCD8+ nas amostras de DECHc oral. Considerando que, neste grupo de doença, os linfócitos T CD8+ foram as células predominantes do infiltrado inflamatório e que estas células são consideradas as principais efetoras da citotoxicidade celular, os resultados

encontrados apontam para uma importante contribuição da ICAM-1 na patogênese da DECHc oral.

A importância da citotoxicidade celular mediada pela perforina e granzima B tem sido demonstrada no controle de crescimento de tumores, no controle de infecções por vírus e por bactérias intracelulares, em autoimunidade, na rejeição de tecido estranhos e, mais recentemente, na patogênese de doenças inflamatórias crônicas (43, 44, 48, 76-79).

Os resultados encontrados mostraram maiores concentrações de células expressando a perforina e a granzima B no epitélio e em toda a mucosa (epitélio mais tecido conjuntivo) no grupo de pacientes com DECHc comparativamente ao grupo de pacientes com LPO. Foi aventada a hipótese de que este resultado poderia estar relacionado à fase de desenvolvimento da doença, já que, no grupo de pacientes com DECHc, foi encontrado um número maior de lesões em fase ativa. Porém, no grupo de paciente com DECHc, as lesões ativas apresentaram maior quantidade de células expressando a perforina apenas dentro do epitélio, quando comparadas às lesões em regressão, e a maior concentração de moléculas citotóxicas foi demonstrada na espessura do tecido conjuntivo, em ambos os grupos de doenças. Desta forma, a fase da doença pode ser insuficiente para explicar a diferença encontrada entre os grupos.

Considerando que: **1-** não houve diferença entre LPO e DECHc com relação ao número de linfócitos TCD8+; **2-** a maior expressão das moléculas citotóxicas ocorre neste subtipo de linfócitos e nas células NK (54, 55, 58), o achado de maior concentração de células expressando granzima B e perforina nas amostras de DECHc oral, poderia sugerir uma produção mais importante destas moléculas citotóxicas pelos linfócitos T CD8 da DECH. Outra possibilidade seria uma participação maior das células NK no infiltrado inflamatório desta doença. Este resultado não se traduziu, histologicamente, como maior atividade de interface, já que não houve diferença, entre as doenças, quanto à quantidade de corpos apoptóticos, nem quanto à extensão da degeneração hidrópica.

O presente trabalho também demonstrou uma correlação importante entre o número de células positivas para a perforina e aquelas positivas para a granzima B tanto no epitélio como no tecido conjuntivo subepitelial, em ambas as doenças (LPO e DECHc oral). Este resultado reforça a idéia de que estas moléculas trabalham cooperativamente para induzir o dano à célula-alvo (43, 44, 46, 48, 80). Evidências têm sido acumuladas de que as granzimas são necessárias para o desencadeamento da apoptose da célula-alvo. Embora a perforina não seja indispensável para a entrada da granzima na célula, ela parece ser necessária para a liberação da granzima no citosol e para o transporte desta molécula em direção ao núcleo (43, 44, 46, 48). A perforina, por sua vez, pode causar a lise da célula-alvo, mas não a fragmentação do DNA (54, 81). Apesar da importância vital destas moléculas, a base da interação entre a perforina e a granzima ainda precisa ser elucidada.

No grupo do LPO, quanto maior o número de corpos apoptóticos isolados maior o número de células positivas para granzima e menor o número de células positivas para a perforina no tecido conjuntivo. Uma correlação negativa entre o número de corpos apoptóticos agrupados e as células perforina-positivas do tecido conjuntivo também foi observada. Estes achados indicam que a granzima B tem uma direta participação no mecanismo da apoptose no LPO e são concordantes com aqueles relatados por Shimizu et al (54). Estes autores demonstraram que a maioria das células que integravam o infiltrado dérmico, das lesões cutâneas de LP, foram granzima B-positivas; esta molécula foi observada sendo secretada de um linfócito para um ceratinócito em apoptose (54). Os resultados do presente estudo diferem daqueles encontrados por Santoro et al. (57), que demonstraram uma correlação significativa entre o índice apoptótico e as células perforina-positivas em amostras cutâneas e orais de LP. Esses autores usaram como índice apoptótico a razão entre células ssDNA-positivas e corpos apoptóticos em pelo menos 5 campos de grande aumento. Talvez a divergência entre os resultados possa ser atribuída à diferença na metodologia utilizada.

Tanto no LPO quanto na DECHc foi observada uma maior quantidade de corpos apoptóticos agrupados nas lesões em regressão. Este resultado sugere que, com o passar do tempo e diminuição da atividade inflamatória, os corpos apoptóticos devem ir agregando-se. Talvez este processo possa facilitar a remoção destas estruturas na mucosa.

Com relação à DECH oral, foi observado que a idade se correlaciona de forma negativa com o número de corpos apoptóticos isolados e com o número de células CD8-positivas. Este achado pode indicar a ocorrência de doença oral mais grave em indivíduos mais jovens. Contudo, devemos considerar que somente 2 (7,69%) dos nossos pacientes com DECHc tinham menos de 18 anos de idade e que, portanto, estamos estudando as diferenças etárias numa população de adultos. É de longa data, conhecido que a idade mais avançada, tanto do doador como do receptor, associa-se a um maior risco de incidência e de gravidade da DECH crônica nos órgãos em geral (16). Porém, não foram encontrados estudos que confirmem especificamente a influência da idade na gravidade do curso clínico da DECHc oral. Ainda, nas amostras com DECHc, foi encontrada uma correlação positiva entre o número de corpos apoptóticos agrupados com o de células perforina⁺ do tecido conjuntivo. Este resultado aponta para uma importante diferença entre os grupos: enquanto no LPO a apoptose parece correlacionar-se com a ação da granzima B, na DECHc oral, esta relação parece ser mais importante com a perforina. Higaki et al (62) e Takata et al. (61) obtiveram resultados diferentes. Estes autores acharam poucas células perforina-positivas nos seus casos de DECH oral; contudo estes estudos se basearam, somente, na análise de 2 e 3 amostras de biopsias orais de DECHc, respectivamente.

Os resultados encontrados indicam que, embora a manifestação oral do líquen plano e da doença do enxerto contra o hospedeiro crônica seja semelhante nas suas características clínicas e histológicas, parece haver diferenças na patogênese destas doenças.



6- CONCLUSÃO

RESUMO

- 1- Foi encontrada diferença significativa entre as amostras de LPO e DECHc oral com relação à fase da doença, intensidade e distribuição do infiltrado inflamatório. A quantidade de corpos apoptóticos e a extensão da degeneração hidrópica da camada basal não foram diferentes entre os grupos;
- 2- O número médio de células CD4-positivas foi estatisticamente maior nas amostras de LPO do que nas de DECHc oral. Não houve diferença, entre as doenças, quanto ao número de células imunomarcadas para CD8;
- 3- Não foram encontradas diferenças entre os grupos estudados com relação ao número de células positivas para MAC 387.
- 4- Não houve diferença entre os grupos estudados com relação às células imunomarcadas para ICAM-1. Contudo, por sua importante correlação com os linfócitos T CD8, a ICAM-1 parece ter uma importante contribuição na patogênese da DECHc oral;
- 5- O número de células positivas tanto para granzima B quanto para a perforina foi estatisticamente maior nas amostras de DECHc oral do que nas amostras de LPO;
- 6- A apoptose, no LPO, parece correlacionar-se mais com a granzima B, enquanto que, na DECHc, mais com a perforina.

CONCLUSÃO

As diferentes formas de interação entre as variáveis estudadas indicam que existem diferenças na patogênese entre LPO e DECHc oral.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- 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;54:516-24.
- 2- Ismail SB, Kumar SKS, Zain RB. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J Oral Sci.* 2007;49(2):89-106.
- 3- Al-Hashimi I, Shifter M, Lockhart PB, Wray D, Brennan M, Migliorati CA, et al. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103:S25.e1-12.
- 4- Pereira ALC, Azulay DR. Dermatoses basicamente papulosas. In: Azulay RD, Azulay DR. *Dermatologia: Azulay & Azulay.* 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p.121-7.
- 5- Daoud MS, Pittelkow MR. Líquen plano. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolf K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB. *Fitzpatrick: Tratado de dermatologia.* 5ª edição. Rio de Janeiro: Revinter; 2005. p.561-77.
- 6- Sampaio SAP, Rivitti EA. Erupções pápulo-pruriginosas e doença enxerto versus hospedeiro. In: Sampaio SAP, Rivitti EA. *Dermatologia.* 2ª edição. São Paulo: Artes Médicas; 2001. p.211-27.
- 7- Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A et al. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(4):350-65.
- 8- Khan A, Farah CS, Savage NW, Walsh LJ, Harbrow DJ, Sugerman PB. Th1 cytokines in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2003;32:77-83.
- 9- Breathnach SM, Black MM. Lichen planus and lichenoid disorders. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. In: *Rook's textbook of dermatology.* 7th edition. USA: Blackwell Publishing; 2004. p.42.1-32.

- 10- Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100:40-51.
- 11- Zhou XJ, Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Seymour GJ. Intra-epithelial CD8+ T cells and basement membrane disruption in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2002;31: 23-7.
- 12- Dekker NP, Lozada-Nur F, Lagenaur LA, MacPhail LA, Bloom CY, Regezi JA. Apoptosis-associated markers in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 1997;26:170-5.
- 13- Woo SB, Lee SJ, Schubert MM. Graft-vs-host Disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(2):201-16.
- 14- Nakamura S, Hiroki A, Shinohara M, Gondo H, Ohyama Y, Mouri T, et al. Oral involvement in chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;82:556-63.
- 15- Vogelsang GB, Wagner JE. Graft-versus-host disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1990;4(3):625-39.
- 16- Shubert MM, Correa MEP. Oral graft-versus-host disease. *Dent Clin N Am.* 2008;52: 79-109.
- 17- Billingham RE. The biology of graft-versus-host reaction. *Harvey Lect.* 1966- 67;62: 21-78.
- 18- Carneiro SCS, Azulay DR, Azulay RD. Doenças auto-imunes de interesse dermatológico. In: Azulay RD, Azulay DR. *Dermatologia: Azulay & Azulay.* 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p.483-501.

- 19- Ichiki Y, Bowlus CL, Shimoda S, Ishibashi H, Vierling JM, Gershwin ME. T cell immunity and graft-versus-host disease (GVHD). *Autoimmun Rev.* 2006;5(1):1-9.
- 20- Nicolatou-Galitis O, Kitra V, Van Vliet-Constantinidou C, Peristeri J, Goussetis E, Petropoulos D, Grafakos S. The oral manifestations of chronic graft-versus-host disease (cGVHD) in paediatric allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Oral Pathol Med.* 2001;30(3):148-53.
- 21- Ratanatharathorn V, Ayash L, Lazarus HM, Fu J, Uberti JP. Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28(2):121-9.
- 22- Deeg HJ, Storb Rainer. Graft-versus-host disease: pathophysiological and clinical aspects. *Annu Rev Med.* 1984;35:11-24.
- 23- Horwitz ME, Sullivan KM. Chronic graft-versus-host disease. *Blood Ver.* 2006;20:15-27.
- 24- Hess AD. Modulation of graft-versus-host disease: role of regulatory T lymphocytes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12:13-21.
- 25- 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;35:33-6.
- 26- Sale GE, Shulman HM, Shubert MM, Sullivan KM, Kopecky KJ, Hackman RC, et al. Oral and ophthalmic pathology of graft versus host disease in man: predictive value of the lip biopsy. *Hum Pathol.* 1981;12(11):1022-30.
- 27- Soares AB, Faria PR, Magna LA, Correa MEP, de Souza CA, Almeida OP, Cintra ML. Chronic GVHD in minor salivary glands and oral mucosa: histopathological and immunohistochemical evaluation of 25 patients. *J Oral Pathol Med.* 2005;34:368-73.

- 28- Kim KM, Han KJ, Kang CS, Shim SI. Graft-versus-host disease - clinical and pathological analysis of 11 biopsy proven cases. *J Korean Med Sci.* 1994;9(5):382-7.
- 29- Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular.* 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.17-40; 83-107; 169-195; 225-248; .
- 30- Deguchi M, Aiba S, Ohtani H, Nagura H, Tagami H. Comparison of the distribution and numbers of antigen-presenting cells among T-lymphocyte-mediated dermatoses: CD1a+, factor XIIIa+, and CD68+ cells in eczematous dermatitis, psoriasis, lichen planus and graft-versus-host disease. *Arch Dermatol Res.* 2002;294:297-302.
- 31- Regesi JA, Dekker NP, MacPhail LA, Lozada-Nur F, McCalmont TH. Vascular adhesion molecules in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;81:682-90.
- 32- Collins T. Inflamação aguda e crônica. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional.* 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.44-78.
- 33- Von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *New Engl J Med.* 2000;343(14):1020-34.
- 34- Cabrijan L, Batinac T, Lenkovic M, Gruber F. The distinction between lesional and non-lesional skin in psoriasis vulgaris through expression of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1. *Medl Hypotheses.*2009;72(3):327-9.
- 35- Wysocki CA, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood.* 2005;105:4191-9.
- 36- Dustin ML, Bivona TG, Philips MR. Membranes as messengers in T cell adhesion signaling. *Nature Immunol.* 2004;5(4):363-72.

- 37- Panoskaltis-Mortari A, Hermanson JR, Haddad IY, Wangenstreen OD, Blazar BR. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) deficiency segregates the unique pathophysiological requirements for generating idiopathic pneumonia syndrome (IPS) versus graft-versus-host disease following allogeneic murine bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.*2001;7(7):368-77.
- 38- Groves RW, Ross EL, Barker JNWN, MacDonald DM. Vascular cell adhesion molecule-1: expression in normal and diseased skin and regulation in vivo by interferon gamma. *J Am Acad Dermatol.* 1993;29:67-72.
- 39- Bennion SD, Middleton MH, David-Bajar KM, Brice S, Norris DA. In three types of interface dermatitis, different patterns of expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) indicate different triggers of disease. *J Invest Dermatol.* 1995;105(1 Suppl): 71S-79S.
- 40- Christofidou-Solomidou M, Albelda SM, Bennett FC, Murphy GF. Experimental production and modulation of human cytotoxic dermatitis in human-murine chimeras. *Am J Pathol.* 1997;150(2):631-9.
- 41- Yamada H, Chihara J, Hamada Ken, Matsukura M, Yudate T, Maeda K et al. Immunohistology of skin and oral biopsies in graft-versus-host disease after bone marrow transplantation and cytokine therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100:S73-6.
- 42- Miura Y, Thoburn CF, Briht EC, Hess AD. Cytolytic effector mechanisms and gene expression in autologous graft-versus-host disease: distinct roles of perforin and fas ligand. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004;10:156-70.
- 43- Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:735-47.
- 44- Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:361-70.

- 45- Bolitho P, Voskoboinik I, Trapani JA. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:339-47.
- 46- Pipkin ME, Lieberman J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:301-8.
- 47- Henter JI. Biology and treatment of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: importance of perforin in lymphocyte-mediated cytotoxicity and triggering of apoptosis. *Med Pediatr Oncol.* 2002;38:305-9.
- 48- Trapani JA, Davis J, Sutton VR, Smyth MJ. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:323-9.
- 49- Catafalmo M., Henkart, PA. Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:522-7.
- 50- Maeda Y, Levy RB, Reddy Y, Reddy P, Liu C, Clouthier SG, Teshima T, et al. Both perforin and fas ligand are required for the regulation of alloreactive CD8+ T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2005;105: 2023-7.
- 51- Metkar SS, Wang B, Aguilar-Santelises M, Raja SM, Uhlin-Hansen L, Podack E, Trapani JA. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity.* 2002;16(3):417-28.
- 52- Raja SM, Metkar SS, Froelich C. Cytotoxic granule-mediated apoptosis: unraveling the complex mechanism. *Curr Opin Immunol.* 2003,15:528-32.
- 53- Fujii H, Ohashi M, Nagura H. Immunohistochemical analysis of oral lichen-planus-like eruption in graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Am J Clin Pathol.* 1988;89:177-86.
- 54- Shimizu M, Higaki Y, Higaki M, Kawashima M. The role of granzyme B-expressing CD8-positive T cells in apoptosis of keratinocytes in lichen planus. *Arch Dermatol Res.* 1997;289:527-32.

- 55- Prpic Massari L, Kastelan M, Gruber F, Laskarin G, Sotosek Tokmadzic V, Strbo N, et al. Perforin expression in peripheral blood lymphocytes and skin-infiltrating cells in patients with lichen planus. *Br J Dermatol.* 2004;151:433-9
- 56- Kastelan M, Prpic Massari L, Gruber F, Zamolo G, Zauhar G, Coklo M, et al. The role of perforin-mediated apoptosis in lichen planus lesions. *Arch Dermatol Res.* 2004;296: 226-30.
- 57- Santoro A, Majorana A, Bardellini E, Gentili F, Festa S, Sapelli P, et al. Cytotoxic molecule expression and epithelial cell apoptosis in oral and cutaneous lichen planus. *Am J Clin Pathol.* 2004;121:758-64.
- 58- Ammar M, Mokni M, Boubaker S, El Goiaed A, Ben Osman A, Louzir H. Involvement of granzyme B and granulysin in the cytotoxic response in lichen planus. *J Cutan Pathol.* 2008;35:630-4.
- 59- Graubert TA, Russell JH, Ley TJ. The role of granzyme B in murine models of acute graft-versus-host disease and graft rejection. *Blood.* 1996;87(4):1232-7.
- 60- Graubert TA, DiPersio JF, Russell JH, Ley TJ. Perforin/granzyme-dependent and independent mechanisms are both important for the development of graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. *J Clin Invest.* 1997;100:904-11.
- 61- Takata M. Immunohistochemical identification of perforin-positive cytotoxic lymphocytes in graft-versus-host disease. *Am J Clin Pathol.* 1995;103:324-9.
- 62- Higaki Y, Yamada O, Okamura T, Mizoguchi H, Kawashima M. Granzyme-B-containing lymphocyte involvement in epidermal injury in graft-versus-host disease. *Dermatology.* 2001;202:94-8.
- 63- Imanguli MM, Swaim WD, League SC, Gress RE, Pavletic SZ, Hakim FT. Increased T-bet+ cytotoxic effectors and type I interferon-mediated processes in chronic graft-versus-host disease of the oral mucosa. *Blood.* 2009;113:3620-30.

- 64- Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald MD, Striker GE, Sale GE, et al. Chronic graft-versus-host disease in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med.* 1980;69:204-17.
- 65- Horn TD, Rest EB, Mirenski Y, Corio RL, Zahurak ML, Marianna L, et al. The significance of oral mucosal and salivary gland pathology after allogeneic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol.* 1995;131:964-5.
- 66- Mattsson T, Sundqvist KG, Heimdahl A, Dahllöf G, Ljungman P, Ringdén O. A comparative immunological analysis of the oral mucosa in chronic graft-versus-host disease and oral lichen planus. *Arch Oral Biol.* 1992; 37:539-47.
- 67- Ebrahimi M, Wahlin YB, Coates PJ, Sjöström B, Nylander K. Decreased expression of p63 in oral lichen planus and graft-vs.-host disease associated with oral inflammation. *J Oral Pathol Med.* 2006;35:46-50.
- 68- Gaziev D, Galimberti M, Lucarelli G Polchi P. Chronic graft-versus-host disease: is there an alternative to the conventional treatment? *Bone Marrow Transplant.*2000;25:689-96.
- 69- Thomas DW, Matthews JB, Prime SS. Mucosal cell-mediated immunological changes associated with experimental graft-versus-host disease. *J Oral Pathol Med.* 1996;25(4):145-50.
- 70- Birch KE, Vukmanovic-Stejic M, Reed JR, Akbar AN, Rustin MH. The immunomodulatory effects of regulatory T cells: implications for immune regulation in the skin. *Br J Dermatol.* 2005;152:409-17.
- 71- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):523-32.
- 72- Poston RN, Hussain IF. The immunohistochemical heterogeneity of atheroma macrophages: comparison with lymphoid tissues suggests that recently blood-derived macrophages can be distinguished from longer-resident cells. *J Histochem Cytochem.* 1993;41(10):1503-12.

- 73- Kim WJ, Kim H, Suk K, Lee WH. Macrophages express granzyme B in the lesion areas of atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Immunol Lett.* 2007;111(1):57-65.
- 74- Pardo J, Aguilo JI, Anel A, Martin P, Joeckel L, Borner C, et al. The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes Infect.* 2009;11(4): 452-9.
- 75- Baba T, Iwasaki S, Maruoka T, Suzuki A, Tomaru U, Ikeda H, et al. Rat CD4+CD8+ macrophages kill tumor cells through an NKG2D-and granzyme/perforin-dependent mechanism. *J Immunol.* 2008;180(5):2999-3006.
- 76- Patey-Mariaud de Serre N, Reijasse D, Verkarre V, Canioni D, Colomb V, Haddad E, et al. Chronic intestinal graft-versus-host disease: clinical, histological and immunohistochemical analysis of 17 children. *Bone Marrow Transplant.* 2002;29:223-30.
- 77- Shustov A, Luzina I, Nguyen P, Papadimitriou JC, Handwerger B, Elkon KB, et al. Role of perforin in controlling B-cell hyperactivity and humoral autoimmunity. *J Clin Invest.* 2000;106:R39-47.
- 78- Romero V, Andrade F. Non-apoptotic functions of granzymes. *Tissue Antigens.* 2008;71:409-16.
- 79- Yawalkar N, Schmid S, Braathen LR, Pichler WJ. Perforin and granzyme B may contribute to skin inflammation in atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol.* 2001;144:1133-9.
- 80- Podack ER. Functional significance of two cytolytic pathways of cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 1995;57:548-52.
- 81- Kam CM, Hudig D, Powers JC. Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1477:307-23.



8- ANEXOS

Quadro 1- Classificação clínica da DECHc, segundo Shulman et al.,1980.

DECHc limitada
Ocorrência de um ou ambos os eventos: 1- Acometimento localizado da pele 2- Disfunção hepática derivada da DECHc
DECHc extensa
Ocorrência do evento: 1- Acometimento generalizado de pele ou : 2- Acometimento localizado da pele e/ou disfunção hepática originada pela DECHc mais : a- Histologia do fígado mostrando hepatite crônica agressiva, pontes de necrose ou cirrose; ou b- Acometimento dos olhos (teste de Schimmer < 5mm); ou c- Acometimento das glândulas salivares menores ou mucosa oral demonstrada por biopsia; ou d- Acometimento de qualquer outro órgão alvo

Quadro 2- Graduação histológica da DECHc da mucosa oral, de acordo com Horn et al., 1995.

Grau	Características Histológicas
1	Vacuolização das células basais, moderado infiltrado linfocitário, moderada exocitose epitelial.
2	Vacuolização da camada basal, células epiteliais disceratóticas, necrose de ceratinocitos, com satelitose linfocitária, moderado a intenso infiltrado linfocitário no cório e moderada exocitose epitelial.
3	Clivagem focal entre o epitélio e o cório, intenso infiltrado linfocitário no cório, células epiteliais disceratóticas, exocitose linfocitária.
4	Separação entre o epitélio e o cório.



9- APÊNDICES

Tabela 5- Características clínicas e histológicas dos pacientes com LPO.

Nº Paciente	Sexo	Idade	Metap	Fase	Fendas	Int inf	Loc inf
1	F	52	1	0	0	1	0
2	F	34	1	0	0	1	0
3	F	57	1	0	1	1	1
4	F	54	1	0	0	1	0
5	M	51	1	1	0	1	0
6	M	66	1	0	1	1	1
7	F	28	0	0	0	1	1
8	F	53	1	0	1	1	1
9	F	69	1	1	0	0	0
10	M	48	1	0	0	1	1
11	M	36	1	0	0	1	1
12	M	36	1	0	0	1	0
13	F	42	1	1	1	1	0
14	F	64	1	1	0	1	0
15	M	62	1	1	1	1	0
16	F	56	0	1	0	1	0
17	M	47	1	1	0	1	0
18	M	37	1	1	0	1	0
19	M	49	1	0	1	1	1

N° Paciente	Sexo	Idade	Metap	Fase	Fendas	Int inf	Loc inf
20	F	44	1	1	1	1	1
21	M	29	1	0	0	1	0
22	M	60	1	1	1	1	0
23	M	47	0	1	1	1	0
24	F	37	1	1	0	1	1
25	M	25	1	1	0	1	0
26	F	53	1	0	0	1	0
27	M	69	1	1	0	1	0
28	M	27	1	1	0	1	0
29	M	30	1	1	0	1	1

Metap: metaplasia cornificada, 0: ausente 1: presente; Fase, 0: ativa, 1: em regressão; Fenda, 0: ausente 1: presente; Int inf: intensidade do infiltrado inflamatório, 0: leve, 1: moderada ou acentuada; Loc inf: localização do infiltrado inflamatório, 0: superficial, 1: superficial e profunda.

Tabela 6- Características clínicas e histológicas dos pacientes com DECHc oral.

Nº	Paciente	Sexo	Idade	Doença*	DBx	Enxerto	DECHc	Grau	muc	Metap	Fase	Fendas	Int Inf	Loc Inf
1	F	14	LLA	215	MO	Ext	2	1	1	0	0	0	0	0
2	F	21	AA	78	MO	Loc	3	0	0	0	0	0	0	0
3	F	41	LMC	690	SP	Ext	2	0	1	0	0	0	0	0
4	M	21	AA	223	MO	Ext	2	1	0	1	0	0	0	0
5	M	18	LMC	320	MO	Ext	3	1	0	0	0	0	0	0
6	M	41	LMC	202	SP	Loc	2	1	0	1	0	0	0	0
7	M	59	LMC	392	MO	Ext	2	0	0	0	0	0	0	0
8	M	34	LMC	285	MO	Ext	3	1	0	1	0	0	0	0
9	M	40	LMC	1666	MO	Ext	3	1	0	1	0	0	0	0
10	F	15	LLA	162	SP	Ext	3	1	0	1	0	0	0	0
11	M	37	LMC	200	MO	Ext	3	1	1	1	0	0	0	0
12	M	43	LMA	308	SP	Ext	3	1	0	1	0	0	0	0
13	M	47	LMC	82	MO	Ext	3	1	0	1	0	0	0	0
14	M	30	AA	1093	MO	Ext	2	1	0	0	0	0	0	0
15	M	32	LMA	130	SP	Ext	3	1	0	1	0	0	0	0
16	M	38	LLA	537	SP	Ext	2	1	0	0	0	0	0	0
17	F	52	LMC	147	SP	Ext	2	0	0	1	1	0	0	0
18	M	45	LMC	708	MO	Ext	3	0	0	1	0	0	0	0
19	F	48	LMC	110	MO	Ext	2	0	0	1	0	0	0	0
20	M	44	MM	584	SP	Ext	2	1	1	0	0	0	0	0
21	M	39	LMC	248	SP	Ext	2	0	0	0	0	0	0	0
22	M	31	LLA	247	MO	Ext	3	1	0	1	0	0	0	0
23	F	52	LMA	271	SP	Ext	2	1	0	1	0	0	0	0

Nº	Paciente	Sexo	Idade	Doença*	DBx	Enxerto	DECHc	Grau	muc	Metap	Fase	Fendas	Int Inf	Loc Inf
24	M	41	MM	439	SP	Ext	2	1	0	0	0	0	0	0
25	M	25	LMA	288	MO	Ext	2	1	0	0	0	0	0	0
26	M	55	LMA	330	SP	Ext	3	1	1	1	1	0	0	0
27	M	39	HPN	104	MO	Ext	3	0	0	0	1	0	0	0

*Doença hematológica. LLA: leucemia linfóide aguda; AA: anemia aplásica, LMC: leucemia mielóide crônica LMA: leucemia mielóide aguda; MM: mieloma múltiplo, HPN: hemoglobinúria paroxística noturna. DBx: dia (pós TMO) da coleta da biopsia; Enxerto: tipo de enxerto, MO: medula óssea, SP: sangue periférico; DECHc: classificação clínica da DECHc, Ext: extensa, Loc: localizada; Grau muc: grau de DECHc na mucosa; Metap: metaplasia cornificada, 0: ausente 1: presente; Fase, 0: ativa, 1: em regressão; Fenda, 0: ausente 1: presente; Int inf: intensidade do infiltrado inflamatório, 0: leve, 1: moderada ou acentuada; Loc inf: localização do infiltrado inflamatório, 0: superficial, 1: superficial e profunda.