

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Faculdade de Medicina**

**Renata Gonçalves de Resende**

**AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA NA DOENÇA DO  
ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO CRÔNICA**

**Belo Horizonte**

**2013**

**Renata Gonçalves de Resende**

**AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA NA DOENÇA DO  
ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina Molecular.

Professor orientador:  
Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Professora coorientadora:  
Dra. Jeane de Fátima Correia Silva Alves

**Belo Horizonte**

**2013**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Avaliação molecular e imunológica na doença do enxerto  
contra o hospedeiro crônica.**

**RENATA GONÇALVES DE RESENDE**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 13 de agosto de 2013, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Ricardo Santiago Gomez - Orientador  
UFMG

Prof(a). Jeane de Fatima Correia Silva  
UFMG

Prof(a). Rodrigo Villamarim Soares  
PUC-MG

Prof(a). André Luiz Sena Guimarães  
UNIMONTES

Prof(a). Marina Gonçalves Diniz  
UFMG

Prof(a). Carolina Cavaliéri Gomes  
UFMG

Belo Horizonte, 13 de agosto de 2013.

*A Deus, fonte de todas as realizações.  
À minha família, razão da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo.

À Nossa Senhora Aparecida, minha protetora e intercessora.

Aos meus pais, Vani e Ivete, e ao meu irmão, Rodrigo, pela imensa dedicação a mim e aos meus estudos, pela amizade e confiança, por acreditar sempre nos meus ideais e ajudar-me a realizá-los.

Aos familiares: avó, tios, tias, primos e primas, pela torcida e incentivo em cada etapa da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez, cujo incontestável saber científico e profissional serviram-me de exemplo nos últimos anos e servirão como incentivo ao longo da minha carreira.

À minha coorientadora, Dra. Jeane de Fátima Correia Silva Alves, minha gratidão eterna por inspirar-me o gosto pela ciência.

Aos professores examinadores da banca de qualificação deste trabalho, Prof. Paulo Eduardo Alencar, Prof<sup>ª</sup>. Paula Rocha e Prof<sup>ª</sup>. Marina Diniz, pelas valiosas considerações.

Aos pacientes, doadores e familiares que colaboraram para a realização deste estudo.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da UFMG, pelo aprendizado.

Aos professores, voluntários e alunos do projeto de extensão “Atendimento odontológico a pacientes transplantados do HC-UFMG”.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular, pela partilha em todos os momentos: Cláudia, Marina, João Artur, Marcelo, Marcela Reis, Paula Serelle, Lincoln, Alessandra, Fabrício Tinôco, Thiago, Gefer, Kelma, Sílvia, Lucyanna, Lissur, Flávia Mendes, Eliza, Flávia, Vanessa, Leonardo, Fabrício Amaral, Marcela Nunes, Telma, Adriano Loyola, Clarice, Elizete, Maria Higina e Thaís.

Aos amigos da pós-graduação da Faculdade de Odontologia da UFMG: Patrícia, Giovanna, Alfonso, Márcio Bruno, Maisa, Daniela e Joice.

À Prof<sup>ª</sup>. Carolina Cavaliéri Gomes, pela dedicação ao Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da UFMG.

À Danielle Ramalho, pelo apoio técnico.

Aos alunos de iniciação científica, Natalia e Igor, por toda contribuição à minha pesquisa.

Aos alunos e professores do Laboratório de Biologia das integrações celulares do Instituto de Ciência Biológicas da UFMG, pela ajuda durante os experimentos e análise dos dados.

Ao colegiado de pós-graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG, em especial, ao Prof. Dr. Luiz Armando de Marco.

Ao colegiado de pós-graduação da Faculdade de Odontologia da UFMG.

À Diretoria do Hospital das Clínicas, à Coordenação da Unidade de Transplante de Medula Óssea e ao Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG, pela possibilidade de realização deste trabalho.

Aos funcionários da Unidade de Transplante de Medula Óssea, do Ambulatório Bias Fortes, do Laboratório de Biologia Molecular e do Laboratório Central da Faculdade de Medicina da UFMG, pela contribuição na coleta de amostras e de dados.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante parte do doutorado.

Aos colegas da Prefeitura Municipal de Betim, pelo apoio no meu aperfeiçoamento profissional.

Aos novos amigos do Hospital Municipal Odilon Behrens, pela acolhida.

A todos aqueles que de alguma forma prestaram sua contribuição para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Este trabalho contou com a colaboração de:

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Walderez Ornelas Dutra**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Tarcília Aparecida Silva**

Pesquisadoras

**Érica Leandro Marciano Viana**

**Daniela Valente**

Alunas de pós-graduação

*“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”.* John Ruskin

## RESUMO

A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade após o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (alo-TCTH). O conhecimento sobre a etiopatogenia da DECH crônica (DECHc) ainda permanece fragmentado e poucos estudos mostram a contribuição de polimorfismos genéticos em citocinas inflamatórias nos níveis desses mediadores e seu impacto na DECHc. Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão genotípica e fenotípica de genes envolvidos com a resposta imunoinflamatória na DECH crônica. O trabalho foi conduzido em duas partes: na primeira parte, foram obtidas amostras de saliva e sangue de pacientes e de seus doadores para análise dos polimorfismos dos genes de *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *IFNG*, *TNFA*, *IL17A* e *IL17F* e para dosagem dessas citocinas por meio da PCR e por ensaio de ELISA, respectivamente. Para a segunda parte do estudo, também foram coletadas amostras de sangue de outros oito pacientes com DECHc bucal, de quatro pacientes submetidos ao alo-TCTH que não desenvolveram DECHc e de 3 indivíduos saudáveis, não transplantados. Estas amostras de sangue foram submetidas à análise imunofenotípica por meio de citometria de fluxo para determinação dos níveis das citocinas (IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e dos marcadores de repertório e de ativação celular (CD4, CD8, CTLA-4, Foxp3 e CD25). Nos resultados da primeira parte do estudo, 42 dos 58 pacientes puderam ser avaliados para a DECHc sistêmica e 27 para a DECHc bucal. Foi identificado que pacientes com a DECHc bucal histológica apresentavam níveis aumentados de IFN- $\gamma$  na saliva e de IL-1 $\beta$  no sangue e na saliva. Para DECHc bucal clínica, observou-se níveis mais altos de IL-6 no sangue e níveis mais baixos de IFN- $\gamma$  no sangue, além de mais baixos níveis de IL-1 $\beta$  na saliva. Foi também observada associação entre a ocorrência da DECHc sistêmica e o polimorfismos do gene *IL17A*, de pacientes. O polimorfismo de *IL1B* foi relacionado à DECHc bucal e o polimorfismo de *IFNG* esteve associado à ausência da doença bucal. O fenótipo alto produtor do gene *TNFA* dos doadores mostrou relação com a presença de DECHc bucal. Já os experimentos de imunofenotipagem mostraram um aumento da expressão de TNF- $\alpha$  em células T CD4 em pacientes com DECHc bucal, comparado com pacientes transplantados sem a doença e com os indivíduos saudáveis. A expressão de CTLA-4, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$ , em células CD4, e IFN- $\gamma$ , em células CD4 e CD8, em diferentes condições de estímulo, foi relacionada aos pacientes com DECHc bucal. Por fim, os pacientes TCTH apresentaram maior expressão de TNF- $\alpha$ , em relação aos indivíduos não TCTH. Dessa forma, os achados genotípicos e fenotípicos mostram um perfil pró-inflamatório relacionado à DECHc, tanto bucal quanto sistêmica.

**Palavras-chave:** Doença Enxerto-Hospedeiro. Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas. Citocinas. Polimorfismo Genético.

## ABSTRACT

The graft-versus-host disease (GVHD) is a major cause of morbidity and mortality after allogeneic hematopoietic stem cell (allo-HSCT). It is known that knowledge about the pathogenesis of chronic GVHD (cGVHD) remains fragmented and few studies show the contribution of inflammatory cytokines in the levels of these mediators and their impact on cGVHD. This study aimed to evaluate the genotypic and phenotypic expression of genes involved in immunoinflammatory response in cGVHD. The study was conducted in two parts: the first part, we obtained samples of saliva and blood of patients and their donors for analysis of polymorphisms in genes *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *IFNG*, *TNFA*, *IL17A* and *IL17F* for measurement of these cytokines by means of PCR and by ELISA, respectively. For the second part of the study, were also collected blood samples from eight other patients with oral cGVHD, four patients undergoing allo-HSCT who did not develop cGVHD and 3 healthy individuals, not transplanted. These samples were subjected to cytogenetic analysis by flow cytometry to determine the levels of cytokines (IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) and markers of activation repertoire and cell (CD4, CD8, CTLA-4, Foxp3 and CD25). The results of the first part of the study, forty-two of the 58 patients could be evaluated for systemic cGVHD and 27 for oral cGVHD. It was noted that patients with oral cGVHD histology showed increased levels of IFN- $\gamma$ , saliva, and IL-1 $\beta$  in the blood and saliva. For oral clinical GVHD, we observed higher blood levels of IL-6 and lower blood levels of IFN- $\gamma$ , plus low levels of IL-1 $\beta$  in saliva. Association was found between the occurrence of systemic cGVHD and *IL17A* gene polymorphisms in patients. *IL1B* polymorphism was related to oral cGVHD and *IFNG* polymorphism was associated with the absence of oral disease. The phenotype high producer *TNFA* gene donor was related to the presence of oral cGVHD. Already immunophenotyping experiments showed an increased expression of TNF- $\alpha$  in CD4 T cells in patients with oral cGVHD compared with transplant patients without the disease and healthy individuals. The expression of CTLA-4, IL-10, IL-17A and TNF- $\alpha$  in CD4 cells and IFN- $\gamma$  in CD4 and CD8 cells in different conditions of stimulation, were related to oral cGVHD. Finally, HSCT patients showed higher expression of TNF- $\alpha$  in relation to individuals not HSCT. Thus, the findings show a genotypic and phenotypic profile proinflammatory related to GVHD, both oral and systemic.

**Keywords:** Disease graft-versus-host. Cell transplantation hematopoietic stem. Cytokines. genetic polymorphism

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Corte histológico de biópsia de lábio inferior em paciente TCTH, para estadiamento da DECHc bucal .....	21
Figura 2 - Lesões bucais de DECHc em paciente pós-TCTH .....	21
Figura 3 - Fatores determinantes no desenvolvimento da DECHc .....	25
Figura 4 - Esquema do desenho experimental do trabalho de pesquisa, evidenciando etapas do estudo, as condições de análises e as populações celulares examinadas.....	36
Figura 5 - Estratégia de análise para quantificar o percentual de células IL17 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> nas CMSP .....	46
Figura 6 - Comparação entre as três condições (Meio, SEB, antiCD3-antiCD28) para o marcador CTLA-4 em células T CD4 (A; C) e CD8 (B; D), nos pacientes com DECHc bucal. Teste estatístico: Wilcoxon.....	59
Figura 7 - Comparação entre as três condições (Meio, SEB, antiCD3-antiCD28), para as citocinas IFN- $\gamma$ , em células T CD4 (A; C) e CD8 (B; D), nos pacientes com DECHc bucal. Teste estatístico: Wilcoxon.....	60
Figura 8 - Comparação entre as três condições (Meio, SEB, antiCD3-antiCD28), para a citocina IL-17A em células T CD4 (A; B) e em células CD8 (C), nos pacientes com DECHc bucal. Teste estatístico: Wilcoxon.....	60
Figura 9 - Comparação entre as três condições (Meio, SEB, antiCD3-antiCD28), para citocina TNF-a em células T CD4, nos pacientes com DECHc bucal. Teste estatístico: Wilcoxon .....	61
Figura 10 - Comparação entre as três condições (Meio, SEB, antiCD3-antiCD28), para a citocina IL-6 em células T CD4, nos pacientes com DECHc bucal. Teste estatístico: Wilcoxon .....	61
Figura 11 - Comparação entre as três condições (Meio, SEB, antiCD3-antiCD28), para a citocina IL-10, em células T CD4, nos pacientes com DECHc bucal. Teste estatístico Wilcoxon .....	62
Figura 12 - Comparação entre as três condições (Meio, SEB, antiCD3-antiCD28), para Foxp3 em células T CD24 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> nos pacientes com DECHc bucal. Teste estatístico: Wilcoxon ...	62
Figura 13 – Comparação entre os três grupos estudados (indivíduos saudáveis, pacientes com DECHc bucal e pacientes sem DECHc bucal) sob o estímulo de SEB, para a citocina TNF- $\alpha$ (a) em células T CD4 totais. Teste estatístico: Kruskal Wallis .....	65
Figura 14 - Comparação entre os três grupos estudados (Indivíduos saudáveis, Pacientes com DECHc bucal e Pacientes sem DECHc bucal) sob o estímulo de antiCD3-antiCD28, para a citocina TNF- $\alpha$ (a). Teste estatístico: Wilcoxon.....	68
Quadro 1 - Critérios para o estadiamento da DECHc bucal.....	39
Quadro 2 - Critérios para o estadiamento clínico da DECHc bucal.....	40
Quadro 3 - Anticorpos monoclonais fluorescentes utilizados no estudo.....	45
Tabela 1 - Sequência de primers, enzimas de restrição e produtos para cada polimorfismo a ser avaliado .....	43
Tabela 2 - Principais características dos pacientes submetidos ao TCTH .....	49
Tabela 3 - Associação entre os níveis das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-1 $\beta$ e a DECHc bucal clínica.....	500
Tabela 4 - Associação entre os níveis de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ e a DECHc bucal histológica.....	500
Tabela 5 - Associação entre os genótipos de <i>IL6</i> , <i>IL10</i> , <i>IL1B</i> , <i>TNFA</i> , <i>IFNG</i> , <i>IL17A</i> e <i>IL17F</i> dos pacientes e dos doadores e a ocorrência de DECHc sistêmica (n=42) e bucal (n=27).....	52

Tabela 6 - Associação entre os alelos de <i>IL6</i> , <i>IL10</i> , <i>IL1B</i> , <i>TNFA</i> , <i>IFNG</i> , <i>IL17A</i> e <i>IL17F</i> dos pacientes e dos doadores e a ocorrência de DECHc sistêmica (n=42) e bucal (n=27) .....	53
Tabela 7 - Associação entre os genótipos e fenótipos de <i>IL6</i> , <i>IL10</i> , <i>TNFA</i> e <i>IFNG</i> dos pacientes e dos doadores e a ocorrência de DECHc sistêmica (n=42) e bucal (n=27) .....	54
Tabela 8 - Características dos alo-TCTH pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofentípica.....	56
Tabela 9 - Análise descritiva da expressão média e desvio padrão de marcadores em células T CD4 e células T CD8, em pacientes alo-TCTH, pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica .....	57
Tabela 10 - Frequência média e desvio padrão de Foxp3 em células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , em alo-TCTH pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica .....	58
Tabela 11 - Análise descritiva da expressão média e desvio padrão de citocinas e do marcador CTLA-4 em células T CD4 e células T CD8, em pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica para a condição sem estímulo (meio).....	64
Tabela 12 - Frequência média e desvio padrão do marcador Foxp3, em células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , em pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofentípica para a condição sem estímulo (meio) .....	65
Tabela 13 - Expressão média e desvio padrão de citocinas e do marcador CTLA-4, em células T CD4 e células T CD8, em pacientes com DECHc bucal (n=8) sem DECHc bucal (n=4) e dos indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica para a condição com estímulo SEB .....	67
Tabela 14 - Frequência média e desvio padrão do marcador Foxp3, em células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , em pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica para a para a condição com estímulo SEB.....	68
Tabela 15 - Expressão média e desvio padrão de citocinas em células T CD4 e células T CD8, em alo-TCTH pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica para a condição com estímulo antiCD3-antiCD28.....	69
Tabela 16 - Frequência média e desvio padrão do marcador Foxp3, em células T CD4 e células T CD25, em pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica para a condição com antiCD3-antiCD28.....	70
Tabela 17 - Comparação entre os indivíduos saudáveis (n=3) e os pacientes TCTH (n=12) sem estímulo (na condição meio) para as diferentes citocinas e para o marcador CTLA-4 ....	71
Tabela 18 - Comparação entre os indivíduos saudáveis (n=3) e os pacientes TCTH (n=12) sem estímulo (na condição meio) para o marcador Foxp3 .....	71
Tabela 19 - Comparação entre os indivíduos saudáveis (n=3) e os pacientes TCTH (n=12) sob o estímulo SEB para as diferentes citocinas e para o marcador CTLA-4 .....	72
Tabela 20 - Comparação entre os indivíduos saudáveis (n=3) e os pacientes TCTH (n=12) sob o estímulo SEB para o marcador Foxp3 .....	73
Tabela 21 - Comparação entre os indivíduos saudáveis (n=3) e os pacientes TCTH (n=12) sob o estímulo de antiCD3-antiCD28 para as diferentes citocinas e para o marcador CTLA-4 ....	74
Tabela 22 - Comparação entre os indivíduos saudáveis (n=3) e os pacientes TCTH (n=12) sob o estímulo de antiCD3-antiCD28 para as diferentes citocinas e para o marcador CTLA-4 ....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – adenine

AA – anemia aplásica

Alo-TCTH – transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas

APC – *antigen-presenting cell* – célula apresentadora de antígeno

BAFF – *B-cell activating factor* – fator ativador de células B

BSA – *bovine albumin* – albumina de soro bovino

C – citosina

°C – graus Celsius

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> – glicose

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O – cloreto de cálcio

CD – *cluster of differentiation*

CMSP – células mononucleares do sangue periférico

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CTL – células T citotóxicas

CTLA-4 – *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4*

CY – *cy-chome*

DECH – doença do enxerto contra o hospedeiro

DECHa – doença do enxerto contra o hospedeiro aguda

DECHc – doença do enxerto contra o hospedeiro crônica

DEPE – Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão

dl – decilitro

DNA – *deoxyribonucleic acid* - Ácido Desoxirribonucléico

EDTA – ácido tetra etileno diamino

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* – Imunoabsorção por ligação enzimática

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FO-UFGM – Faculdade de Odontologia da UFGM

Foxp3 – *forkhead Box protein 3*

G – guanina

GITR – *Glucocorticoid induced TNRF-related protein*

HCl – ácido clorídrico

HC-UFGM – Hospital das Clínicas da UFGM

GVHD – *graft-versus-host disease*

HLA – antígeno leucitário humano  
IFN – interferon  
IL– interleucina  
KCl – cloreto de potássio  
Kb – quilobase  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – hidrogenosfosfato de potássio  
LA – linfoma anaplásico  
LMA – leucemia mielocítica aguda  
LMC – leucemia mielocítica crônica  
MHC – *major histocompatibility complex* – complexo principal de histocompatibilidade  
mg – miligrama  
MgSO<sub>4</sub> – sulfato de magnésio  
ml – mililitros  
mM – milimolar  
MMF – micofenolato mofetil  
MTX – methotrexato  
NIH – *National Institutes of Health* – Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América  
NK – células *natural killer*  
PE – ficoeritrina  
pb – pares de base  
PBS – *phosphate buffered saline* – solução tampão fosfato salino  
PDGF – *platelet-derived growth factor* – fator de crescimento derivado de plaquetas  
PCR – *polymerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase  
pg – picograma  
RFLP – *restriction fragment length polymorphism* – polimorfismo no comprimento de fragmentos  
s – segundos  
SEB – enterotoxina B de *staphylococcus*  
SNP – *single nucleotide polymorphisms* – mutação puntiforme  
T – timina  
TCR – *T-cell receptor* – receptor de células T  
TCTH – transplante de células-tronco hematopoiéticas  
TNF – citocina fator de necrose tumoral

TMO – transplante de medula óssea

Th – linfócito T *helper* – auxiliar

Treg – linfócito T regulatório

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VNTRs – *variable number of tandem repeat* (número variável de repetições em *tandem*)

$\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 – antiCD3-antiCD28

$\mu$ l – microlitros

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1 O Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH) .....	18
2.2 A Doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH).....	19
2.3 A Doença do Enxerto contra o Hospedeiro crônica (DECHc) .....	20
2.4 A resposta imune celular .....	22
2.5 A resposta imune celular e a DECHc.....	24
2.6 Polimorfismos genéticos .....	26
2.7 Polimorfismos genéticos e a DECH.....	27
2.8 Citocinas inflamatórias na saliva e no sangue de pacientes com DECH .....	29
2.9 Expressões de citocinas inflamatórias e de marcadores de células T em pacientes com DECH por citometria de fluxo.....	31
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>33</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
4.1 Objetivo geral.....	34
4.2 Objetivos específicos .....	34
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
5.1 Aspectos Éticos .....	35
5.2 Critérios de elegibilidade .....	35
5.3 Critérios de exclusão .....	35
5.4 Estratégia de estudo.....	35
5.5 Avaliações genotípicas e fenotípicas de citocinas em indivíduos alo-TCTH e doadores.....	37
5.5.1 Pacientes e Amostras .....	37
5.5.2 Estadiamento da DECH crônica .....	37
5.5.2.1 DECHc bucal .....	37
5.5.2.1.1 Estadiamento histológico.....	38
5.5.2.1.2 Estadiamento clínico.....	38
5.5.2.2 DECHc sistêmica .....	39
5.5.3 Reações de ELISA .....	41
5.5.4 Avaliação dos polimorfismos genéticos .....	41
5.5.4.1 Extração do DNA: sangue.....	41
5.5.4.2 Reações de PCR e digestão enzimática.....	42
5.6 Avaliação imunofenotípica da expressão de marcadores de superfície celular e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos com e sem DECHc bucal.....	43
5.6.1 Pacientes e Amostras .....	43
5.6.2 Estadiamento da DECH crônica bucal.....	44
5.6.3 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) .....	44
5.6.4 Imunofluorescência para avaliação imunofenotípica .....	44
5.6.5 Aquisição no citômetro de fluxo e análise dos dados .....	45
5.7 Análises estatísticas.....	47
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
6.1 Avaliações genotípicas e fenotípicas de citocinas em indivíduos alo-TCTH e doadores.....	48
6.1.1 Características clínicas e demográficas: pacientes e doadores .....	48
6.1.2 Reações de ELISA .....	49

6.1.2 Polimorfismos genéticos.....	51
6.2 Avaliação imunofenotípica da expressão de marcadores de superfície celular e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos com e sem DECHc bucal.....	54
6.2.1 Características clínicas e demográficas: pacientes e doadores .....	55
6.2.2 Estudo descritivo do perfil de citocinas e marcadores de células T nos três grupos analisados .....	56
6.2.2 Estudo de citocinas e marcadores de células T nos pacientes com DECHc bucal: meio e sob estímulos.....	58
6.2.3 Estudo de citocinas e marcadores de células T nos pacientes com DECHc bucal, nos pacientes sem DECHc bucal e nos indivíduos saudáveis: meio e sob estímulos.....	63
6.2.4 Estudo de citocinas e marcadores de células T nos pacientes TCTH e Não TCTH: meio e sob estímulos.....	70
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO 1 – PARECER Nº ETIC 0124.0.203.000-11 COEP-UFMG .....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO 2 – PROCESSO Nº 037/11 DEPE/HC-UFMG.....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO 3 – TERMO DE ESCLARECIMENTO/TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTE) .....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXO 4 – TERMO DE ESCLARECIMENTO/TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (DOADOR) .....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO 5 - ARTIGO SUBMETIDO.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO 6 - ATA DA DEFESA DA TESE.....</b>	<b>117</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é estabelecido para o tratamento de diversas doenças hematológicas ou de outros tecidos, insuficiências medulares ou outros distúrbios congênitos da hematopoiese (DEVETTEN, M. e ARMITAGE, J. O., 2007).

Complicações advindas do transplante são observadas e descritas na literatura e podem ocorrer em todas as fases do transplante. Uma das complicações que causa elevada morbidade e mortalidade é a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Essa reação é observada, sobretudo, após o transplante alogênico, embora raros casos de DECH em transplante autólogo já tenham sido descritos (IMANGULI, M., SWAIM, W. D. e LEAGUE, S. C., 2009) e manifesta-se quando células ou tecidos imunocompetentes são transplantados a um receptor imunoincompetente (BLAZAR, B. R., MURPHY, W. J. e ABEDI, M., 2012).

Um dos maiores obstáculos na prevenção e tratamento da DECH é a dificuldade de entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na síndrome (PENACK, O., HOLLER E. e VAN DEN BRINK, M. R. M., 2010). A análise do estado de ativação das células T e da expressão de citocinas derivadas dessas células possibilita o melhor discernimento dos mecanismos biológicos envolvidos na ocorrência e na modulação da doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (DECHc) após o TCTH (PALLANDRE, J. R. *et al.*, 2007).

Citocinas pró-inflamatórias, incluindo Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleucina-6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleucina-1 (IL-1), interleucina-17 (IL-17) e a citocina anti-inflamatória Interleucina-10 (IL-10) têm sido associadas à mediação e regulação da DECH (DICKINSON, A. M., HARROLD, J. L. e CULLUP, H., 2007). Estudos de polimorfismos genéticos dessas citocinas relacionam diferenças funcionais na regulação desses mediadores inflamatórios e alterações clínicas no desenvolvimento da DECH (DICKINSON, A. M., 2012). Da mesma forma, trabalhos que propõem o monitoramento dos pacientes TCTH por intermédio da dosagem das citocinas têm fornecido importantes informações no que se refere à investigação da fisiopatologia da doença (RESENDE, R. G. *et al.*, 2010; 2012).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH)

O TCTH foi inicialmente empregado em humanos em 1977, em um grupo de 100 pacientes com leucemia aguda, por médicos do Centro de Pesquisa em Câncer Fred Hutchinson, no estado de Seattle, Estados Unidos da América (THOMAS, E. D. *et al.*, 1977). Desde então, recebeu significativas modificações e hoje representa a possibilidade de cura para o câncer hematológico ou para doenças congênitas ou adquiridas do sistema hematopoiético (DEVETTEN, M. e ARMITAGE, J. O., 2012).

Pode ser dividido em três tipos: autólogo, alogênico e singênico. O TCTH alogênico (alo-TCTH) acontece quando as células-tronco são provenientes de um doador geneticamente distinto. No TCTH autólogo, as células-tronco utilizadas são do próprio paciente. O transplante singênico é realizado entre gêmeos idênticos, o que não resulta em complicação imunológica (AZEVEDO, W. e RIBEIRO, M. C. C., 2000).

Com relação às células progenitoras, três fontes de células-tronco são empregadas no TCTH: medula óssea, sangue periférico e cordão umbilical. A medula óssea foi a primeira e a mais amplamente utilizada fonte para o TCTH. As células-tronco periféricas têm sido aplicadas para TCTH autólogo e alogênico de forma crescente e tem sido opção de escolha para muitos desses transplantes, por fornecer uma reconstituição hematopoiética mais rápida, devido ao maior conteúdo de células precursoras. As células do cordão umbilical surgiram recentemente, como uma rica fonte de células hematopoiéticas para o transplante. O menor risco ao doador e a rápida disponibilidade são as grandes vantagens da sua utilização (DEVETTEN, M. e ARMITAGE, J. O., 2012).

O curso para o TCTH envolve a eliminação das células malignas do paciente com uma alta dose de quimioterapia, associada ou não à irradiação corpórea total, seguida pela infiltração de células normais mieloproliferativas (DEVETTEN, M. e ARMITAGE, J. O., 2012). A quimioterapia e/ou radioterapia pré-TCTH tem também como finalidade destruir o próprio sistema imune do paciente, reduzindo o risco de rejeição do enxerto (DEVETTEN, M. e ARMITAGE, J. O., 2012).

O TCTH pode ser dividido em cinco estágios ou fases, de acordo com os eventos biológicos e fisiológicos que ocorrem no curso do transplante. O estágio 1 corresponde ao período pré-transplante. O estágio 2 inclui a fase de condicionamento, que se inicia dez dias antes do transplante (dia -10) e estende-se até o início da pega do enxerto, 20 dias após o

TCTH (dia +20). O estágio 3 começa com a pega do enxerto, que acontece aproximadamente 20 dias após o TCTH, e prolonga-se até a reconstituição hematológica, que se efetua em torno de 100 dias após o TCTH (dia +100). O estágio 4 principia-se com a reconstituição hematológica e alonga-se até a reconstituição imunológica, geralmente, em torno do dia +365. O estágio 5 inicia-se após o primeiro ano do TCTH e compreende todo o período de sobrevivência do paciente (MAJORANA, A. *et al.*, 2000).

Embora o TCTH represente a única possibilidade de cura para diversas doenças, o tratamento não é isento de complicações. Tais complicações podem suceder em todas as fases do transplante, frequentemente produzindo considerável morbidade. Pacientes submetidos ao TCTH podem desenvolver complicações devido ao efeito da quimioterapia e da radioterapia; infecções devido à mielossupressão e a imunossupressão e ao aparecimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (DEVETTEN, M. e ARMITAGE, J. O., 2012).

## **2.2 A Doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)**

A DECH é uma doença mediada por células e outros componentes do sistema imune, sendo a mais importante complicação que se segue ao transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (BLAZAR, B. R., MURPHY, W. J. e ABEDI, M., 2012). Em alguns casos, pode ser uma reação catastrófica e fatal, em que as células histocompatíveis imunocompetentes do enxerto reagem contra o tecido do hospedeiro (MARTIN P. *et al.*, 1998). Essa reação revela-se, sobretudo, após o transplante alogênico, embora raros casos de DECH em transplante autólogo já tenham sido descritos (MARTIN P. *et al.*, 1998).

Inicialmente, a doença foi dividida em aguda e crônica, com base no tempo de surgimento. A forma aguda (DECHa) apareceria até o dia +100 pós-TCTH e a forma crônica (DECHc) poderia representar uma continuação de um caso previamente diagnosticado como DECH aguda, ou se desenvolveria mais de 100 dias após o TCTH, não aparecendo, algumas vezes, por vários anos após o procedimento (SCHUBERT, M. M. e CORREA, M. E., 2008). No entanto, recentemente, a separação das formas clínicas da DECH tem sido feita também com fundamento em características clínicas e patológicas da doença (SCHUBERT, M. M. e CORREA, M. E., 2008).

Embora ambas as formas da DECH representem uma consequência de danos aos tecidos do hospedeiro pelos linfócitos T ativados, advindos do doador, em resposta ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC), a elucidação da imunopatobiologia da DECH tornou aparente que os mecanismos fisiopatológicos específicos são diferentes. A

DECHa pode ocorrer tão cedo como em uma semana de pós-TCTH ou após infusão de linfócitos do doador. Em contraste, a DECHc pode ter um início de 70 dias pós-TCTH ou depois da infusão de linfócitos do doador e continuar por muitos anos. Existem quatro padrões de início para DECHc: (1) novo início (sem DECHa previamente); (2) início quiescente (o início é após um período de ausência de atividade aparente de DECHa entre a resolução do quadro de DECHa e o início da DECHc); (3) início progressivo; (4) início explosivo (manifestando-se com um início abrupto de envolvimento multissistêmico grave, com manifestações de ambas as formas de DECH) (FILIPOVICH, A. H. *et al.*, 2005; SCHUBERT, M. M. e CORREA, M. E., 2008).

### **2.3 A Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (DECHc)**

A primeira classificação da DECHc foi proposta em 1980, por Shulman, H. M. *et al.* (1980), e subdividia a doença em limitada (quando acometia pele e/ou fígado) ou extensa (envolvimento generalizado de pele ou doença limitada associada a outros órgãos), de acordo com o envolvimento das lesões (BOUZAS, L. F. S. *et al.*, 2010).

Em 2005, um grupo de pesquisa do National Institutes of Health (NIH) propôs um novo critério baseado em pontuação dos órgãos envolvidos e avaliação global da gravidade, o que permite uma melhor análise da doença, além de determinar sua influência na mortalidade tardia do transplante (FILIPOVICH, A. H. *et al.*, 2005). O sistema considera as manifestações clínicas em pele, unhas, cabelos, boca, olhos, genitália, trato gastrointestinal, fígado, pulmão, músculos, fáscia e articulações, sistema hematopoiético e imune (BOUZAS, L. F. S. *et al.*, 2010).

As manifestações na mucosa bucal da DECH podem variar, dependendo da duração e gravidade do ataque, e dos tecidos bucais atingidos. A apresentação clínica da DECH bucal é caracterizada pela presença de eritema na mucosa, atrofia, ulcerações com pseudomembranas, estrias hiperkeratóticas, placas e pápulas consistentes com líquen plano na mucosa. As mucosas bucal, labial e regiões lateral e ventral da língua são os sítios mais comumente envolvidos (IMANGULI, M., SWAIM, W. D. e LEAGUE, S. C., 2009).

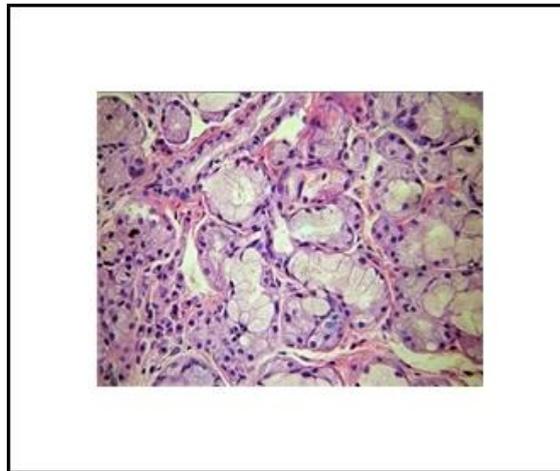
O envolvimento clínico da mucosa bucal pela DECHc é investigado de acordo com critério defendido por Schubert, M. M. *et al.* (1992), em que as lesões são classificadas a partir do tipo de manifestação clínica e escala de envolvimento das áreas anatômicas.

O estadiamento da DECHc bucal por meio de biópsias labiais tem sido defendido por alguns autores como fator prognóstico importante em pacientes transplantados de células-

tronco hematopoiéticas (RESENDE, R. G. *et al.*, 2012a). Vários métodos vêm sendo propostos para a gradação histológica da DECHc. Ela pode ser executada pelo método quantitativo, que consiste na contagem do número de células inflamatórias em seis campos histológico, segundo Gomez R. S. *et al.* (2001), ou pelo método qualitativo, em que se observam alterações morfológicas das glândulas salivares menores, conforme proposto por Horn, T. D. *et al.* (1995).

As Figuras 1 e 2, abaixo, são provenientes de pacientes TCTH com DECH. A Figura 1 apresenta corte histológico de glândula salivar menor para o estadiamento da DECHc bucal e a Figura 2 mostra lesões estriadas em mucosa bucal.

Figura 1 - Corte histológico de biópsia de lábio inferior em paciente TCTH, para estadiamento da DECHc bucal



Fonte: Gentileza Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Figura 2 - Lesões bucais de DECHc em paciente pós-TCTH



Fonte: Gentileza Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

## 2.4 A resposta imune

Os linfócitos são células do sistema imune que reconhecem determinados antígenos e desempenham função central da defesa do organismo. Os linfócitos T são um tipo de célula que medeia as respostas imunes celulares no sistema adaptativo. Eles expressam receptores antigênicos (TCRs) que reconhecem fragmentos peptídicos de proteínas ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) próprias (MOSMANN, T. R. *et al.*, 1986).

A população de linfócitos T pode ser subdividida em grupos de acordo com a expressão das moléculas co-receptoras CD (Cluster of Differentiation) 4 e CD8: linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD8<sup>+</sup>, principalmente. Essas células distinguem-se quanto aos tipos de MHC e moléculas apresentadoras que reconhecem e, conseqüentemente, quanto à participação na resposta imune contra patógenos. A competência imune correlacionada com um número maior de células T CD4<sup>+</sup> provavelmente representa uma resistência relacionada a patógenos extracelulares e a respostas dependentes de anticorpos, enquanto as células CD8<sup>+</sup> podem ter significado em infecções intracelulares e virais, que requerem uma resposta imune mediada por células (ZEKARIAS, B. *et al.*, 2002; FAIR, J. M. *et al.*, 2008). As populações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> são ainda subdivididas pelas diferentes expressões das cadeias  $\alpha$  ou  $\beta$  de T CD8<sup>+</sup>, que variam em diferentes órgãos. Os co-receptores CD4 ou CD8 auxiliam o TCR no reconhecimento e ligação às moléculas de MHC contendo peptídeos (SHARMA, J., 1990).

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> atuam na ativação e regulação de outras células sendo, por isso, denominados auxiliares. Esses linfócitos são divididos em subpopulações funcionalmente distintas devido ao repertório de citocinas que produzem: Th1, Th2, Th0, Th3 e Th17. As células Th1 produzem as citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$ , enquanto as células Th2 fornecem as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. As citocinas do tipo Th1 controlam a produção das citocinas do tipo Th2, e vice-versa. A citocina IL-10, expressa tanto por células Th1 como Th2 humanas, é capaz de modular a expressão de outras citocinas produzidas por ambas as subpopulações celulares (MOSMANN, T. R. *et al.*, 1986; YSSEL, H. *et al.*, 1992). A subpopulação Th0 compreende células T CD4<sup>+</sup> aptas a produzir tanto citocinas Th1 como Th2. Outra subpopulação, distinta quanto ao perfil de citocinas produzido, é denominada Th3. Os linfócitos Th3 secretam TGF- $\beta$ , mas não IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 ou IL-10, sugerindo seu envolvimento na regulação de células imunológicas, incluindo os linfócitos Th1 (RAGHUPATHY, R., 2001). A mais nova subpopulação de células T CD4<sup>+</sup> descrita é a Th17 (PARK, H. *et al.*, 2005). Essas células caracterizam-se pela produção de IL-17 e parecem

contribuir para as respostas inflamatórias e autoimunes. O desenvolvimento das células Th17 é inibido por IFN- $\gamma$  ou IL-4, entretanto, células Th17 maduras são resistentes aos efeitos dessas citocinas e capacitadas a secretar IL-17 em microambientes Th1 e Th2 (PARK, H. *et al.*, 2005).

As células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> são um subtipo especial de células T CD4<sup>+</sup> que apresenta função reguladora. Elas expressam em sua superfície a molécula receptora de interleucina 2 (IL-2) CD25, e o fator de transcrição Forkhead box protein 3 (Foxp3) bem como outros marcadores tais como o T Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA-4) e o GITR (Glucocorticoid-Induced TNFR-Related Protein). Células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> têm como função principal regular o sistema imune, evitando respostas exacerbadas contra agentes infecciosos, o que poderia causar dano ao hospedeiro e o desenvolvimento de doenças autoimunes. E, ainda, já foi demonstrado que as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> impedem uma resposta adequada a diversos tipos de infecção (SAKAGUCHI, S. e POWRIE, F., 2007).

Células T Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, também conhecidas como células Tregulatórias (Tregs), desempenham um importante papel na manutenção da homeostasia do sistema imune e no controle da resposta imune excessiva, conforme Sakagushi, S. e Powrie, F. (2007), pelo contato direto com células efetoras imunes e pela produção de citocinas regulatórias, como TGF- $\beta$  e IL-10 (BELKAID, Y., 2007).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> exercem atividades efetoras importantes para a eliminação de patógenos intracelulares. Essas células apresentam perfil de citocinas semelhante às células T CD4<sup>+</sup> Th1 ou Th2, sendo classificadas como Tc1 e Tc2 em camundongos e em humanos (SAD, S., MARCOTTE, R. e MOSMANN T. R., 1995). As diferentes subpopulações de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> são derivadas sob condições similares: IL-2 e IFN- $\gamma$  levam à diferenciação dos precursores em células Th1 ou Tc1, enquanto IL-4 induz a geração de células Th2 ou Tc2. Além de secretarem citocinas, as células Tc1 e Tc2 exercem efeitos citotóxicos. Embora as citocinas sejam consideradas os elementos críticos na diferenciação das células T CD4<sup>+</sup>, fatores como o tipo de célula apresentadora de antígeno envolvida no momento da diferenciação, a natureza e concentração do antígeno reconhecido, além do tipo de molécula coestimulatória que participa da ativação, podem influenciar esse processo de diferenciação (MOSMANN, T. R. e SAD, S., 1996).

Além dos sinais conferidos pela ligação de antígeno ao TCR, as células T necessitam de um segundo sinal para efetuar sua resposta. Esse sinal é fornecido pelas moléculas coestimulatórias, presentes na superfície de células apresentadoras de antígenos (APC), que se ligam a receptores específicos, presentes nas membranas dos linfócitos T. Várias moléculas

coestimulatórias já foram descritas. O CD28 é uma glicoproteína transmembrana, homodimérica, da família das imunoglobulinas, presente na superfície dos linfócitos T (Azuma M., Phillips, J. H. e Lanier, L. L., 1992) que, associada aos seus ligantes B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), localizados nas APCs, auxilia na estimulação da proliferação linfocitária, na produção de citocinas e impede o estado de anergia (HARDING, F. *et al.*, 1992; LINSLEY, P. S. e LEDBETTER, J. A., 1993). O CTLA-4 é outro membro da família das imunoglobulinas, de estrutura semelhante a do CD28, presente na superfície de linfócitos ativados, que também se liga a B7-1 e B7-2. Entretanto, os sinais enviados por CTLA-4 inibem a ativação de linfócitos, regulando a expressão de moléculas necessárias à ativação, e atuando no ciclo celular ou na síntese de IL-2 (KRUMMEL, M. F. e ALLISON, J. P., 1995).

Após uma ativação eficiente, compreendendo o primeiro e segundo sinais, os linfócitos sofrem várias modificações que englobam a expressão ou perda de moléculas de superfície. A expressão de CD69 ocorre logo após a ativação celular e, em função disso, essa glicoproteína integral de membrana é considerada um marcador inicial de ativação linfocitária (ZIEGLER, S. F. *et al.*, 1993). Sua expressão estimula a proliferação de linfócitos, por exemplo, pela produção da citocina IL-2, e promove a síntese do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (SANCHO, D. *et al.*, 2000; SANCHO, D., GÓMEZ, M. e SÁNCHEZ-MADRID, F., 2005). O HLA-DR é um dos produtos do gene do MHC de classe II humano, que também passa a ser expresso em linfócitos T após ativação, porém temporalmente, após o CD69 (ZIEGLER, S. F. *et al.*, 1993).

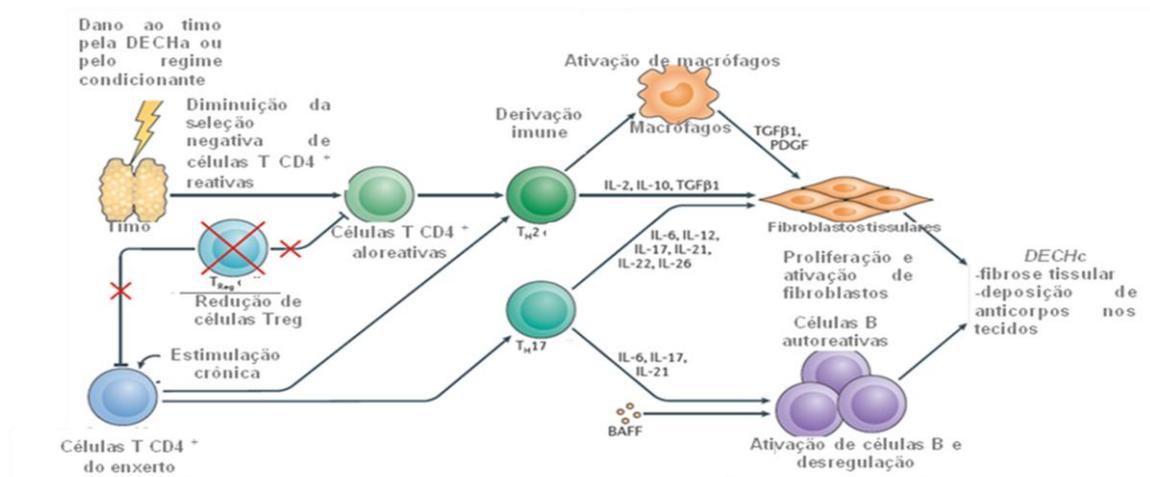
## 2.5 A resposta imune celular e a DECHc

A DECH é uma reação exagerada da resposta imune em que células T reconhecem alo-antígenos por meio de APC do hospedeiro (YI, T. *et al.*, 2009). Estudos recentes indicam que a ativação dessa via acontece antes mesmo da infusão das células T doadoras e pode ocorrer devido à própria doença de base ou tratamentos prévios, antes do regime condicionante pré-TCTH (MULLIGHAM, C. G. e PETERSDORF, E. W., 2006; MULLIGHAM, C. G. e BARDY, P. G., 2007).

A patofisiologia da DECHc relaciona-se à polarização das células T CD4<sup>+</sup> em células Th2. O início de todo o processo manifesta-se no timo, por meio do regime condicionante pré-TCTH ou pela ocorrência prévia de DECHa (BLAZAR, B. R., MURPHY, W. J. e ABEDI, M., 2012), conforme mostrado na Figura 3. Esse dano leva a uma diminuição da seleção negativa de células T CD4<sup>+</sup>, resultando na liberação de citocinas derivadas de células Th2,

como as IL-4, IL-5, IL-11. Tal resposta provoca a liberação de citocinas fibrogênicas: IL-2, IL-10 e fator transformador do crescimento (TGF- $\beta$ 1), além da ativação de macrófagos, que produzem fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e TGF- $\beta$ 1. Essas moléculas estimulam a proliferação e diferenciação de fibroblastos. Ocorre, então, diminuição de células T regulatórias (Tregs) e desregulação de células B, que produzem anticorpos autorreativos. Sugere-se que a produção de anticorpos autorreativos seja resultado da presença de altos níveis de fator ativador de células B (BAFF). Todos esses eventos levam a uma síndrome sistêmica, semelhante a um processo autoimune, associado a alterações fibroproliferativas. As mudanças podem ocorrer em todos os órgãos do corpo, mas geralmente afetam cavidade bucal, mucosa ocular, pele, pulmões, rins, fígado e intestino (BLAZAR, B. R., MURPHY, W. J. e ABEDI, M. 2012).

Figura 3 - Fatores determinantes no desenvolvimento da DECHc



Fonte: Adaptado de BLAZAR, B. R., MURPHY, W. J. e ABEDI, M., 2012.

Estudos mostram que as células Th1 desempenham um importante papel na mediação da DECHa, enquanto as células Th2 e Th17 podem mediar a doença crônica em algumas circunstâncias especiais (ausência de IFN- $\gamma$ ), em que as células T do doador podem se diferenciar em células Th2 e Th17 para mediar a ocorrência da DECH. Além disso, essas últimas subpopulações celulares podem sub-regular a diferenciação das células Th1 ou vice-versa e DECH mediada por células Th1 (ASAVAROENGCHAI, W. *et al.*, 2007; YI, T. *et al.*, 2009).

Em estudo realizado por Yi, T. *et al.* (2009), o dano tecidual mediado por células Th1, Th2 e Th17 foi parcialmente associado à infiltração específica por subpopulações de células

Th, mediado pela expressão preferencial de receptores de quimiocinas nos tecidos alvo da DECH. Diferentes respostas teciduais a citocinas derivadas de células T podem representar um mecanismo importante no dano tecidual. Além disso, esse estudo mostrou que a DECH mediada por células T CD8<sup>+</sup> advindas do doador, por meio de IFN- $\gamma$ , promove um aumento da morte celular (YI, T. *et al.*, 2009). Outros estudos mostram que IFN- $\gamma$ , advindo de células T CD8<sup>+</sup> de doadores, está associado a um maior dano tecidual em fígado (ASAVAROENGCHAI, W. *et al.*, 2007).

Com o objetivo de determinar o impacto de células Tregs CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> na DECHa, Fujioka, T. *et al.* (2012), mensuraram essas células no sangue periférico de pacientes pós-TCTH e observaram que as Tregs representam um preditor de DECHa na semana após o transplante. Outro trabalho que também investigou essa população celular, observou que as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dos doadores foram relacionadas à DECHa graus II-IV (LIU, Y. J. *et al.*, 2006).

CTLA-4, um regulador negativo para a ativação das células T e responsável por equilibrar as respostas imunes e a manutenção da tolerância periférica, também tem sido investigado na DECH em estudos com animais. A inibição de CTLA-4 em DECHa e DECHc exacerbou a letalidade da DECH aguda e melhorou a manifestação de DECHc (SAKURAI, J., 2000).

## 2.6 Polimorfismos genéticos

Polimorfismos genéticos são empregados como marcadores genéticos para distinguir diferentes formas de um gene e são entendidos como a ocorrência de múltiplos alelos num *locus*, no qual pelo menos dois alelos aparecem com frequências superiores a 1%. (MILLER, M. C., MOHRENWEISER, H. W. e BELL, D. A., 2001).

Com as técnicas de biologia molecular, tem sido possível detectar os polimorfismos que consistem, geralmente, em uma simples troca de base, deleções ou inserções casuais, ou na presença de números variáveis de cópias repetidas de um determinado fragmento de DNA (repetições em *tandem*). Uma das técnicas mais usadas para se detectar a ocorrência de polimorfismos gênicos envolve os polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) (BOTSTEIN, D. *et al.*, 1980). Os RFLPs são polimorfismos de ponto que criam ou destroem sítios de restrição enzima-específicos. Como as enzimas de restrição têm sequências de reconhecimento específicas no DNA, as alterações na sequência do DNA genômico acarretam a criação ou a abolição de sítios de clivagem, alterando, desse modo, o tamanho de

um ou mais fragmentos de DNA, oriundos da ação da enzima de restrição (OTTO, P. G. 1998).

A presença de polimorfismos em regiões promotoras pode gerar alterações na transcrição do gene e, quando ocorrem em éxons, pode modificar a sequência da proteína e, portanto, influenciar a sua função biológica (TAYLOR, J. J., PRESHAW, P. M e DONALDSON, P. T., 2004). Dessa forma, a presença de polimorfismos genéticos pode ocasionar mudanças funcionais do gene, sendo denominados polimorfismos funcionais.

Polimorfismos funcionais, relacionados à diferença interindividual na síntese e secreção de proteínas, têm sido associados a doenças que possuem uma patogênese inflamatória (PARKHILL, J. M., 2000). A maioria dos trabalhos que se dedicam ao assunto concentra-se em genes que codificam para citocinas e receptores importantes no processo inflamatório.

Vários estudos têm sido propostos com o objetivo de identificar marcadores genéticos específicos para as inúmeras doenças, enfatizando a busca de polimorfismos genéticos, que possam interferir na susceptibilidade dos indivíduos a essas alterações. Alguns resultados podem ser contraditórios entre as populações. Isso deve-se ao fato de populações geográfica e etnicamente distintas ter sido avaliadas refletindo o “background” genético diferenciado entre elas, assim como a possível presença de fatores seletivos, atuando em uma determinada população, o que provavelmente pode causar resultados distintos.

## **2.7 Polimorfismos genéticos e a DECH**

Polimorfismos nos genes das citocinas pró e antiinflamatórias são associados à incidência e à gravidade de DECH em TCTH alogênico. Muitos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de verificar a presença de polimorfismos genéticos e sua possível correlação com a patogenia da DECH (DICKINSON, A. M. e HOLLER, E., 2008). Outros estudos avaliaram o papel do polimorfismo genético, tanto em pacientes quanto em doadores, na incidência e severidade da DECH (CAVET, J. *et al.*, 1999). De modo geral, um gene pode ser considerado como um candidato ao estudo do polimorfismo na DECH, se os processos fisiológicos determinados por ele estiverem associados com a presença ou gravidade da doença.

Trabalhos envolvendo polimorfismos genéticos de citocinas e sua correlação com a DECH vêm apresentando resultados relevantes (DICKINSON, A. M., HARROLD, J. L. e CULLUP, H., 2007; KARABON, L. *et al.*, 2005). Kögler, G. *et al.* (2002) verificaram a

associação entre o polimorfismo no gene *TNFD3* (TNFd3/d3) e DECHa, grau III e IV e IL-10 (-1064) com a DECHa severa. Outros trabalhos relatados na literatura associam polimorfismo também nos gene *TNF*, incluindo os haplotipos -1031T/-863C/ -857C e altos graus de severidade da DECHa (CAVET, J. *et al.*, 1999; MULLIGHAM, C. G. e BARDY, P. G., 2007).

Alguns grupos de pesquisa relacionam o polimorfismo genético, tanto do doador quanto do receptor, a complicações pós-TCTH (DICKINSON, A. M., HARROLD, J. L. e CULLUP, H., 2007). Rocha, V. *et al.* (2002) verificaram, em análise de 107 pacientes submetidos ao TCTH e seus doadores, que o polimorfismo genético do receptor e do doador estão envolvidos no desenvolvimento da DECH. Esses autores constataram a influência do gene *IL-1Ra* (IL-IRN\*2) como um polimorfismo genético protetor na DECHa. Verificaram, também, a influência do gene *IL-10* e *IL-1Ra* do receptor na incidência de DECHc. Cavet, J. *et al.* (2001), em trabalho semelhante, analisando 80 pacientes e doadores, comprovaram que o receptor que possuía o alelo 3 para o gene *IFNG* Íntron 1 estava relacionado ao desenvolvimento de DECHa. Nesse estudo, não foi verificada associação entre o gene *IFNG* Intron 1 do doador ou do receptor e a DECHc. Ao analisar o gene da citocina IL-6 no receptor, constataram que o alelo IL-6<sup>174</sup>C associava-se à DECHa moderada, e o alelo IL-6<sup>174</sup>G relacionava-se à maior incidência das formas aguda e crônica da doença.

Karabon, L. *et al.* (2005) investigaram a associação do polimorfismo genético nas citocinas IL-6 e IL-10 em receptores e doadores de TCTH. Foram avaliados 93 pacientes e 74 doadores em várias fases após o transplante. Eles observaram que o polimorfismo da IL-6 do doador está associado ao desenvolvimento da DECHa. Outros estudos confirmam o papel do genótipo homozigoto *IL-6* GG como fator aliado à incidência de DECHa. A comparação entre a distribuição do genótipo *IL6* em pares doadores-receptores acumula dois fatores desfavoráveis (alelo IL-6 G e genótipo doador IL-6 GG), o que resulta em alta frequência em DECH. Neste estudo, observou-se que a presença de IL-10 *GCC/GCC* em receptores está ligada à diminuição do risco de DECH. Nenhuma associação foi encontrada em relação a polimorfismo nos genes dos doadores para IL-10.

Esses achados têm valor no que se refere ao entendimento da resposta imunológica do receptor, permitindo avanços na escolha do doador.

## 2.8 Citocinas inflamatórias na saliva e no sangue de pacientes com DECH

Alguns trabalhos têm sido conduzidos a fim de verificar a associação entre os níveis sanguíneos de citocinas envolvidas na patogênese da DECH por meio da técnica de ELISA (imunoabsorção por ligação enzimática) e o aparecimento e gravidade da doença. Min, C-K. *et al.* (2001) estudaram, em uma amostra de 52 pacientes, os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e a citocina antiinflamatória IL-10, por intermédio da técnica de ELISA sanduíche, em duplicata. Os autores analisaram as interações das citocinas ao mesmo tempo e constataram que os níveis séricos de IL-6 na semana +1 e IL-10 na semana +4 se apresentavam significativamente aumentados em pacientes que apresentavam DECHa, o que sugere que a IL-6 seja a citocina mais importante no processo inflamatório inicial. Não foi verificada ligação entre a DECH e a citocina IL-8.

Hempel, L. *et al.* (1997) relataram que altos níveis séricos de IL-10 estão associados a resultados fatais no TCTH. Imamura, M., Hashino, S. e Kobayashi, H. (1994) observaram que a DECHa é induzida por interações sinérgicas entre IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

Em estudo envolvendo 13 pacientes brasileiros, Visentainer, J. E. L. *et al.* (2003) demonstraram que os níveis séricos de sIL-2R e IL-10 desde a primeira até a 15ª semana pós-transplante eram significativamente maiores em pacientes que desenvolveram a DECHa, do que naqueles que não haviam apresentado a doença. Nenhuma associação foi observada no que se refere à citocina TNF $\alpha$ , embora tenha se comprovado o aumento nos níveis dessa citocina nas primeiras semanas pós-TCTH. A análise das citocinas IL-6 e IFN- $\gamma$  também não revelou associação com DECHa.

Nota-se que inúmeros estudos apontam a relevância da citocina anti-inflamatória IL-10 na patogênese da DECHa. Autores observam que, na maioria das mortes pós-transplante, os níveis de IL-10 encontravam-se elevados. Alta produção dessas citocinas pode também levar a uma imunodeficiência funcional, resultando em complicações aos pacientes pós-TCTH (VISENTAINER, J. E. L. *et al.*, 2003). O grupo de estudo da qual faz parte a autora deste trabalho mostrou, em pesquisa recente, que níveis aumentados de IL-10 no sangue estão relacionados à ocorrência da DECH aguda (RESENDE, R. G. *et al.*, 2010). No que diz respeito à IFN- $\gamma$ , percebeu-se um aumento dos níveis da citocina após o diagnóstico da DECHa no sangue (RESENDE, R. G. *et al.*, 2012b). Resultados semelhantes foram

observados para IL-1 $\beta$  (aumento antes e no momento do diagnóstico da DECHa) (RESENDE, R. G. *et al.*, 2013).

Essas descobertas reforçam a ideia de que um equilíbrio entre citocinas derivadas das células Th1 e Th2 pode ser importante na prevenção do desenvolvimento e no controle da DECH (VISENTAINER, J. E. L. *et al.*, 2003).

Alguns trabalhos foram propostos a fim de determinar os níveis das citocinas inflamatórias nos fluidos bucais em pacientes com DECH e com mucosite bucal após o TCTH, além de pacientes com líquen plano bucal. O grupo de pesquisa da autora, ao estudar a DECHa, mostrou relação entre o aumento dos níveis de IL-10, no sangue, na quarta semana após o TCTH e a ocorrência de DECHa (RESENDE, R. G. *et al.*, 2010). No que se refere à IFN- $\gamma$ , foi observado aumento dos níveis da citocina antes do diagnóstico de DECHa na saliva (RESENDE, R. G. *et al.*, 2012b). Para IL-1 $\beta$ , também foi detectado aumento antes e no momento do diagnóstico da DECHa (RESENDE, R. G. *et al.*, 2013). Dados preliminares ainda revelaram aumento de IL-6, nas semanas 4, 5 e 12 do transplante e a ocorrência de DECHa (RESENDE, R. G. *et al.*, dados não publicados).

Soma-se a isso estudo recente que aponta a associação entre a análise dos níveis de citocinas inflamatórias na saliva e a ocorrência de DECHc bucal. Fall-Dickson, J. M. *et al.* (2010) demonstraram relação entre os níveis de IL-6 e IL-1 $\alpha$  e a gravidade da DECHc bucal.

Rhodus, N. L. *et al.* (2005) analisaram os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1- $\alpha$  e IL-6 na saliva de 13 pacientes diagnosticados com líquen plano oral, empregando-se ELISA, e tendo como grupo controle 13 pacientes saudáveis. Os autores observaram altos níveis dessas citocinas nos pacientes com líquen plano bucal, em relação ao grupo controle. Em outro estudo, 25 pacientes foram selecionados a fim de se determinar a relação entre os níveis salivares de TNF- $\alpha$  e a ocorrência de mucosite. Foi observado que, embora nenhuma relação estatisticamente significativa tenha sido encontrada, a elevada concentração de TNF- $\alpha$  na saliva não estimulada no dia +9 sugere que a saliva pode representar um método útil para detecção de marcadores pró-inflamatórios na mucosite bucal (FALL-DICKSON, J. M. *et al.*, 2007).

Até o presente momento, raros estudos foram desenvolvidos para investigar os biomarcadores envolvidos com a DECHc na saliva. Dessa forma, a dosagem dos níveis de citocinas na saliva pode ser também um valioso método para prever a ocorrência da DECH em paciente pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas.

Esses resultados apontam, em conjunto, que essas citocinas inflamatórias podem ser detectadas em fluidos bucais, com potencial de prognóstico para monitoramento da atividade da doença e, dessa forma, contribuir para decisões terapêuticas.

## **2.9 Expressões de citocinas inflamatórias e de marcadores de células T em pacientes com DECH por citometria de fluxo**

Sabe-se que após o alo-TCTH o sistema imune pode apresentar um desequilíbrio na resposta Th1 e Th2 e que diversas citocinas e subpopulações linfocitárias têm importante participação na DECH aguda e crônica. No entanto, os estudos conduzidos até o momento, em sua maioria, são retrospectivos ou analisam um ou poucos fatores. Tais características, associadas à dificuldade de obter grandes populações de pacientes para os trabalhos de pesquisa, finalizam em resultados controversos ou imprecisos. No que se refere à DECHc, pouco se sabe ainda sobre o processo Th1-Th2 ou sobre a subpopulação de linfócitos envolvidos em sua patogênese (SKERT, C. *et al.*, 2009). Nesse sentido, a técnica de citometria de fluxo tem sido empregada para agregar novas ferramentas de análise na busca pelo entendimento das diferentes populações celulares e dos mediadores inflamatórios envolvidos no desenvolvimento da DECH.

O emprego do citômetro de fluxo para mensurar os níveis de IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  realizado por Fowler, D. H. *et al.* (1994) relacionaram essas dosagens à DECH clínica e mostraram que a redução da intensidade da DECH em trato gastrointestinal estava associada à secreção inicial de IL-1 $\alpha$ , seguida pela liberação de TNF- $\alpha$  por células T CD4<sup>+</sup>.

No intuito de conduzir um trabalho mais abrangente para a elucidação da DECHc, Skert, C. *et al.* (2009) avaliaram níveis de citocinas e subpopulações linfocitárias em 30 pacientes, com o propósito de investigar uma possível correlação com a DECHc. Os resultados mostraram células NK e células T CD152<sup>+</sup> como preditores negativos da doença crônica. A citocina TNF- $\alpha$  revelou-se prevalente antes e durante a DECHc.

Outro estudo, que procurou esclarecer o papel de subpopulações de células Th dos doadores na patogênese da DECH, evidenciou que a ausência de produção de IFN- $\gamma$  pelas células T CD4<sup>+</sup> resulta em um aumento na diferenciação de células Th2 e Th17 e exacerba o dano tecidual em pele e fígado. Além disso, seus autores observaram que a ausência de IL-4 e IFN- $\gamma$  reverte-se em um aumento da diferenciação de células Th17 e, preferencialmente, mas não exclusivo, dano em pele. Verificaram, ainda, que a ausência de IFN- $\gamma$  e IL-17 leva ao aumento da diferenciação de células Th2 e pneumonia idiopática. Esses resultados

demonstraram que células T CD4<sup>+</sup> do doador podem se diferenciar em células Th1, Th2 e Th17, que medeiam a DECH órgão-específicas (YI, T. *et al.*, 2009). Atestam, também, que a mensuração serial de citocinas e a identificação de subpopulações celulares por citometria de fluxo pode representar um método acessível de monitoramento de DECH e, com isso, facilitar o emprego de estratégias de intervenção precoce sobre a doença.

### 3 JUSTIFICATIVA

A doença do enxerto contra o hospedeiro crônica representa uma das maiores complicações que se segue ao TCTH. Nos últimos anos, a ocorrência dessa síndrome tem aumentado e o seu tratamento ainda permanece insatisfatório. É fundamental assegurar a clareza no diagnóstico da DECHc e, para isso, esforços têm sido concentrados no sentido de compreender a patogenia da doença.

Sabe-se que as células T desempenham um papel central como efetoras da DECH. Vários pesquisadores têm se dedicado ao estudo de tais células. Já foi visto que, em humanos, a imunofenotipagem do sangue periférico de pacientes que apresentam a DECH contribui para a caracterização do perfil imune desses pacientes e para o entendimento da ocorrência e gravidade da doença.

Percebe-se ainda, que o acompanhamento dos pacientes TCTH com dosagem semanal dos níveis de citocinas, tanto no sangue quanto na saliva, poderá esclarecer a influência da carga genética do doador e do receptor, no que diz respeito ao potencial de produção de citocinas e o impacto sobre o desenvolvimento da DECH.

Além disso, polimorfismos genéticos de citocinas pró e anti-inflamatórias têm sido associados ao desenvolvimento e gravidade da DECH. Esses polimorfismos conferem alterações funcionais na regulação de citocinas e, conseqüentemente, influenciam o desenvolvimento da expressão clínica de várias doenças relacionadas ao TCTH.

Apesar dos importantes achados até o momento, ainda não estão bem estabelecidas as questões sobre as populações celulares responsáveis pelo desenvolvimento da DECHc, os antígenos que respondem pela ativação celular e sua manutenção, além do repertório envolvido.

Diante do exposto, este trabalho busca analisar importantes associações imunobiológicas envolvidos na patogênese e na modulação da DECHc, bucal e sistêmica, ainda pouco explorados.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

- Avaliar a expressão genotípica e fenotípica de genes envolvidos com a resposta imuno-inflamatória na DECH crônica, após alo-TCTH.

### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a relação entre a ocorrência de polimorfismos funcionais nos genes das citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) com a DECHc, bucal e sistêmica, em indivíduos submetidos ao TCTH e nos doadores;
- Comparar a dosagem das citocinas inflamatórias, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A, IL-17F, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10, no sangue e na saliva, nos pacientes submetidos ao TCTH e sua associação com a ocorrência e gravidade da DECHc, bucal e sistêmica;
- Examinar a expressão de moléculas relacionadas ao repertório e ativação (CD4, CD8, CD25, Foxp3 e CTLA-4) de células T de pacientes que apresentavam a DECHc bucal e sem a doença, em condições estimuladas e sem estímulos;
- Estimar a produção das citocinas IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  pelas células T provenientes do sangue periférico de pacientes que apresentam DECHc bucal e sem a doença.
- Estimar a produção das citocinas IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  pelas células T provenientes do sangue periférico de pacientes que foram submetidos ao TCTH e em indivíduos não-TCTH.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Aspectos Éticos**

Este trabalho obedece ao que é exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS nº 196/96 e 304/00 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP), no Parecer ETIC Nº 0124.0.203.00-11 (Anexo 1) e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão (DEPE) do Hospital das Clínicas da UFMG, no Processo nº 037/11 (Anexo 2).

Os pacientes e/ou responsáveis, os doadores e os voluntários saudáveis foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e foi solicitada a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido de todos os pacientes e doadores para a participação da pesquisa (Anexos 3 e 4).

### **5.2 Critérios de elegibilidade**

Foram admitidos no estudo:

- Pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da UFMG, que assinaram o termo de consentimento informado (assinado pelos pais em casos de pacientes menores de idade);
- Doadores de células-tronco hematopoiéticas, que assinaram o consentimento informado (assinado pelos pais em casos de doadores menores de idade);
- Indivíduos clinicamente saudáveis, não submetidos ao TCTH.

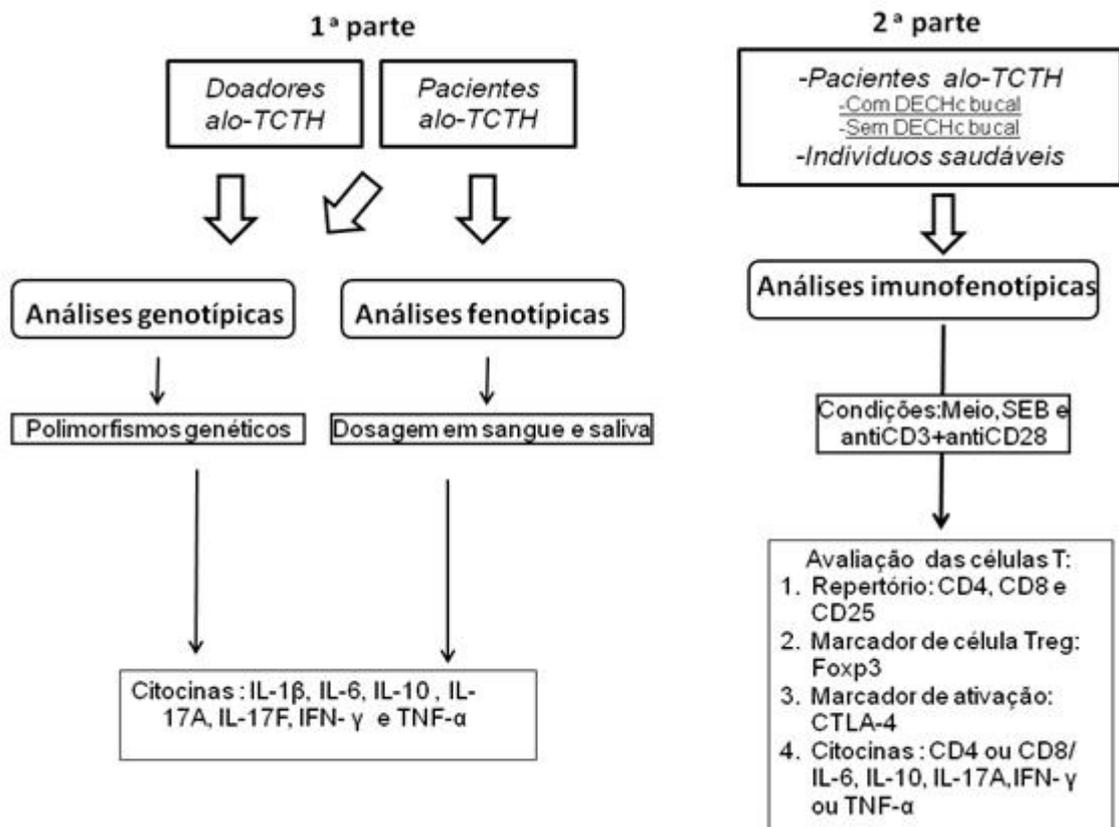
### **5.3 Critérios de exclusão**

- Recusa em assinar o consentimento informado;
- Pacientes submetidos ao TCTH autólogo.

### **5.4 Estratégia de estudo**

O estudo foi conduzido em duas partes distintas, destacadas na Figura 4. Na primeira parte, foram realizados estudos genotípicos e fenotípicos referentes a citocinas pró e anti-inflamatórias em pacientes pós-TCTH. Na segunda parte do trabalho, foram elaboradas análises imunofenotípicas referentes a citocinas pró e anti-inflamatórias e a marcadores de repertório e ativação de linfócitos, em pacientes TCTH com DECHc bucal, sem a doença e em indivíduos saudáveis.

Figura 4 - Esquema do desenho experimental do trabalho de pesquisa, evidenciando etapas do estudo, as condições de análises e as populações celulares examinadas



Fonte: da autora.

## **5.5 Avaliações genótípicas e fenotípicas de citocinas em indivíduos alo-TCTH e doadores**

Nesta seção, descreve-se a primeira parte do trabalho de pesquisa, constituída de estudos genóticos e fenotípicos, relativos a citocinas pró e anti-inflamatórias em pacientes pós-TCTH.

### **5.5.1 Pacientes e Amostras**

Cinquenta e oito pacientes submetidos ao TCTH na Unidade de Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas da UFMG foram incluídos no estudo, no período de outubro de 2006 a outubro de 2010.

Eles foram condicionados de acordo com o protocolo da Unidade de Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas da UFMG. Ciclosporin (CSA) combinado com Methotrexato (MTX) ou Micofenolato mofetil (MMF) foram usados como profilaxia de DECH e metilpredinona 2mg/Kg combinado com CSA foram utilizados para o tratamento da DECH após o TCTH.

Os dados demográficos dos pacientes, bem como dados clínicos e laboratoriais foram revisados dos prontuários do HC-UFMG. As informações clínicas dos pacientes submetidos ao alo-TCTH incluíram o tipo de doença primária, a fonte de células-tronco, o gênero e a idade dos pacientes e doadores, o regime condicionante e a compatibilidade do HLA.

Foram coletadas amostras de sangue e de saliva de pacientes submetidos ao alo-TCTH no sétimo dia antes do transplante (dia -7), no dia do transplante (dia zero) e nas semanas subsequentes até o paciente completar 100 dias de transplante (+7, +14, +21, +28, +35, +42, +49, +56, +63, +70, +77, +84, +91 e +100 dias após o TCTH) para a as reações de ELISA. Uma amostra de sangue de cada paciente e do respectivo doador foi obtida previamente ao transplante para a avaliação genética.

### **5.5.2 Estadiamento da DECH crônica**

#### **5.5.2.1 DECHc bucal**

#### 5.5.2.1.1 Estadiamento histológico

Para o estadiamento histológico da DECHc de mucosa bucal e de glândula salivar menor foram executadas biópsia de lábio inferior, após o dia +100, conforme protocolo de Serviço de Transplante de Medula Óssea do HC-UFG. Todos os casos de biópsias de lábio foram classificadas de acordo com o método quantitativo descrito por Gomez, R. S. *et al.* (2001), que consiste na contagem do infiltrado inflamatório total em seis campos histopatológicos, mantendo-se um aumento de 400 vezes:

- ausente: não apresenta infiltrado inflamatório ou este é inferior a 30 células;
- leve: entre 30 a 140 células;
- moderado: 141 a 250 células. Disposição do infiltrado em banda subepitelial na mucosa com destruição inicial dos ácinos glandulares na submucosa;
- grave: infiltrado inflamatório acima de 250 células, além de destruição, pelo menos parcial, das células da camada basal e necrose de células em satélite ou pela presença de degeneração dos ácinos glandulares e necrose das células ductais.

#### 5.5.2.1.2 Estadiamento clínico

A extensão e severidade do envolvimento da mucosa bucal pela DECHc foi determinada pelo modelo modificado da Escala de Classificação de Mucosa Oral, segundo Schubert, M. M. *et al.* (1992). O método avalia a presença de lesões brancas, que se apresentam clinicamente como áreas liquenoides, e de lesões vermelhas, que em exame clínico são observadas como atrofia, eritema e ulcerações. A classificação, de acordo com o tipo de lesão e o número de áreas anatômicas envolvidas, é mostrada no Quadro 1.

Quadro 1 - Critérios para o estadiamento da DECHc bucal

<b>Classificação</b>
0 – normal
1 – lesões brancas (1 a 2 áreas anatômicas)
2 – lesões brancas (> 2 áreas anatômicas)
3 – lesões vermelhas (1 a 2 áreas anatômicas)
4 – lesões vermelhas (> 2 áreas anatômicas)

Fonte: Baseado em SCHUBERT, M. M. *et al*, 1992.

#### 5.5.2.2 DECHc sistêmica

A determinação da DECHc sistêmica seguiu o proposto pelo consenso do NIH (FILIPOVICH, A. H. *et al.*, 2005), que considera os seguintes critérios:

- Distinção da DECHa;
- Presença de, no mínimo, um sinal clínico de diagnóstico da DECHc ou a existência de pelo menos uma manifestação distinta (não observada na DECHa, mas não suficiente para ser considerada sinal de diagnóstico da DECHc), confirmada por biópsia, testes laboratoriais ou imagens radiológicas (Quadro 2);
- Exclusão de outros diagnósticos possíveis.

Um sistema de pontuação clínico (0-3) foi utilizado para a avaliação dos órgãos ou locais individualmente. Por fim, foi realizada uma avaliação global da gravidade (leve, moderada ou grave), considerando-se a combinação das pontuações obtidas na avaliação individual dos órgãos ou locais acometidos (BOUZAS, L. F. S. *et al.*, 2010).

Quadro 2 - Critérios para o estadiamento clínico da DECHc sistêmica

<b>Critérios</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Distintivo</b>	<b>Outros</b>	<b>Comum com a DECHa</b>
<b>Pele</b>	Poiquilodermia, líquen plano, alterações escleróticas. morfeia	Despigmentação	Alteração da sudorese, ictiose, queratose, pilaris, hipo/hiperpigmentação	Eritema, rash maculopapular, prurido
<b>Unhas</b>		Distrofia, estrias longitudinais, fragilidade, onicólise, pterygium ungueal, perda ungueal		
<b>Couro Cabeludo/Pelos</b>		Alopécia cicatricial, lesões descamativas e papuloescamosas		
<b>Boca</b>	Lesões liquenoides, placas hiperkeratóticas, esclerose	Xerostomia, mucocela, atrofia, úlceras, pseudomembranas		Gengivite, mucosite, dor, eritema
<b>Olhos</b>		Secura, dor, conjuntivite cicatricial, queratoconjuntivite sicca	Fotofobia, hiperpigmentação periorbital	
<b>Genitais</b>	Líquen plano, cicatrizes ou estenose vaginal			
<b>Digestivo</b>	Membrana esofágica, estenose até 1/3 médio do TGI		Insuficiência pancreática exócrina	Anorexia, diarreia, vômitos, perda de peso
<b>Fígado</b>				BT, FA > 2x limite superior do normal TGO ou TGP > 2xN
<b>Pulmonar</b>	BO diagnosticada por biópsia pulmonar	BO diagnosticada por espirometria e radiologia		BO por pneumonia
<b>Muscular/Fáscia/ Articulações</b>	Fasceíte, rigidez ou contracturas articulares secundárias a esclerose	Miosite ou polimiosite (requer biópsia)	Edema espasmos, artralgia, artrite	
<b>Hematológico/ Imunológico</b>			Trombopenia, eosinofilia, linfopenia, hipo/hipergamaglobulinemia, anticorpos (AHAI, PTI)	
<b>Outros</b>			Derrame pericárdico ou pleural, ascite, neuropatia periférica, miastemia gravis, cardiomiopatia	

Fonte: Adaptado de FILIPOVICH, A. H. *et al.* (2005). [BT: bilirrubina total, FA: fosfatase alcalina, TGO: transaminase glutâmico-oxalacética, TGP: transaminase glutâmico-piruvica, AHAI: anemia hemolítica autoimune, PTI: púrpura trombocitopênica, BO: bronquiolite obliterante].

### 5.5.3 Reações de ELISA

As amostras de sangue e saliva dos pacientes foram coletados no sétimo dia antes do transplante (dia -7), no dia zero (dia do transplante), +7, +14, +21, +28, +35, +42, +49, +56, +63, +70, +77, +84 +91 e +100 dias após o TCTH. A saliva foi obtida através de um tubo especial para coleta de saliva (Salivette, D-51588, Numbrecht), de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras de soro e de saliva foram utilizadas para dosagem de citocinas pela técnica de ELISA, como descrito por Ondrey, F. G., Dong, G. e Sunwoo, J. (1999), utilizando os seguintes *kits*: Human IL-6 DuoSet (DY206) R&D; Human IL-1 beta DuoSet (DY201) R&D; Human TNF-alpha DuoSet (DY10) R&D; Human IFN-gamma DuoSet (DY285) R&D; Human IL-10 DuoSet (DY217B) R&D, Human IL-17 DuoSet (DY1700) R&D e Human IL-17F DuoSet (DY1335) R&D . Os procedimentos de ELISA foram realizados de acordo com as especificações dos fabricantes.

### 5.5.4 Avaliação dos polimorfismos genéticos

Para este estudo, foram coletados 3 ml de sangue de todos os pacientes, em tubo contendo EDTA, que foi congelado imediatamente a -20°C. Também foram coletados 3 ml de sangue dos respectivos doadores, em tubo contendo EDTA. Dos pacientes e/ou doadores dos quais não foi possível obter o sangue para o estudo genético, uma amostra de raspa da mucosa bucal foi coletada com citobrush estéril. Em seguida, as amostras foram colocadas em um tubo de 1000 µl, contendo 450 µl de solução de Krebs, centrifugada a 9300 g, em microcentrífuga (Eppendorf – 5415 D), por 10 minutos e o precipitado armazenado a -20°C até a extração de DNA.

#### 5.5.4.1 Extração do DNA: sangue e raspado

O DNA das amostras foi extraído com o uso do *kit* QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen 51106) de acordo com as instruções do fabricante. Logo após a extração, 2 µl de cada amostra foram diluídos em 98 µl de água e usados para espectrometria. O restante das amostras foi estocado a -20°C.

#### 5.5.4.2 Reações de PCR e digestão enzimática

O DNA extraído foi utilizado na reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo que 200 ng do DNA obtido de cada amostra foram usados para as reações de PCR. Empregou-se uma solução Pré-mix (Phoneutria), contendo desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), a enzima Taq DNA polimerase e tampão de incubação específico (Pht, Brasil), à qual foi adicionado o DNA genômico, que foi amplificado. A reação foi desenvolvida em termocicladores (Eppendorf).

Para determinação do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) de IFN- $\gamma$  (+874 A $\rightarrow$ T) empregou-se a técnica de PCR, conforme descrito por Awad, M. *et al.* (1999). PCR com enzimas de restrição foi utilizado para determinação de polimorfismos (RFLP) dos genes das citocinas IL-1 $\beta$  (+3954C $\rightarrow$ T), IL-6 (-174 G $\rightarrow$ C), IL-10 (-1082 G $\rightarrow$ A), IL-17A (197G $\rightarrow$ A), IL-17F (T $\rightarrow$ C), TNF- $\alpha$  (-308 G $\rightarrow$ A). Os produtos de PCR foram digeridos por enzimas de restrição específicas, que clivam o DNA em sequências alvo: Hsp92II, NcoI (Promega, Madison, WI, USA), NlaIII e XagI (MBI fermentas), segundo instruções do fabricante. Pela avaliação dos produtos da digestão foi possível estabelecer o genótipo do indivíduo, baseado no tamanho dos fragmentos gerados.

As sequências de primers, as enzimas de restrição que foram utilizadas para a detecção de cada polimorfismo avaliado e os possíveis fragmentos gerados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequência de primers, enzimas de restrição e produtos para cada polimorfismo a ser avaliado

Genes e SNP ID	Lócus	Sequências de primers	Enzimas de restrição	Referência
<i>IL1B</i> rs1143634	+3954 (C/T)	5' CTC AGG TGT CCT CGA AGA AAT CAA A 3' 5' GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG 3'	TaqI (37°C/4h)	KORNMAN <i>et al.</i> , 1997
<i>IL6</i> rs1800795	-174 (G/C)	5'CAGAAGAACTCAGATGACTG 3' 5'GTGGGGCTGATTGGAAACC 3'	Hsp92II (37°C/12h)	KLEIN <i>et al.</i> , 2001
<i>IL10</i> rs1800896	-1082 (G/A)	5'CCAAGACAACACTACTAAGGCTCCTTT 3' 5'GCTTCTTATATGCTAGTC AGGTA 3'	XagI (37°C/4h)	KOCH, W. <i>et al.</i> , 2001
<i>INFG</i> rs2430561	+874 (A/T)	5'TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3' (alelo T) 5'TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3' (alelo A) 5'TCAACAAAGCTGATACTCCA-3' (genérico)	—	AWAD, M. <i>et al.</i> , 1999
<i>TNFA</i> rs1800629	-308 (G/A)	5'AGGCAATAGGTT TTGAGGGCCAT 3' 5'TCCTCCCTGCTCCGATTCCG 3'	NcoI (37°C/12h)	KORNMAN <i>et al.</i> , 1997
<i>IL17A</i> rs2275913	197 (G/A)	5'AACAAGTAAGAATGAAAAGAGGACATGGT 3' 5'CCCCCAAATGAGGTCATAGAAGAGAATC 3'	XagI (37°C/12h)	WU, X. <i>et al.</i> , 2010
<i>IL17F</i> rs763780	7488 (T/C)	5'-GTTCCCATCCAGCAAGAGAC-3' 5'-AGCTGGGAATGCAAACAAAC-3'	NLAIII (37°C/12h)	KAWAGUCHI <i>et al.</i> , 2006

Fonte: da autora

## 5.6 Avaliação imunofenotípica da expressão de marcadores de superfície celular e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos com e sem DECHc bucal

Nesta seção, descreve-se a segunda parte do trabalho de pesquisa, que trata das análises imunofenotípicas referentes a citocinas pró e anti-inflamatórias e a marcadores de repertório e ativação de linfócitos, em pacientes TCTH com DECHc bucal, sem a doença e indivíduos saudáveis.

### 5.6.1 Pacientes e Amostras

Para essa etapa do estudo, foram selecionados 12 pacientes pós-TCTH, advindos da Unidade de Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas da UFMG. Entre eles, oito apresentavam lesões clinicamente detectáveis de DECHc bucal e os demais não apresentavam a doença. Além disso, três indivíduos saudáveis, não submetidos ao TCTH, também foram incluídos no estudo. Nos portadores de DECHc bucal, a coleta foi realizada no momento em que o paciente manifestou os primeiros sinais e sintomas da doença.

Os dados demográficos dos pacientes, bem como dados clínicos e laboratoriais foram revisados dos prontuários do HC-UFMG. As informações clínicas dos pacientes submetidos ao alo-TCTH incluíram o tipo de doença primária, a fonte de células-tronco, o gênero e a idade dos pacientes e doadores, o regime condicionante e a compatibilidade do HLA.

Nessa etapa, amostras de sangue periférico foram coletadas dos indivíduos para obtenção das CMSP em tubo, contendo EDTA.

### **5.6.2 Estadiamento da DECH crônica bucal**

Os critérios utilizados nesse procedimento já foram descritos na seção 5.5.2.

### **5.6.3 Obtenção do sangue total**

Foram coletados, através de punção de veia periférica, aproximadamente 9 ml de sangue de cada indivíduo, em tubos a vácuo, contendo Heparina.

### **5.6.4 Imunofluorescência para avaliação imunofenotípica**

O protocolo de realização da imunofluorescência para a avaliação fenotípica foi realizado conforme Dutra, W. O. *et al.* (2000). Após o período de 16 horas em cultura, na presença de meio apenas ou estimulado com enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB) (120 ng/ml) ou estímulo policlonal anti-CD3 + anti-CD28 (10µg/ml), 1mg/ml de brefeldina A foi adicionada às culturas de células, para impedir que elas secretassem citocinas. Após um período de incubação por 4 horas com a brefeldina, as CMSP foram retiradas da cultura e centrifugadas por 8 minutos, 1300 rpm, a 4°C. Cerca de 200.000 células foram incubadas com anticorpos monoclonais associados a fluorocromos, para a marcação das moléculas de superfície, por 15 minutos, a 4°C. Esses anticorpos reconhecem as moléculas expressas na superfície celular e permitem a identificação das células, como CD25. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS, seguida de centrifugação (8 minutos, 1300 rpm, 4°C). Em seguida, as amostras foram fixadas em formaldeído a 2%, por 20 minutos, à temperatura ambiente.

Para a marcação intracitoplasmática das citocinas, após a marcação das moléculas de superfície, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas e, a seguir, permeabilizadas por 10 minutos de incubação com solução de permeabilização (0,5% de saponina em PBS) à temperatura ambiente. Após centrifugação, as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com os anticorpos monoclonais anticitocinas. Em seguida, foram lavadas duas vezes por adição de solução de permeabilização, seguida de centrifugação (8 minutos, 1300 rpm, 4°C). Finalmente, as amostras foram ressuspensas em tampão PBS 0,1% BSA / 0,1% azida, lidas e analisadas em citômetro de fluxo (FACScanto-Becton-Dickenson). Em todos os ensaios, foram realizadas marcações com anticorpos de especificidade não relacionada, pertencentes ao mesmo isotipo e marcados com os mesmos fluorocromos dos anticorpos específicos, a título de controle. Os anticorpos que foram utilizados nesses experimentos estão descritos no Quadro 3.

Quadro 3 - Anticorpos monoclonais fluorescentes utilizados no estudo

ESPECIFICIDADE	FLUOROCROMO	MARCA	CLONE	DILUIÇÃO
CD8	Cy	eBioscience	RPA-T8	1:20
CD25	PE	Catalag	MHCD2504	2:20
CTLA-4	PE	eBioscience	14D <sub>3</sub>	2:20
Foxp3	FITC	eBioscience	PCH101	1:20
IL-6	PE	RD	1936	1:20
IL-10	PE	BDPharmingen	JES3-19F1	2:20
IFN- $\gamma$	PE	BDPharmingen	45B <sub>3</sub>	1:20
TNF- $\alpha$	PE	BDPharmingen	MAb11	2:20
IL-17A	PE	eBioscience	eBio64DEC17	1:20
CD4	FITC	eBioscience	OKT4	1:10

Fonte: da autora [Isotiocianato de fluoresceína (FITC), Ficoeritrina (PE) e Cy-chome (CY)].

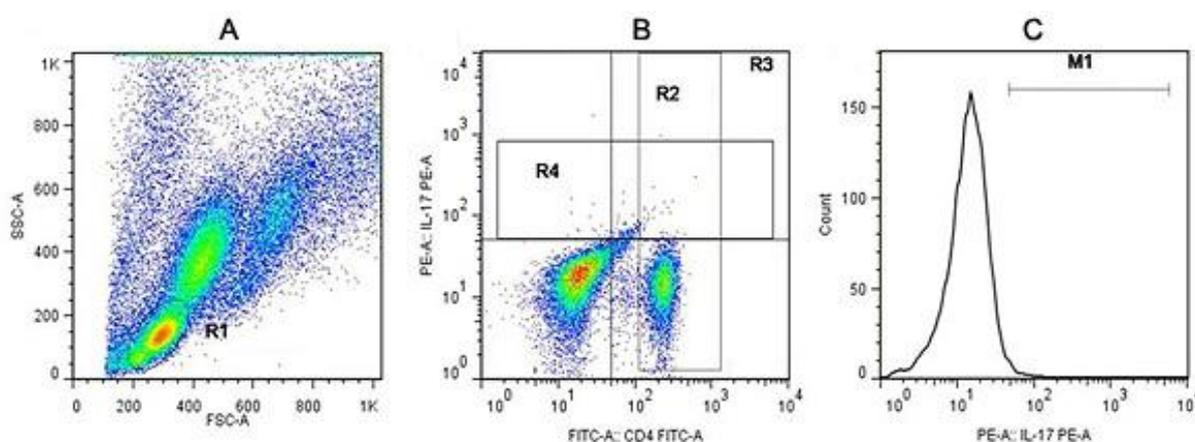
### 5.6.5 Aquisição no citômetro de fluxo e análise dos dados

O citômetro de fluxo utilizado neste estudo, um FACScanto (Becton-Dickson), permite a avaliação básica de cinco parâmetros: tamanho (FCS) e granulosidade (SSC) — obtidos pelas características morfológicas das células, independentemente de qualquer fluorescência —, além das fluorescências do tipo 1 (FL1), tipo 2 (FL2) e tipo 3 (FL3). FL1, FL2 e FL3 correspondem a sinais luminosos emitidos pela excitação do isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e cy-chome (CY), respectivamente. Essas características são detectadas ao utilizar-se um sistema óptico-eletrônico, que avalia a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula e a emissão de fluorescência, dada pelos

diferentes fluorocromos, em diferentes comprimentos de onda. O emprego de anticorpos monoclonais, acoplados a fluorocromos que emitem fluorescência em diferentes comprimentos de onda, permitem identificar, em uma mesma célula, estruturas distintas, reconhecidas pelos anticorpos específicos.

Foram realizadas as avaliações do perfil celular da amostra, com relação ao tamanho e a granulidade das CMSP, selecionando a região dos linfócitos (Figura 5A). A identificação da população celular de interesse foi confirmada por gráficos de intensidades de fluorescências (Figura 5B), seguida de análise por histogramas para demais moléculas de interesse (Figura 5C).

Figura 5 - Estratégia de análise para quantificar o percentual de células IL17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> nas CMSP



Fonte: da autora.

Dot-plot que demonstra a população de linfócitos selecionada (R1) encontra-se na Figura 5A e os dados analisados em células T CD4<sup>+</sup> totais (R2), na Figura 5B. Na figura 5C, verifica-se que o histograma de cor única (M1), que expressa IL-17A nas células T CD4<sup>+</sup> foi obtido a partir região R2. Células IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> em linfócitos totais (R3) e de produção de IL-17A total (R4) também foram analisadas no gráfico dot-plot (Figura 5B).

Para a aquisição, armazenamento e análise dos dados referentes à resposta celular foi empregado um citômetro de fluxo, equipado com sistema de computador, contendo o BD FACSDiva™ 6.0 software (*San Jose, California, USA*). Os dados obtidos foram analisados de acordo com o programa FlowJo 7.5.5™ Tree Star (*Ashland, Oregon, USA*).

## 5.7 Análises estatísticas

Todos os resultados deste estudo foram submetidos aos testes de outliers e normalidade (teste de Shapiro-Wilk). Aos resultados que assumiram distribuição não paramétrica foi aplicado o teste de Wilcoxon. Aos dados que assumiram distribuição normal aplicou-se a análise de variância ANOVA One-way ou o teste de Mann-Whitney. A correlação entre desfechos dicotômicos foi realizada pelo teste do Chi Quadrado ou pelo teste exato de Fisher (quando apropriado). Odds Ratio (OR) foi calculado, considerando-se um intervalo de confiança de 95% (*SPSS Inc., version 17.0, Chicago, Illinois, USA*). Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 Avaliações genotípicas e fenotípicas de citocinas em indivíduos alo-TCTH e doadores**

Esta seção apresenta os resultados da primeira parte do estudo.

#### **6.1.1 Características clínicas e demográficas: pacientes e doadores**

A amostra incluiu 25 mulheres e 33 homens, com mediana de idade de 30,5 anos (variação de 5 a 56). Dentre os doadores, 37 eram mulheres e 21 eram homens. A mediana de idade dos doadores foi de 35,4 anos (variação de 6 a 69).

Quarenta (69%) dos 58 pacientes apresentavam doenças malignas e 18 (31%), doenças não malignas. Dentre os portadores de doenças neoplásicas malignas, 12 (20,7%) apresentavam leucemia mielocítica crônica (LMC); 18 (31%), leucemia mielocítica aguda (LMA); 3 (5,1%), doença de Hodgkin; 4 (6,9%), leucemia linfocítica aguda (LLA); 2 (3,4%), mieloma múltiplo e 1 (1,7%), mielodisplasia. Entre os pacientes com doenças não malignas, 13 (22,4%) apresentavam anemia aplásica (AA); 2 (3,4%), anemia de Fanconi (AF); 2 (3,4%), hemoglobinúria paroxística noturna e 01 (2%), mielofibrose.

Ao longo do acompanhamento, 27/58 pacientes avaliados apresentaram DECHc bucal e 42/58, DECHc sistêmica. Daqueles 27 pacientes, 22 apresentaram a doença bucal e destes 42, 26 foram positivos para a DECHc sistêmica.

Os principais dados sobre os pacientes e sobre o transplante estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 2 - Principais características dos pacientes submetidos ao TCTH

<b>PARÂMETROS</b>	
<b>SEXO DO PACIENTE</b>	
Masculino	25 (43,1%)
Feminino	33 (56,9%)
Mediana da idade dos pacientes	30,5 anos Variação de 5 a 56 anos
<b>DOENÇA</b>	
Maligna	40 (69%)
Não maligna	18 (31%)
<b>SEXO DO DOADOR</b>	
Masculino	21 (36,3%)
Feminino	37 (63,7%)
Mediana da idade dos doadores	35,4 anos Variação de 6 a 69 anos
<b>FONTE DE CÉLULAS</b>	
Medula óssea	32 (55,2%)
Células-tronco periféricas	25 (43,1%)
Cordão umbilical	1 (1,7%)
<b>DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO CRÔNICA</b>	
Bucal	22/27 (81,4%)
Sistêmica	26/42 (61,9%)

Fonte: da autora

### 6.1.2 Reações de ELISA

Vinte e sete pacientes foram avaliados quanto ao desenvolvimento de DECHc bucal. No entanto, o número de amostras em cada momento (n) sofreu variações por perdas intrínsecas ao processo de coleta. Relação estatisticamente significativa foi observada entre os altos níveis de IFN- $\gamma$  em saliva, nos dias +7, +91,+100 (p=0,047, p=0,022 e p=0,022, respectivamente), além de aumento da citocina IL-1 $\beta$  no sangue no dia +84 (p=0,033), na saliva no dia +81 (p=0,022) e a DECHc bucal clínica (Tabela 3). Entre as citocinas e a forma clínica da DECHc bucal não foi verificada relação estatisticamente significativa (dados não mostrados).

Tabela 3 - Associação entre os níveis das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  e a DECHc bucal clínica

DECHc bucal Clínica		IFN- $\gamma$ SL Dia +7	IFN- $\gamma$ SL Dia +91	IFN- $\gamma$ SL Dia +100	IL1- $\beta$ SG Dia +84	IL1- $\beta$ SL Dia +91
<b>Ausente</b>	n	14	12	12	18	12
	Mediana	0,00	0,00	0,00	15,40	10,05
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	494,42	166,83	63,57	90,16	26,02
<b>Presente</b>	n	3	2	2	4	2
	Mediana	141,57	591,55	635,10	31,69	100,77
	Mínimo	12,28	182,23	151,01	20,38	89,71
	Máximo	19949,97	1000,87	1119,26	46,85	111,84
	<b>p*</b>	<b>0,047</b>	<b>0,022</b>	<b>0,022</b>	<b>0,033</b>	<b>0,022</b>

Fonte: da autora [SL: saliva (pg/mg de proteína) SG: sangue (pg/mL) \*Teste Mann Whitney].

Níveis mais baixos tanto de IFN- $\gamma$  (em dois momentos), quanto de IL-1 $\beta$  foram associados à forma histológica da DECHc bucal, no sangue e na saliva nos dias +84, +100 e +49 (p=0,014, p= 0,038 e p=0,037, respectivamente). O aumento de IL-6 no sangue foi associado à DECHc bucal no dia +21 (p=0,014), conforme Tabela 4. Para a correlação entre as demais citocinas e a forma histológica da DECHc bucal, não foi possível averiguar relação estatisticamente significativa (dados não mostrados).

Tabela 4 - Associação entre os níveis de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  e a DECHc bucal histológica

DECHc bucal Histológica		IFN- $\gamma$ SG Dia +84	IFN- $\gamma$ SG Dia +100	IL-6 SG Dia+21	IL1- $\beta$ SL Dia +49
<b>Ausente</b>	n	05	04	05	03
	Mediana	65,76	137,31	7,78	108,08
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	39,87
	Máximo	508,51	470,36	63,02	410,29
<b>Presente</b>	n	13	14	18	13
	Mediana	0,00	5,00	61,18	2,51
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	614,07	650,64	2106,44	154,43
	<b>p*</b>	<b>0,014</b>	<b>0,038</b>	<b>0,014</b>	<b>0,037</b>

Fonte: da autora [SL: saliva (pg/mg de proteína) SG: sangue (pg/mL) \*Teste Mann Whitney].

Não se constatou relação estatisticamente significativa para nenhuma citocina estudada (em sangue e saliva) e a forma sistêmica da doença (dados não mostrados).

### **6.1.2 Polimorfismos genéticos**

A associação entre os genótipos de *IL6*, *IL10*, *IL1B*, *TNFA*, *IFNG*, *IL17A* e *IL17F* dos pacientes e dos doadores com a DECHc sistêmica e bucal, pode ser percebida na Tabela 6.

Foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre a presença da DECHc sistêmica e o polimorfismo de *IL17A* ( $p=0,032$ ). Vale ressaltar que o n final para as análises efetuadas com esta citocina foi igual a 34, devido a perdas no processo de verificação do polimorfismo. Não se verificou associação estatisticamente significativa entre a DECHc sistêmica e os demais genes estudados. Para a DECHc bucal, relação estatisticamente significativa foi confirmada entre a presença da doença e o genótipo polimórfico de *IL1B* ( $p=0,015$ ) e à ausência da doença e o polimorfismo de *IFNG* ( $p=0,035$ ), conforme se demonstra na Tabela 5.

Tabela 5 - Associação entre os genótipos de *IL6*, *IL10*, *IL1B*, *TNFA*, *IFNG*, *IL17A* e *IL17F* dos pacientes e dos doadores e a ocorrência de DECHc sistêmica (n=42) e bucal (n=27)

	Gene (Polimorfismo)	Genótipo	DECHc sistêmica		p*	DECHc bucal		p*
			A	P		A	P	
<b>P A C I E N T E</b>	<i>IL6</i> (-174)	CC	12	10	NS	01	12	NS
		GC	11	06		05	09	
		GG	03	00		00	00	
	<i>IL-10</i> (-1082)	AA	11	05	NS	01	09	NS
		GA	13	10		05	11	
		GG	02	01		00	01	
	<i>IL1B</i> (+3954)	TT	15	07	NS	05	09	<b>0,015</b>
CT		10	09	00		12		
CC		01	00	01		00		
<i>TNFA</i> (-308)	GG	13	08	NS	01	13	NS	
	GA	11	07		05	07		
	AA	02	01		00	01		
<i>IFNG</i> (+874)	TT	02	03	NS	01	01	NS	
	AT	16	07		02	12		
	AA	08	06		03	08		
<i>IL17A*</i> (197)	GG	09	03	<b>0,032</b>	09	07	NS	
	GA	11	02		01	00		
	AA	03	06		05	05		
<i>IL17F</i> (7488)	CC	07	03	NS	02	06	NS	
	CT	09	09		04	05		
	TT	10	04		01	05		
<b>D O A D O R</b>	<i>IL6</i> (-174)	CC	09	09	NS	01	12	NS
		GC	12	05		04	07	
		GG	05	02		01	02	
	<i>IL-10</i> (-1082)	AA	01	00	NS	01	00	NS
		GA	09	02		01	04	
		GG	16	14		07	17	
	<i>IL1B</i> (+3954)	TT	10	09	NS	02	13	NS
CT		10	03	04		04		
CC		06	04	04		17		
<i>TNFA</i> (-308)	GG	03	00	NS	04	03	NS	
	GA	05	04		01	10		
	AA	18	12		01	08		
<i>IFNG</i> (+874)	TT	11	02	NS	05	02	<b>0,035</b>	
	AT	08	08		09	02		
	AA	07	06		08	01		
<i>IL17A*</i> (197)	GG	07	04	NS	04	02	NS	
	GA	09	06		01	10		
	AA	07	01		05	05		
<i>IL17F</i> (7488)	CC	07	02	NS	03	01	NS	
	CT	12	07		10	05		
	TT	07	07		02	06		

Fonte: da autora [A: ausente, P: presente, NS: não significativo, \*Teste Qui-quadrado]. \*n=34

As distribuições dos alelos de *IL6*, *IL10*, *IL1B*, *TNFA*, *IFNG*, *IL17A* e *IL17F* encontram-se representadas na Tabela 6. Nenhuma associação significativa foi encontrada para os alelos analisados e a DECHc sistêmica e bucal.

Tabela 6 - Associação entre os alelos de *IL6*, *IL10*, *IL1B*, *TNFA*, *IFNG*, *IL17A* e *IL17F* dos pacientes e dos doadores e a ocorrência de DECHc sistêmica (n=42) e bucal (n=27)

	Gene	Alelos	DECHc sistêmica		p*	OR	DECHc bucal		p*	OR
			A	P			A	P		
<b>P</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>N</b> <b>T</b> <b>E</b>	<i>IL6</i> (-174)	C	35	26	NS		33	07	NS	
		G	17	04			11	03		
	<i>IL-10</i> (-1082)	A	35	20	NS		24	08	NS	
		G	17	12			12	02		
	<i>IL1B</i> (+3954)	T	40	23	NS		32	08	NS	
		C	12	09			12	02		
	<i>TNFA</i> (-308)	G	37	23	NS		32	08	NS	
A		15	09	12			02			
<i>IFNG</i> (+874)	T	20	13	NS		14	04	NS		
	A	32	19			30	06			
<i>IL17A</i> (197)	G	29	08	NS		19	14	NS		
	A	17	14			11	05			
<i>IL17F</i> (7488)	C	23	15	NS		08	17	NS		
	T	29	17			06	15			
<b>D</b> <b>O</b> <b>A</b> <b>D</b> <b>O</b> <b>R</b>	<i>IL6</i> (-174)	C	30	23	NS		33	05	NS	
		G	22	09			13	05		
	<i>IL-10</i> (-1082)	A	11	02	NS		07	04	NS	
		G	41	30			37	10		
	<i>IL1B</i> (+3954)	T	30	21	NS		32	06	NS	
		C	22	11			12	04		
	<i>TNFA</i> (-308)	G	11	04	NS		07	00	NS	
A		41	28	37			10			
<i>IFNG</i> (+874)	T	30	12	NS		19	06	NS		
	A	22	20			25	04			
<i>IL17A</i> (197)	G	25	12	NS		09	06	NS		
	A	25	20			25	04			
<i>IL17F</i> (7488)	C	26	11	NS		16	07	NS		
	T	26	21			16	17			

Fonte: da autora [A: ausente, P: presente, NS: não significativo, \*Teste Qui-quadrado, OR: Odds Ratio]

Por fim, procedeu-se à análise, relacionando os genótipos dos genes *IL6*, *IL10*, *IL1B*, *TNFA* e *IFNG* e os fenótipos associados a cada um deles, conforme descrito por Fishman, D. *et al.* 1998; Turner, D. M. *et al.*, 1997; Awad, M. *et al.*, 1999; Wilson, A. G. *et al.*, 1997 e

Pravica, V. *et al.*, 2000; apresentada na Tabela 7. Relação estatisticamente significativa foi investigada para o fenótipo alto produtor do gene *TNFA* dos doadores e a presença da DECHc bucal ( $p=0,040$ ). Para os demais fenótipos correspondentes aos genótipos analisados, nenhuma associação significativa foi encontrada.

Tabela 7 - Associação entre os genótipos e fenótipos de *IL6*, *IL10*, *TNFA* e *IFNG* dos pacientes e dos doadores e a ocorrência de DECHc sistêmica (n=42) e bucal (n=27)

	Gene	Genótipo	Fenótipo associado	DECHc sistêmica		p*	OR	DECHc bucal		p*	OR
				A	P			A	P		
P A C I E N T E	<i>IL6</i> (-174)	CC GG/ GC	Baixo Alto	12 14	10 06	NS		01 05	12 09	NS	
	<i>IL-10</i> (-1082)	AA/ GA GG	Baixo Alto	24 02	15 01	NS		06 00	20 01	NS	
	<i>IL1B</i> (+3954)	CC TT/CT	Baixo Alto	01 25	00 16	NS		05 01	21 00	NS	
	<i>TNFA</i> (-308)	GG GA/ AA	Baixo Alto	13 13	08 08	NS		01 05	13 08	NS	
	<i>IFNG</i> (+874)	AT/AA TT	Baixo Alto	24 02	13 03	NS		05 01	20 01	NS	
D O A D O R	<i>IL6</i> (-174)	CC GG/ GC	Baixo Alto	09 17	09 07	NS		01 04	12 09	NS	
	<i>IL10</i> (-1082)	AA/ GA GG	Baixo Alto	10 05	00 12	NS		01 05	00 21	NS	
	<i>IL1B</i> (+3954)	CC TT/CT	Baixo Alto	06 20	04 12	NS		04 06	07 10	NS	
	<i>TNFA</i> (-308)	GG GA/ AA	Baixo Alto	03 23	00 16	NS		04 02	03 18	<b>0,040</b>	<b>12,00 (1,48- 97,18</b>
	<i>IFNG</i> (+874)	AT/AA TT	Baixo Alto	15 11	13 03	NS		17 05	03 02	NS	

Fonte: da autora [A: ausente, P: presente, NS: não significativo, \*Teste Qui-quadrado, OR: Odds Ratio]

## 6.2 Avaliação imunofenotípica da expressão de marcadores de superfície celular e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos com e sem DECHc bucal

Esta seção apresenta os resultados da segunda parte do estudo.

### 6.2.1 Características clínicas e demográficas: pacientes e doadores

A avaliação imunofenotípica da expressão de marcadores de superfície celular e citocinas em CMSP foi realizada em pacientes com DECHc bucal (n=8), e sem DECHc bucal (n=4). Além desses, outros três indivíduos saudáveis, não transplantados de células-tronco hematopoiéticas, foram avaliados.

O grupo de pacientes com DECHc bucal incluiu duas mulheres e seis homens com medianas de idade de 37,2 anos (variação de 29 a 47). Dentre os doadores, um era mulher e sete eram homens. Dentre os pacientes que apresentaram DECHc bucal, três (37,5%) apresentavam leucemia mielocítica crônica (LMC); um (12,5%), leucemia mielocítica aguda (LMA); um (12,5%), mielodisplasia; dois (25%), anemia aplásica (AA) e um (12,5%), linfoma anaplásico (LA). O tempo médio pós-TCTH foi de 5 anos e 8 meses.

O grupo de pacientes TCTH que não desenvolveram DECHc bucal foi constituído por uma mulher e três homens com medianas de idade de 41,2 anos (variação de 36 a 56). Dentre os doadores, dois eram mulheres e dois eram homens. Um (25%) paciente apresentava leucemia mielocítica crônica (LMC); um (25%) possuía mielodisplasia; um (25%) era portador de anemia aplásica (AA) e um (25%) recebeu diagnóstico de hemoglobinúria paroxística noturna. O tempo médio pós-TCTH foi de 6 anos e 1 mês.

Finalmente, dentre os indivíduos saudáveis não transplantados avaliados, um era do sexo feminino e dois, do sexo masculino. A mediana de idade observada foi 26,33 anos, com variação de 26 a 27 anos.

As características dos três grupos estudados estão listadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Características dos alo-TCTH pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica

<b>Parâmetros</b>	<b>Pacientes com DECHc bucal (n=08)</b>	<b>Pacientes sem DECHc bucal (n=04)</b>	<b>Indivíduos saudáveis (n=03)</b>
<b>Mediana de idade dos pacientes</b>	37,2 (variação de 29-47)	41,2 (variação de 36-56)	26,33 (variação de 26-27)
<b>Sexo feminino dos pacientes</b>	02 (25%)	01 (25%)	01 (33,3%)
<b>Doença primária</b>			-
Leucemia mielocítica crônica	03 (37,5%)	01 (25%)	
Leucemia mielocítica aguda	01 (12,5%)	00 (0%)	
Mielodisplasia	01 (12,5%)	01 (25%)	
Anemia aplásica	02 (25%)	01 (25%)	
Hemoglobinúria paroxística noturna	00 (0%)	01 (25%)	
Linfoma anaplásico	01 (12,5%)	00 (0%)	
<b>Sexo feminino dos doadores</b>	01 (12,5%)	02 (50%)	-
<b>Fonte de células-tronco</b>			-
Medula óssea	03 (37,5%)	03 (75%)	
Células-tronco Periféricas	05 (62,5%)	01 (25%)	
<b>Tempo médio pós-TCTH</b>	5 anos e 8 meses	6 anos e 1 mês	-

Fonte: da autora.

### 6.2.2 Estudo descritivo do perfil de citocinas e marcadores de células T nos três grupos analisados

A Tabela 9 apresenta uma análise descritiva da expressão das citocinas IL-6, IL-10, IL-17 A, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e do marcador CTLA-4 na população de linfócitos que não receberam estímulo, nos três grupos de pacientes estudados: pacientes com DECHc bucal, pacientes sem DECHc bucal e indivíduos saudáveis.

Observa-se que os pacientes com DECHc bucal apresentam uma expressão maior de células T CTLA-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, em relação àqueles sem a doença e, também, em relação aos indivíduos saudáveis. IFN- $\gamma$  e IL-17A demonstraram níveis mais baixos de expressão em pacientes com DECHc bucal, quando comparados aos pacientes TCTH sem DECHc bucal, tanto em células T CD4/CD8 totais, quanto em células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. A citocina IL-10 mostrou maior expressão nas células CD4 totais e nas células CD4<sup>+</sup> nos pacientes com

DECHc bucal, comparados com aqueles sem DECHc. Foi constatado um aumento na expressão de TNF- $\alpha$  nos pacientes com DECHc bucal, em comparação com pacientes sem DECHc bucal e com indivíduos saudáveis, tanto em células T CD4 total, quanto em células CD4<sup>+</sup>. A citocina IL-6 revelou menor expressão nas células CD4 totais e uma expressão maior em células CD4<sup>+</sup> de pacientes com DECHc bucal (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise descritiva da expressão média e desvio padrão de marcadores em células T CD4 e células T CD8, em pacientes alo-TCTH, pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica

Marcadores	Grupos	Marcador em CD4 total	Marcador em CD8 total	%Marcador + CD4 <sup>+</sup>	%Marcador <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
CTLA-4	Com DECHc	12,75 ± 20,37	0,82 ± 1,42	1,84 ± 2,06	0,82 ± 1,48
	Sem DECHc	9,43 ± 11,92	1,49 ± 2,58	1,76 ± 1,88	0,58 ± 0,58
	IS	14,27 ± 9,95	0,08 ± 0,15	1,10 ± 0,74	0,46 ± 0,37
IFN- $\gamma$	Com DECHc	1,84 ± 1,19	3,10 ± 2,30	0,89 ± 0,51	2,57 ± 2,45
	Sem DECHc	3,26 ± 2,20	11,35 ± 9,83	3,75 ± 3,80	8,15 ± 5,46
	IS	3,41 ± 1,15	14,12 ± 19,60	1,91 ± 1,38	8,98 ± 10,06
IL-17A	Com DECHc	0,60 ± 0,38	0,46 ± 0,46	0,60 ± 0,38	Dado Ausente
	Sem DECHc	11,54 ± 14,98	1,30 ± 1,34	3,34 ± 4,43	Dado Ausente
	IS	8,42 ± 12,88	1,13 ± 1,04	8,42 ± 12,88	Dado Ausente
TNF- $\alpha$	Com DECHc	6,76 ± 11,16	-	14,25 ± 13,08	-
	Sem DECHc	2,01 ± 1,20	-	6,07 ± 2,84	-
	IS	5,07 ± 1,92	-	14,06 ± 1,45	-
IL-10	Com DECHc	0,33 ± 0,85	-	27,68 ± 32,92	-
	Sem DECHc	0,26 ± 0,26	-	26,43 ± 23,26	-
	IS	0,34 ± 0,34	-	22,84 ± 21,64	-
IL-6	Com DECHc	0,17 ± 0,06	-	9,30 ± 7,85	-
	Sem DECHc	0,08 ± 0,08	-	19,90 ± 11,14	-
	IS	0,07 ± 0,07	-	21,80 ± 18,22	-

Fonte: da autora [IS: Indivíduos saudáveis].

Comprovou-se maior frequência de Foxp3 em células T CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> de indivíduos com e sem DECHc em relação aos indivíduos saudáveis. Percebeu-se, também, uma expressão menor de Foxp3 em CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de pacientes com DECHc bucal em relação aos pacientes transplantados que não desenvolveram a doença (Tabela 10).

Tabela 10 - Frequência média e desvio padrão de Foxp3 em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, em alo-TCTH pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica

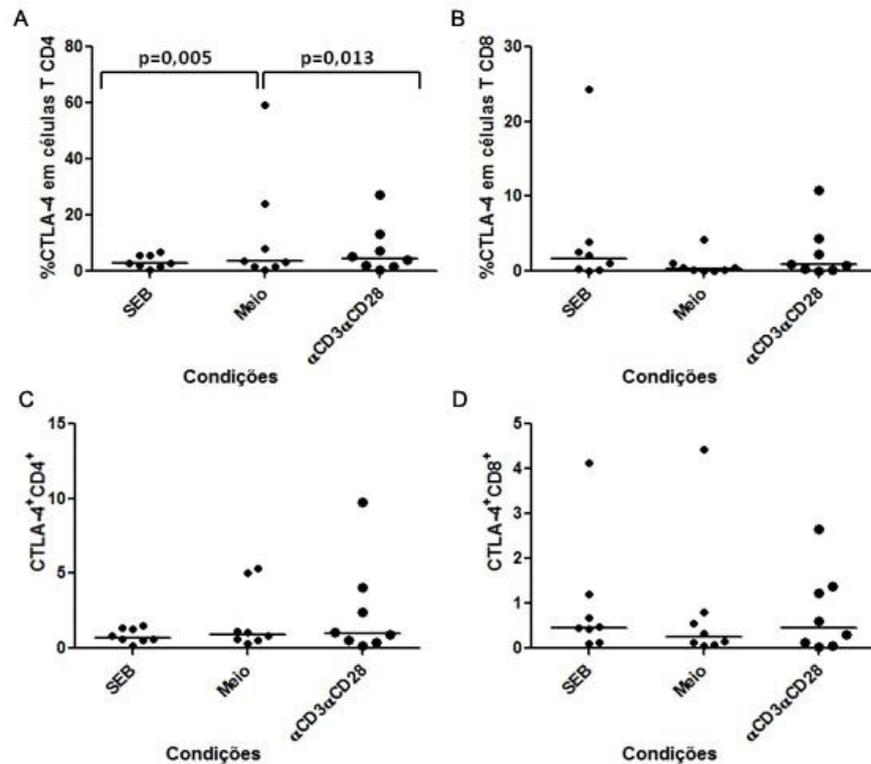
Marcador	Grupos	% Marcador <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>
Foxp3	Com DECHc	8,26 ± 14,73
	Sem DECHc	19,07 ± 21,56
	IS	3,94 ± 4,52

Fonte: da autora [IS: Indivíduos saudáveis].

### 6.2.2 Estudo de citocinas e marcadores de células T nos pacientes com DECHc bucal: meio e sob estímulos

CMSP de pacientes com DECHc bucal submetidas a diferentes estímulos foram avaliadas e comparadas com CMSP sem estimulação (meio). Verificou-se que a expressão do marcador CTLA-4 nas células CD4 totais, sob estímulo de SEB, diminuiu em relação ao meio (p=0,005), mas aumentou sob estímulo de antiCD3-antiCD28 para o mesmo marcador (p=0,013), o que está demonstrado na Figura 6A. Não foi evidenciada associação estatisticamente significativa entre a expressão de CTLA-4 em células CD8 totais e entre a expressão de CTLA-4<sup>+</sup> em células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Figuras 6B, C e D).

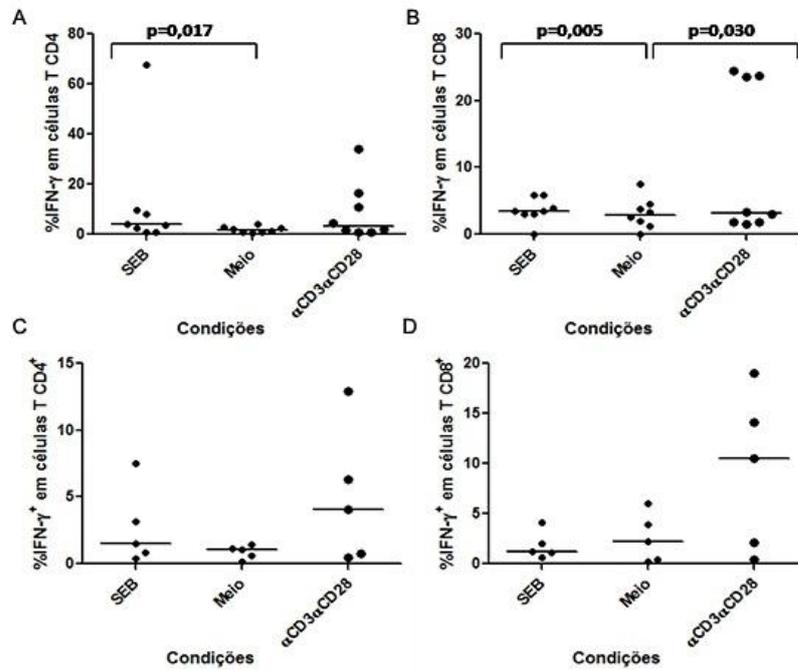
Figura 6 - Comparação entre as três condições (Meio, SEB, antiCD3-antiCD28) para o marcador CTLA-4 em células T CD4 (A; C) e CD8 (B; D), nos pacientes com DECHc bucal. Teste estatístico: Wilcoxon



Fonte: da autora.

Confirmou-se um aumento da expressão de IFN- $\gamma$  nas células CD4 sob estímulo de SEB em comparação com o meio (p=0,017), conforme Figura 7A. A análise da expressão da citocina na população de células TCD8, comprovou um aumento da expressão de IFN-g em ambos os estímulos (SEB e antiCD3-antiCD28) quando comparado ao meio (p=0,005 e p=0,005, respectivamente), de acordo com a Figura 7B. Não foi observada associação significativa para as populações de células T IFN- $\gamma^+$ CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Figuras 7C e D).

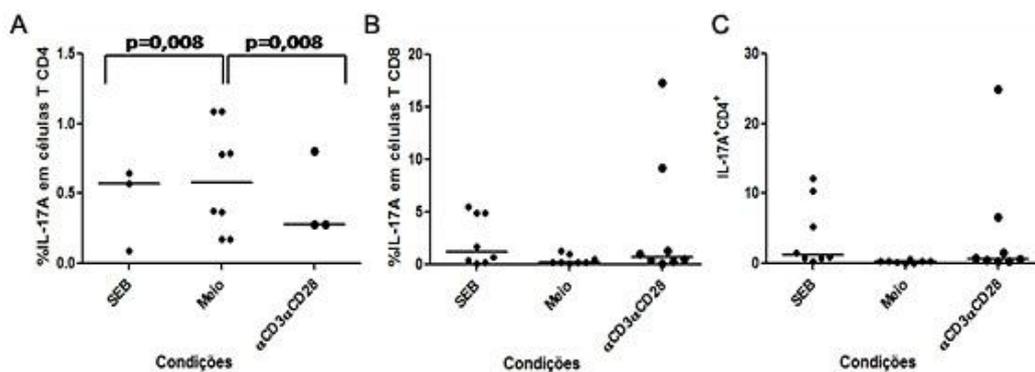
Figura 7 - Comparação entre as três condições (Meio, SEB, antiCD3-antiCD28), para as citocinas IFN- $\gamma$ , em células T CD4 (A; C) e CD8 (B; D), nos pacientes com DECHc bucal. Teste estatístico: Wilcoxon



Fonte: da autora.

Verificou-se, ainda, um aumento da expressão de IL-17A em células CD4, sob estímulo de SEB ( $p=0,008$ ), e diminuição da citocina sob estímulo de antiCD3-antiCD28 ( $p=0,008$ ), demonstrados na Figura 8A. Não foi verificada associação estatisticamente significativa entre expressão de IL-17A<sup>+</sup> em células T CD8<sup>+</sup> (Figura 8B) e, também, em células T CD4<sup>+</sup> (Figura 8C).

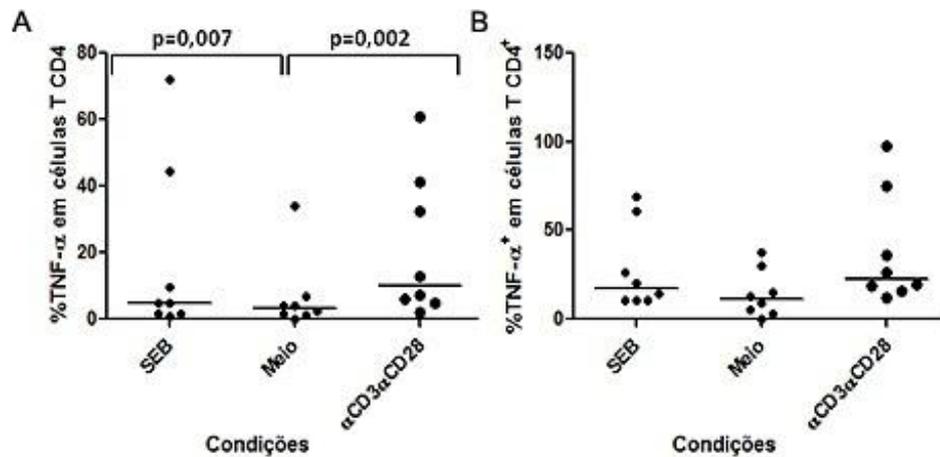
Figura 8 - Comparação entre as três condições (Meio, SEB, antiCD3-antiCD28), para a citocina IL-17A em células T CD4 (A; B) e em células CD8 (C), nos pacientes com DECHc bucal. Teste estatístico: Wilcoxon.



Fonte: da autora.

A Figura 9 ilustra o aumento da expressão de TNF- $\alpha$  após a estimulação, comparando-se ao meio ( $p=0,007$  e  $p=0,002$ ) para SEB e antiCD3-antiCD28, respectivamente (Figura 9A). Não houve relação estatisticamente significativa para a expressão de TNF- $\alpha^+$  em células T CD4 $^+$  (Figura 9B).

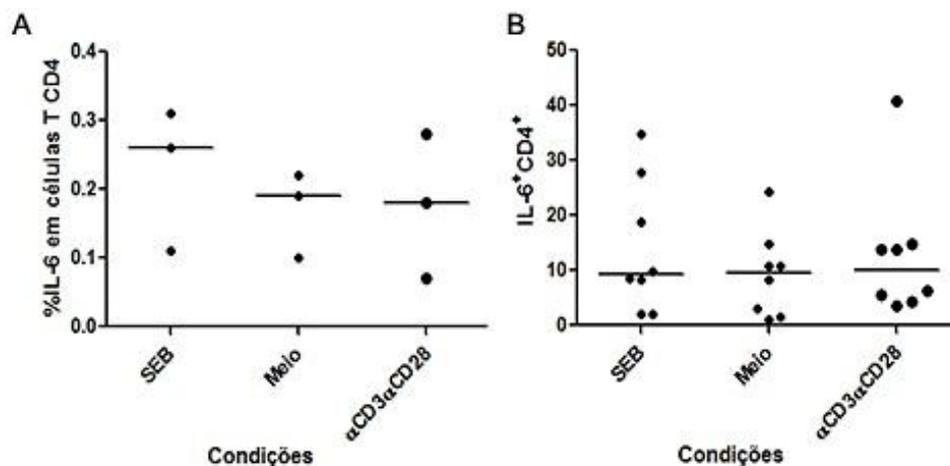
Figura 9 - Comparação entre as três condições (Meio, SEB, antiCD3-antiCD28), para citocina TNF- $\alpha$  em células T CD4, nos pacientes com DECHc bucal. Teste estatístico: Wilcoxon



Fonte: da autora.

Não se comprovou associação estatisticamente significativa para a expressão da citocina IL-6 em células T CD4 totais e em células T CD4 $^+$  (Figuras 10A e B).

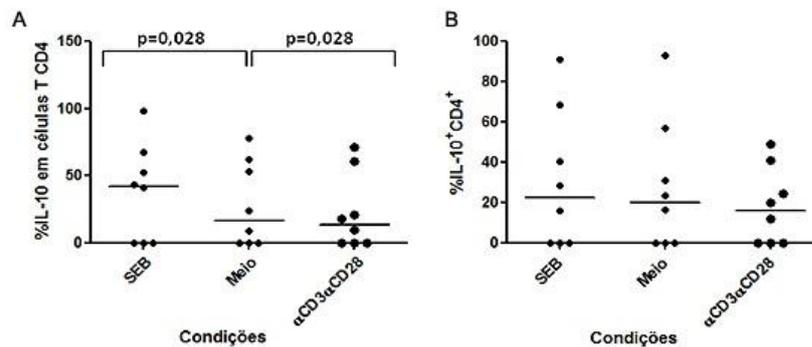
Figura 10 - Comparação entre as três condições (Meio, SEB, antiCD3-antiCD28), para a citocina IL-6 em células T CD4, nos pacientes com DECHc bucal. Teste estatístico: Wilcoxon



Fonte: da autora.

Constatou-se um aumento da expressão de IL-10 em células T CD4 totais, sob estímulo de SEB ( $p=0,028$ ) e diminuição de sua expressão sob estímulo de antiCD3-antiCD28 ( $p=0,028$ ), que pode ser visualizado na Figura 11A. Para IL-10<sup>+</sup> em células T CD4<sup>+</sup>, não houve relação estatisticamente significativa (Figura 11).

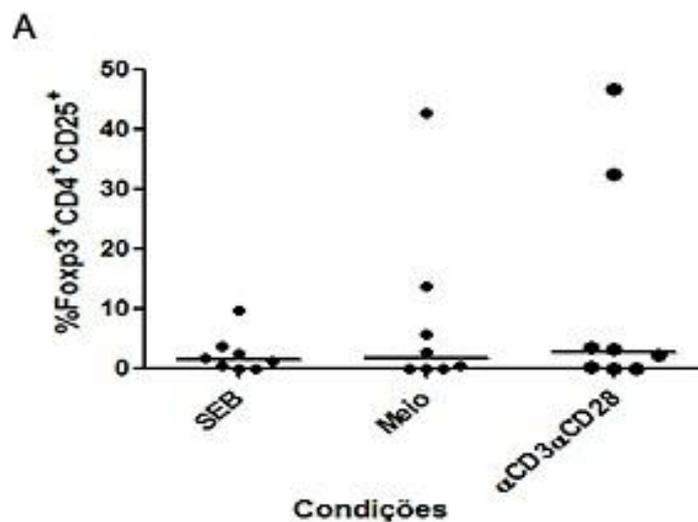
Figura 11 - Comparação entre as três condições (Meio, SEB, antiCD3-antiCD28), para a citocina IL-10, em células T CD4, nos pacientes com DECHc bucal. Teste estatístico Wilcoxon



Fonte: da autora.

Por fim, analisando-se a expressão de Foxp3 nas células CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, não se percebeu nenhuma associação entre a expressão desse marcador, sob os estímulos SEB e antiCD3-antiCD28, quando comparados ao meio, nos pacientes com DECHc bucal (Figura 12).

Figura 12 - Comparação entre as três condições (Meio, SEB, antiCD3-antiCD28), para Foxp3 em células T CD24<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nos pacientes com DECHc bucal. Teste estatístico: Wilcoxon



Fonte: da autora.

### **6.2.3 Estudo de citocinas e marcadores de células T nos pacientes com DECHc bucal, nos pacientes sem DECHc bucal e nos indivíduos saudáveis: meio e sob estímulos**

Os grupos estudados — pacientes com DECHc bucal, pacientes sem DECHc bucal e indivíduos saudáveis (IS) — foram examinados nas três condições: sem estímulo (meio), estimuladas com SEB, e com antiCD3-antiCD28. As análises compararam os três grupos ao mesmo tempo ou aos pares, para cada estímulo, separadamente. O teste estatístico Mann Whitney foi utilizado para análise de duas variáveis e o teste Kruskal Wallis foi empregado quando analisadas três variáveis.

Nenhuma associação estatisticamente significativa foi averiguada comparando-se os grupos de indivíduos na condição inicial de meio, para nenhum marcador ou citocina avaliados (Tabelas 12 e 13).

Uma análise descritiva da Tabela 11 mostra um aumento do marcador CTLA-4 nos pacientes doentes, comparados àqueles sem a DECHc bucal (em células T CD4/CD8 total e células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), o que também é percebido para as citocinas IL-10 (em células T CD4<sup>+</sup>) e TNF- $\alpha$  (em células T CD4 total e células T CD4<sup>+</sup>). Já IFN- $\gamma$  e IL-17A apresentaram uma diminuição da expressão nos pacientes com DECHc bucal, nas células T CD4 e CD8.

Na Tabela 12, nota-se que a frequência do marcador Foxp3 apresenta níveis mais altos em pacientes sem DECHc bucal, em relação àqueles pacientes doentes e aos indivíduos saudáveis.

Tabela 11 - Análise descritiva da expressão média e desvio padrão de citocinas e do marcador CTLA-4 em células T CD4 e células T CD8, em pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica para a condição sem estímulo (meio)

Marcadores	Grupos	Marcador em CD4 total	Marcador em CD8 total	%Marcador <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	%Marcador <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
<i>CTLA-4</i>	Com DECHc	12,75 ± 20,37	0,82 ± 1,42	1,84 ± 2,06	0,82 ± 1,48
	Sem DECHc	9,43 ± 11,92	1,49 ± 2,58	1,76 ± 1,88	0,58 ± 0,58
	IS	14,27 ± 9,95	0,08 ± 0,15	1,10 ± 0,74	0,46 ± 0,37
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
<i>IFN-γ</i>	Com DECHc	1,84 ± 1,19	3,10 ± 2,30	0,89 ± 0,51	2,57 ± 2,45
	Sem DECHc	3,26 ± 2,20	11,35 ± 9,83	3,75 ± 3,80	8,15 ± 5,46
	IS	3,41 ± 1,15	14,12 ± 19,60	1,91 ± 1,38	8,98 ± 10,06
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
<i>IL-17A</i>	Com DECHc	0,60 ± 0,38	0,46 ± 0,46	0,60 ± 0,38	Dado Ausente
	Sem DECHc	11,54 ± 14,98	1,30 ± 1,34	3,34 ± 4,43	Dado Ausente
	IS	8,42 ± 12,88	1,13 ± 1,04	8,42 ± 12,88	Dado Ausente
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	
<i>TNF-α</i>	Com DECHc	6,76 ± 11,16	-	14,25 ± 13,08	-
	Sem DECHc	2,01 ± 1,20	-	6,07 ± 2,84	-
	IS	5,07 ± 1,92	-	14,06 ± 1,45	-
	<b>p*</b>	NS		NS	
<i>IL-10</i>	Com DECHc	0,38 ± 0,85	-	27,68 ± 32,92	-
	Sem DECHc	0,26 ± 0,26	-	26,43 ± 23,26	-
	IS	0,34 ± 0,34	-	22,84 ± 21,64	-
	<b>p*</b>	NS		NS	
<i>IL-6</i>	Com DECHc	0,17 ± 0,06	-	9,30 ± 7,85	-
	Sem DECHc	0,08 ± 0,08	-	19,90 ± 11,14	-
	IS	0,07 ± 0,07	-	21,80 ± 18,22	-
	<b>p*</b>	NS		NS	

Fonte: da autora [IS: indivíduos saudáveis, \*Teste Mann Whitney (quando analisadas duas variáveis) e Teste Kruskal Wallis (quando analisadas três variáveis)].

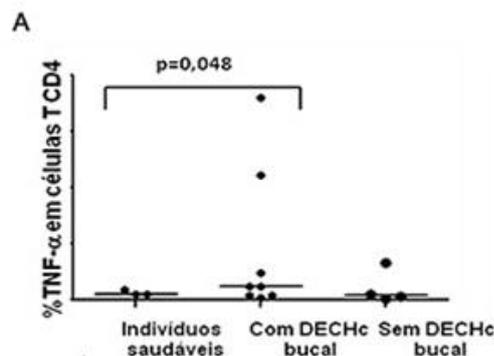
Tabela 12 - Frequência média e desvio padrão do marcador Foxp3, em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, em pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica para a condição sem estímulo (meio)

Marcador	Grupos	%Marcador <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>
Foxp3	Com DECHc	8,26 ± 14,73
	Sem DECHc	19,07 ± 21,56
	IS	3,94 ± 4,52
	p*	NS

Fonte: da autora. [IS: indivíduos saudáveis; \*Teste Kruskal Wallis (quando analisadas três variáveis)].

Ressalta-se que um exame dos linfócitos estimulados com SEB demonstra associação estatisticamente significativa entre os indivíduos saudáveis e os pacientes com DECHc bucal para a citocina TNF- $\alpha$  em células CD4 ( $p=0,048$ ), de acordo com a Figura 13A e Tabela 13. Para os demais marcadores analisados nenhuma relação estatisticamente significativa foi observada (Tabelas 13 e 14).

Figura 13 – Comparação entre os três grupos estudados (indivíduos saudáveis, pacientes com DECHc bucal e pacientes sem DECHc bucal) sob o estímulo de SEB, para a citocina TNF- $\alpha$  (a) em células T CD4 totais. Teste estatístico: Kruskal Wallis



Fonte: da autora.

Descritivamente, nota-se que há um aumento do marcador CTLA-4 nos pacientes doentes, comparados àqueles sem a DECHc bucal (em células T CD4/CD8 total e células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>). Padrões antagônicos são observados para IFN- $\gamma$  e IL-17A: enquanto IFN- $\gamma$  apresenta um aumento nos pacientes com DECHc bucal, comparados àqueles sem a DECHc bucal, IL-17A mostra uma diminuição de sua expressão, apresentando uma diminuição da expressão nas células T CD4 e CD8. A citocina IL-10 mostrou níveis de expressão altos para

os três grupos estudados em células TCD4<sup>+</sup>. TNF- $\alpha$  também mostrou níveis de expressão elevados e IL-6 teve expressão diminuída, em células T CD4 total e células T CD4<sup>+</sup> (Tabela 13). No que se refere a Foxp3, observa-se níveis mais baixos de expressão nos pacientes com DECHc bucal, comparados com pacientes sem DECHc bucal e IS, em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Tabela 13).

Tabela 13 - Expressão média e desvio padrão de citocinas e do marcador CTLA-4, em células T CD4 e células T CD8, em pacientes com DECHc bucal (n=8) sem DECHc bucal (n=4) e dos indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica para a condição com estímulo SEB

Marcadores	Grupos	Marcador em CD4 total	Marcador em CD8 total	%Marcador <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	%Marcador <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
<i>CTLA-4</i>	Com DECHc	3,48 ± 2,25	4,32 ± 8,18	0,86 ± 0,48	0,95 ± 1,32
	Sem DECHc	2,03 ± 0,99	8,24 ± 13,49	0,46 ± 0,18	3,08 ± 4,12
	IS	1,76 ± 1,73	0,29 ± 0,12	0,51 ± 0,62	0,16 ± 0,81
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
<i>IFN-γ</i>	Com DECHc	12,21 ± 22,63	3,57 ± 1,85	2,68 ± 0,98	1,80 ± 1,09
	Sem DECHc	3,02 ± 2,59	2,61 ± 2,58	0,27 ± 0,18	1,44 ± 1,12
	IS	2,01 ± 0,57	2,00 ± 1,46	0,50 ± 0,67	0,77 ± 1,09
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
<i>IL-17A</i>	Com DECHc	0,43 ± 0,30	2,30 ± 2,39	4,01 ± 4,78	Dado Ausente
	Sem DECHc	30,80 ± 22,63	13,51 ± 17,70	3,63 ± 2,59	Dado Ausente
	IS	0,37 ± 1,08	3,24 ± 3,15	2,24 ± 2,55	Dado Ausente
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	-
<i>TNF-α</i>	Com DECHc	17,54 ± 26,39	-	27,78 ± 23,83	-
	Sem DECHc	4,23 ± 6,00	-	12,51 ± 13,28	-
	IS	2,58 ± 0,58	-	7,98 ± 2,99	-
	<b>p*</b>	<b>0,048<sup>§</sup></b>	-	NS	-
<i>IL-10</i>	Com DECHc	0,62 ± 0,90	-	30,66 ± 34,24	-
	Sem DECHc	1,37 ± 1,08	-	36,80 ± 28,44	-
	IS	0,18 ± 0,60	-	27,26 ± 19,89	-
	<b>p*</b>	NS	-	NS	-
<i>IL-6</i>	Com DECHc	0,22 ± 0,10	-	13,99 ± 11,98	-
	Sem DECHc	2,80 ± 1,38	-	23,93 ± 10,18	-
	IS	9,81 ± 9,07	-	17,06 ± 12,34	-
	<b>p*</b>	NS	-	NS	-

Fonte: da autora [IS: indivíduos saudáveis; \*Teste Mann Whitney (quando analisadas duas variáveis) e Teste Kruskal Wallis (quando analisadas três variáveis) § Comparação entre os IS e os pacientes com DECHc bucal]

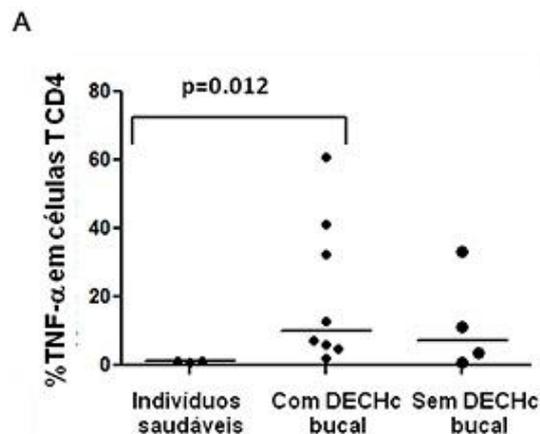
Tabela 14 - Frequência média e desvio padrão do marcador Foxp3, em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, em pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica para a para a condição com estímulo SEB

Marcador	Grupos	%Marcador <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>
Foxp3	Com DECHc	2,68 ± 1,56
	Sem DECHc	11,81 ± 12,45
	IS	11,62 ± 10,11
	p*	NS

Fonte: da autora. [IS: indivíduos saudáveis; \*Teste Mann Whitney (quando analisadas duas variáveis) e Teste Kruskal Wallis (quando analisadas três variáveis) § Comparação entre os IS e os pacientes com DECHc bucal]

Sob o estímulo com antiCD3-antiCD28, encontrou-se associação estatisticamente significativa para o aumento da expressão da citocina TNF- $\alpha$  (p=0,012) entre os indivíduos saudáveis e os pacientes com DECHc bucal (Figura 14A e Tabela 15). Para os demais marcadores analisados nenhuma relação estatisticamente significativa foi considerada (Tabelas 15 e 16).

Figura 14 - Comparação entre os três grupos estudados (Indivíduos saudáveis, Pacientes com DECHc bucal e Pacientes sem DECHc bucal) sob o estímulo de antiCD3-antiCD28, para a citocina TNF- $\alpha$  (a). Teste estatístico: Wilcoxon



Fonte: da autora

Um exame descritivo da Tabela 15 mostra que a expressão de IFN- $\gamma$  em células T CD4<sup>+</sup> e em células T CD8<sup>+</sup>; IL-17A em células T CD4 totais, CD8 totais e em células T CD4<sup>+</sup>; IL-10/IL-6 em células T CD4 totais e em células T CD4<sup>+</sup> encontra-se aumentada nos indivíduos com DECHc bucal, em comparação com aqueles sem a doença. Para CTLA-4, nota-se que a expressão é maior para pacientes sem DECHc bucal, em células T CD4<sup>+</sup> e em

células T CD8<sup>+</sup>. Por fim, conforme a Tabela 16, a expressão de Foxp3 apresenta-se menor para os pacientes com DECHc bucal, em relação aos pacientes sem DECHc bucal e IS.

Tabela 15 - Expressão média e desvio padrão de citocinas em células T CD4 e células T CD8, em alo-TCTH pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica para a condição com estímulo antiCD3-antiCD28.

Marcadores	Grupos	Marcador em CD4 total	Marcador em CD8 total	%Marcador <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	%Marcador <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
<i>CTLA-4</i>	Com DECHc	7,64 ± 8,89	2,49 ± 3,70	2,41 ± 3,24	0,79 ± 0,91
	Sem DECHc	8,67 ± 11,33	1,54 ± 2,54	1,14 ± 1,24	0,48 ± 0,56
	IS	6,99 ± 5,99	4,85 ± 7,41	2,48 ± 2,83	0,91 ± 1,29
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
<i>IFN-γ</i>	Com DECHc	8,92 ± 11,60	10,42 ± 11,23	4,89 ± 3,20	9,23 ± 7,32
	Sem DECHc	17,24 ± 17,58	20,50 ± 27,32	2,39 ± 1,90	6,03 ± 4,32
	IS	0,87 ± 0,83	1,47 ± 1,38	0,32 ± 1,34	1,01 ± 0,54
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
<i>IL-17A</i>	Com DECHc	1,98 ± 3,07	9,60 ± 7,25	7,25 ± 11,82	Dado Ausente
	Sem DECHc	0,45 ± 0,30	3,77 ± 6,24	4,42 ± 8,53	Dado Ausente
	IS	0,47 ± 1,02	0,78 ± 1,10	7,25 ± 11,82	Dado Ausente
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	-
<i>TNF-α</i>	Com DECHc	18,03 ± 19,25		29,75 ± 28,08	
	Sem DECHc	20,96 ± 21,49		37,60 ± 31,41	
	IS	1,00 ± 0,24		4,33 ± 1,38	
	<b>p*</b>	<b>0,012<sup>§</sup></b>		NS	
<i>IL-10</i>	Com DECHc	3,74 ± 6,24	-	23,25 ± 21,50	-
	Sem DECHc	0,62 ± 0,26	-	18,41 ± 19,07	-
	IS	0,27 ± 0,20	-	37,27 ± 34,38	-
	<b>p*</b>	NS		NS	
<i>IL-6</i>	Com DECHc	0,21 ± 0,11	-	10,49 ± 10,33	-
	Sem DECHc	0,17 ± 0,10	-	12,87 ± 12,15	-
	IS	0,05 ± 0,05	-	9,29 ± 11,41	-
	<b>p*</b>	NS		NS	

Fonte: da autora. [IS: indivíduos saudáveis, \*Teste Mann Whitney (quando analisadas duas variáveis) e Teste Kruskal Wallis (quando analisadas três variáveis) § Comparação entre os IS e os pacientes com DECHc bucal].

Tabela 16 - Frequência média e desvio padrão do marcador Foxp3, em células T CD4 e células T CD25, em pacientes com DECHc bucal (n=8), sem DECHc bucal (n=4) e indivíduos saudáveis (n=3) incluídos na análise imunofenotípica para a condição com antiCD3-antiCD28

Marcador	Grupos	%Marcador <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>
Foxp3	Com DECHc	11,07 ± 18,10
	Sem DECHc	21,26 ± 34,35
	IS	13,85 ± 22,09
	p*	NS

Fonte: da autora. [IS: indivíduos saudáveis, \*Teste Mann Whitney (quando analisadas duas variáveis) e Teste Kruskal Wallis (quando analisadas três variáveis) § Comparação entre os IS e os pacientes com DECHc bucal].

#### 6.2.4 Estudo de citocinas e marcadores de células T nos pacientes TCTH e Não TCTH: meio e sob estímulos

Uma análise, comparando-se os indivíduos que foram submetidos ao TCTH (com e sem DECHc bucal) com aqueles saudáveis, ou Não TCTH, foi realizada em diferentes condições (meio, estímulo com SEB e estímulo com antiCD3-antiCD28).

Nenhuma relação estatisticamente significativa foi percebida, comparando-se pacientes TCTH e Não TCTH na condição sem estímulo (meio) — demonstrado nas Tabelas 18 e 19) — e estimulado com SEB (Tabelas 19 e 20), para nenhuma citocina ou marcador.

A análise descritiva das Tabelas 17 e 18 mostra aumento da expressão de CTLA-4 e Foxp3 em TCTH, comparado com os indivíduos Não TCTH, em todas as populações de células T. Já para IFN- $\gamma$  e IL-17A, observa-se expressão mais baixa em pacientes TCTH em relação aos pacientes Não TCTH, em células T CD4<sup>+</sup> e em células T CD8<sup>+</sup>. As expressões de IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$  apresentam níveis semelhantes entre os dois grupos de indivíduos.

Tabela 17 - Comparação entre os indivíduos saudáveis (n=3) e os pacientes TCTH (n=12) sem estímulo (na condição meio) para as diferentes citocinas e para o marcador CTLA-4

Marcadores	Grupos	Marcador em CD4 total	Marcador em CD8 total	%Marcador <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	%Marcador <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
CTLA-4	TCTH	11,64 ± 17,43	1,04 ± 1,79	1,82 ± 1,91	0,74 ± 1,22
	Não TCTH	14,27 ± 9,95	0,08 ± 0,15	1,10 ± 0,74	0,46 ± 0,37
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
IFN- $\gamma$	TCTH	2,31 ± 1,64	5,85 ± 6,80	1,90 ± 1,09	4,66 ± 3,55
	Não TCTH	3,41 ± 1,15	14,12 ± 19,60	1,91 ± 1,38	8,98 ± 10,06
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
IL-17A	TCTH	4,25 ± 9,50	0,74 ± 0,89	1,29 ± 2,77	Dado Ausente
	Não TCTH	8,42 ± 12,88	1,13 ± 1,04	8,42 ± 12,88	Dado Ausente
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
TNF- $\alpha$	TCTH	5,18 ± 9,22	-	11,52 ± 11,28	-
	Não TCTH	5,07 ± 1,92	-	14,06 ± 1,45	-
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
IL-10	TCTH	0,31 ± 0,07	-	27,26 ± 28,94	-
	Não TCTH	0,34 ± 0,34	-	22,84 ± 21,64	-
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
IL-6	TCTH	0,14 ± 0,68	-	21,69 ± 24,91	-
	Não TCTH	0,07 ± 0,07	-	21,80 ± 18,22	-
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS

Fonte: da autora [\*Teste Mann Whitney].

Tabela 18 - Comparação entre os indivíduos saudáveis (n=3) e os pacientes TCTH (n=12) sem estímulo (na condição meio) para o marcador Foxp3

Marcador	Grupos	%Marcador <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>
Foxp3	TCTH	11,86 ± 20,93
	Não TCTH	3,94 ± 2,09
	<b>p*</b>	NS

Fonte: da autora [\*Teste Mann Whitney]

As Tabelas 19 e 20 mostram a expressão das citocinas e marcadores sob estímulo com SEB. Descritivamente, nota-se uma tendência a maiores níveis de expressão de CTLA-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A e IL-10 nas populações celulares analisadas, para indivíduos TCTH em relação a indivíduos Não TCTH. Para a citocina IL-6 e o marcador Foxp3, a expressão em pacientes TCTH foi menor, quando comparados com indivíduos Não TCTH.

Tabela 19 - Comparação entre os indivíduos saudáveis (n=3) e os pacientes TCTH (n=12) sob o estímulo SEB para as diferentes citocinas e para o marcador CTLA-4

Marcadores	Grupos	Marcador em CD4 total	Marcador em CD8 total	%Marcador <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	%Marcador <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
CTLA-4	TCTH	3,00 $\pm$ 2,00	5,62 $\pm$ 9,79	0,73 $\pm$ 0,44	1,66 $\pm$ 2,61
	Não TCTH	1,76 $\pm$ 1,73	0,29 $\pm$ 0,12	0,51 $\pm$ 0,62	0,16 $\pm$ 0,81
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
IFN- $\gamma$	TCTH	9,70 $\pm$ 19,45	3,31 $\pm$ 1,98	1,99 $\pm$ 2,08	1,69 $\pm$ 0,79
	Não TCTH	2,01 $\pm$ 0,57	2,00 $\pm$ 1,46	0,50 $\pm$ 0,67	0,77 $\pm$ 1,09
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
IL-17A	TCTH	0,32 $\pm$ 0,32	6,04 $\pm$ 10,94	3,69 $\pm$ 4,08	Dado Ausente
	Não TCTH	0,37 $\pm$ 1,08	3,24 $\pm$ 3,15	2,24 $\pm$ 2,55	Dado Ausente
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	-
TNF- $\alpha$	TCTH	13,11 $\pm$ 22,27	-	27,26 $\pm$ 24,90	-
	Não TCTH	2,58 $\pm$ 0,58	-	7,98 $\pm$ 2,99	-
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
IL-10	TCTH	0,46 $\pm$ 0,32	-	27,11 $\pm$ 32,18	-
	Não TCTH	0,18 $\pm$ 0,60	-	27,26 $\pm$ 19,89	-
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
IL-6	TCTH	0,87 $\pm$ 1,28	-	16,70 $\pm$ 11,95	-
	Não TCTH	9,81 $\pm$ 9,07	-	17,06 $\pm$ 12,34	-
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS

Fonte: da autora [\*Teste Mann Whitney].

Tabela 20 - Comparação entre os indivíduos saudáveis (n=3) e os pacientes TCTH (n=12) sob o estímulo SEB para o marcador Foxp3

Marcador	Grupos	%Marcador <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>
Foxp3	TCTH	4,57 ± 5,89
	Não TCTH	11,62 ± 10,11
	p*	NS

Fonte: da autora [\*Teste Mann Whitney].

Foi possível encontrar relação estatisticamente significativa para o estímulo com antiCD3-antiCD28 e os grupos estudados. A Tabela 21 ilustra o aumento da expressão de IFN- $\gamma$  em células CD4<sup>+</sup> (p=0,031) e em células CD8<sup>+</sup> (p=0,031) de pacientes TCTH, em relação aos pacientes saudáveis, Não TCTH. A citocina TNF- $\alpha$  apresentou expressão aumentada em pacientes TCTH em relação a pacientes Não TCTH (p=0,018).

Descritivamente, as Tabelas 21 e 22 mostraram uma diminuição dos marcadores CTLA-4, nas células CD4<sup>+</sup> e nas células CD8<sup>+</sup>, e Foxp3 nas células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, nos pacientes TCTH, comparados aos indivíduos Não TCTH. Aumento das expressões de IL-17A e IL-6 nos indivíduos TCTH foi observado para as populações celulares avaliadas. A expressão da citocina IL-10 mostrou aumento da expressão em células T CD4 totais e diminuição em células T CD4<sup>+</sup>.

Tabela 21 - Comparação entre os indivíduos saudáveis (n=3) e os pacientes TCTH (n=12) sob o estímulo de antiCD3-antiCD28 para as diferentes citocinas e para o marcador CTLA-4

Marcadores	Grupos	Marcador em CD4 total	Marcador em CD8 total	%Marcador <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	%Marcador <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
CTLA-4	TCTH	7,98 ± 9,25	2,17 ± 3,27	1,99 ± 2,73	0,69 ± 0,79
	Não TCTH	6,99 ± 5,99	4,85 ± 7,41	2,48 ± 2,83	0,91 ± 1,29
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	NS
IFN- $\gamma$	TCTH	11,70 ± 13,66	14,45 ± 17,86	3,95 ± 1,20	8,03 ± 6,32
	Não TCTH	0,87 ± 0,83	1,47 ± 1,38	0,32 ± 1,34	1,01 ± 0,54
	<b>p*</b>	<b>0,031</b>	<b>0,031</b>	NS	NS
IL-17A	TCTH	1,98 ± 3,07	9,60 ± 7,25	7,25 ± 11,82	Dado Ausente
	Não TCTH	0,47 ± 1,02	0,78 ± 1,10	4,23 ± 3,82	Dado Ausente
	<b>p*</b>	NS	NS	NS	-
TNF- $\alpha$	TCTH	18,03 ± 19,25	-	29,75 ± 28,08	-
	Não TCTH	1,00 ± 0,24	-	4,33 ± 1,38	-
	<b>p*</b>	<b>0,018</b>		NS	-
IL-10	TCTH	3,74 ± 6,24	-	23,25 ± 21,50	-
	Não TCTH	0,27 ± 0,20	-	37,27 ± 34,38	-
	<b>p*</b>	NS		NS	-
IL-6	TCTH	0,21 ± 0,11	-	10,49 ± 10,33	-
	Não TCTH	0,05 ± 0,05	-	9,29 ± 11,41	-
	<b>p*</b>	NS		NS	-

Fonte: da autora [\*Teste Mann Whitney].

Tabela 22 - Comparação entre os indivíduos saudáveis (n=3) e os pacientes TCTH (n=12) sob o estímulo de antiCD3-antiCD28 para as diferentes citocinas e para o marcador CTLA-4

Marcador	Grupos	%Marcador <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>
Foxp3	TCTH	7,17 ± 9,38
	Não TCTH	13,85 ± 22,09
	<b>p*</b>	NS

Fonte: da autora [\*Teste Mann Whitney].

## 7 DISCUSSÃO

O papel de diferentes citocinas e células do sistema imune na patogênese da DECHc, principalmente quando se analisa a DECHc bucal, ainda é controverso. Os escassos estudos elaborados até o momento avaliam um ou poucos fatores e não reportam resultados conclusivos (SKERT, C. *et al.*, 2009).

Nesse sentido, este trabalho propôs-se a investigar algumas importantes vertentes relacionadas à patogênese da DECH crônica, tanto bucal quanto sistêmica, em uma população de pacientes brasileiros. Especial ênfase foi dada à DECHc bucal, no sentido de gerar novas informações para o melhor entendimento dessa forma da doença e sua importância para o diagnóstico e prognóstico da DECHc sistêmica. Para isso, o projeto de pesquisa foi dividido em duas partes, de modo a atingir todos os objetivos propostos.

Os resultados da primeira parte do estudo revelaram que a maioria dos pacientes eram homens jovens (mediana de idade igual a 30,5), semelhante ao que é relatado na literatura brasileira (CASTRO JÚNIOR, C. G. *et al.*, 2003; GOUVEIA, R. V. *et al.*, 2007) e, também, ao que foi encontrado por trabalho recente, realizado por grupo de estudo, do qual a autora participa, para um grupo de indivíduos TCTH, do HC-UFMG (ABREU, M. H. G. *et al.*, 2012). TCTH é, portanto, usualmente considerado o tratamento de escolha para pacientes jovens (HOLOWIECKI, J., 2008).

A principal fonte de células-tronco empregada nos transplantes ainda é a medula óssea, conforme revelado por este trabalho e por outros conduzidos no Brasil (HAMERSCHLAK, N. *et al.*, 2006; SOUZA, A. S. *et al.*, 2007; ABREU, M. H. G. *et al.*, 2012).

A incidência da DECHc bucal nos pacientes avaliados neste estudo foi alta (81,4%), o que é comparável ao que é reportado na literatura. Diversos estudos clínicos relatam que as lesões bucais são comuns em pacientes com DECHc e estima-se que ocorre em 45-83% dos doentes (TREISTER, N. S. *et al.*, 2005; SCHUBERT, M. M. e CORREA, M. E., 2008; ABREU, M. H. G. *et al.*, 2012). Quanto à DECHc sistêmica, o resultado deste trabalho também está de acordo com achados conduzidos na mesma população (Abreu, M. H. G. *et al.*, 2012), em outras populações brasileiras (CASTRO JÚNIOR, C. G. *et al.*, 2003; SOUZA, A. S. *et al.*, 2007) e americanas (AKPEK *et al.*, 2006; BAIRD, K. e PAVLETIC, S. Z., 2006).

As dosagens das citocinas inflamatórias por ELISA revelaram que pacientes que desenvolveram DECHc bucal clínica apresentaram aumento de IFN- $\gamma$ , na saliva, tanto na primeira semana pós-TCTH (dia +7), quanto mais tardiamente (dias +91 e +100). De fato,

citocinas Th1, como a IFN- $\gamma$ , são fortemente expressas em lesões bucais de DECHc e tal expressão não tem, clinicamente, relação com o grau de infiltração de linfócitos na região ou gravidade das lesões (HAYASHIDA, J. N. *et al.*, 2013), na forma histológica da doença. Por outro lado, os níveis de IFN- $\gamma$  no sangue apresentaram redução após o TCTH (dias +84 e +100). Tal resultado contraditório pode ser explicado devido ao possível uso de imunossupressores para tratamento da DECH. Esses efeitos são inicialmente mais evidentes no sangue devido à biodisponibilidade da droga, o que poderia explicar o aumento da citocina na saliva, ainda que diminuísse no sangue, onde a liberação da droga é precocemente percebida em relação à saliva (DICKINSON, A. M. *et al.*, 2004). Hayashida, J. N. *et al.* (2013) observaram forte expressão das citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em pacientes com DECHc bucal, em relação aos controles sem a doença. Os autores ainda afirmam que o aumento de tais citocinas nos órgãos alvo e na cavidade bucal poderia provocar uma expressão aberrante de HLA-DR e moléculas de adesão, o que aumentaria a susceptibilidade à doença.

Aumento de IL-1 $\beta$  também foi encontrado quando se investigou sua relação com a DECHc bucal clínica, tanto em sangue quanto em saliva, nos dias +84 e +100. Ao passo que, verificou-se redução dos níveis de IL-1 $\beta$ , em saliva no dia +49, quando examinada a DECHc bucal histológica. O aumento de IL-1 $\beta$  dos pacientes com DECHc bucal já em fases mais avançadas do pós-TCTH reflete melhor o que acontece com a DECHc bucal, ao contrário do que foi observado para os níveis de IL-1 $\beta$ , em saliva, que estavam reduzidos nos primeiros dias após o TCTH, o que poderia distanciar do momento do diagnóstico da DECHc bucal. O grupo de pesquisa reportou previamente relação estatisticamente significativa entre o momento do diagnóstico da DECH aguda e o aumento dos níveis IL-1 $\beta$ , tanto em sangue quanto em saliva (RESENDE, R. G. *et al.*, 2013).

Vale destacar que este estudo não mostrou relação entre as dosagens das citocinas em sangue e/ou saliva e a DECHc sistêmica, ao contrário do que é relatado na literatura. Os primeiros trabalhos que se dedicaram a avaliar as dosagens das citocinas no sangue de pacientes com a DECHc sistêmica já sinalizavam que pacientes TCTH, que não desenvolviam DECH, não produziam altos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e que os níveis elevados de citocinas podem ser utilizados como uma ferramenta para avaliar novos tratamentos e respostas aos tratamentos da doença (BARRET, A. J., 1989; GARLISI, C. G. *et al.*, 1993).

Além disso, o impacto dos níveis de citocinas na saliva em relação à DECHc ainda é pouco explorado. Sabe-se que citocinas são um componente importante da saliva, e que regulam a homeostasia da cavidade bucal. Níveis alterados de citocinas salivares têm sido

observados em pacientes com diversas doenças, como o lúpus eritematoso e líquen plano, e podem refletir condições bucais e/ou sistêmicas (MACMILLAN, M. L. *et al.*, 2003; BORAS, V. V. *et al.*, 2006; RESENDE, R. G. *et al.*, 2010). Um único trabalho que investigou níveis de citocinas inflamatórias na saliva na DECHc bucal, de Fall-Dickson, J. M. *et al.* (2010), mostrou associações positivas entre IL-6 e as áreas de eritema e com a gravidade da DECHc, assim como a tendência de correlação positiva com ulceração bucal. Portanto, os níveis de citocinas na saliva podem representar uma ferramenta importante para o diagnóstico não invasivo da DECHc, o que também incentiva a exploração dessa citocina como um biomarcador potencial de DECHc bucal (FALL-DICKSON, J. M. *et al.*, 2010). Ainda sobre a citocina IL-6, este trabalho encontrou associação entre aumento de IL-6 em sangue, no dia +21, e a presença da DECHc bucal histológica.

Os resultados deste estudo reforçam os dados já relatados na literatura, quando afirmam que citocinas Th1 têm extrema relevância na DECHc e podem estar envolvidas com o início e a manutenção da doença. Hayashida, J. N. *et al.* (2013) reforçam, ainda, que as citocinas Th2, por sua vez, estão relacionadas à progressão da doença, mas o exato papel da produção de citocinas de cada uma dessas subpopulações celulares na patogênese da DECHc ainda necessita ser melhor elucidado.

As análises genótípicas, por sua vez, revelaram importante associação do SNP rs2275913 no gene das citocina IL-17A com a DECHc. A presença do genótipo polimórfico AA para os genes de *IL17A* dos pacientes com DECHc sistêmica, revelou associação com a presença da doença. Espinoza, J. L. *et al.* (2011a) mostraram uma associação entre a presença desse polimorfismo no gene da citocina IL-17A (197) e o maior risco para o desenvolvimento de DECHa graus III-IV, assim como um aumento significativo do risco para DECH crônica. Em outro estudo, ainda no ano de 2011, o mesmo grupo de pesquisadores mostrou que o polimorfismo 197A no gene *IL17A* dos doadores apresentou associação com o aumento da secreção de IL-17A, o que foi relacionado com o aumento do risco do desenvolvimento de DECHa e algumas doenças autoimunes, como artrite reumatoide, doença periodontal, psoríase, rinite alérgica e a rejeição de aloenxertos de órgãos (ESPINOZA, J. L. *et al.*, 2011b). Até o momento, não foi publicado nenhum estudo que tenha investigado a presença do polimorfismo rs763780 no gene da citocina IL-17F e sua associação com a DECH, e os resultados do presente trabalho não mostraram nenhuma associação com a doença. Outros grupos de pesquisa encontraram associação entre o polimorfismo de *IL17F* (7488) e a susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer gástrico (WU, X. *et al.*, 2010), com a redução

da densidade óssea mineral (OISHI, Y. *et al.*, 2012) e com o desenvolvimento da doença de Behçet (JANG, W. C. *et al.*, 2008).

No que se refere a DECHc bucal, a associação entre o polimorfismo de *IL1B* rs11433634 (+3954) e a presença da doença foi comprovada. Alguns estudos encontraram associações entre polimorfismos do gene *IL1B* e várias doenças crônicas bucais. Entre eles, estão os trabalhos que avaliaram o polimorfismo no locus +3954 de *IL1B* em uma população brasileira com doença periodontal (MOREIRA, P. R. *et al.*, 2005) e estomatite aftosa recorrente (GUIMARÃES, A. L. *et al.*, 2007). Nesses estudos, os autores relataram uma associação entre essas doenças crônicas e a presença do alelo polimórfico. Poucos trabalhos avaliaram polimorfismos do gene *IL1B* no que se refere à DECH. Outros autores não encontraram uma associação entre a ocorrência do polimorfismo e a DECH aguda em populações tanto americanas e britânicas (MACMILLAN, M. L. *et al.*, 2003; GAO, H. L. *et al.*, 2009). No entanto, MacMillan, M. L. *et al.* (2003) mostraram que a presença do alelo *T* de *IL1B* em doadores e receptores estava associada a uma melhor sobrevida. O grupo de pesquisa que teve a participação da autora não observou relação entre tal polimorfismo e a DECHa na população de pacientes de Minas Gérias (RESENDE, R. G. *et al.*, 2013). Verificou, ainda, um papel protetor do polimorfismo de doadores de *IFNG* rs2430561 (+874) na DECHc bucal. Um resultado semelhante foi observado por Mlynarczewska, A. *et al.*, em 2004, em que o genótipo microsatélite de *IFNG* (CA) foi relacionado a um papel protetor na DECHa. Já para DECHc, o mesmo grupo de pesquisadores não encontrou nenhuma relação significativa. Outro trabalho, por sua vez, relacionou o polimorfismo de *IFNG* (+874) a um aumento no risco de desenvolver a DECHc sistêmica (KARABON, 2004).

A associação dos fenótipos aos genótipos dos polimorfismos funcionais dos genes *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *TNFA* e *IFNG*, previamente descritos (AWAD, M. *et al.*, 1999; WILSON, A. G. *et al.*, 1997; TURNER, D. M. *et al.*, 1997; PRAVICA, V. *et al.*, 2000), demonstrou que o fenótipo alto produtor do gene *TNFA*, polimorfismo, foi relacionado à presença da DECHc bucal. Estudos sobre a regulamentação gênica sugerem que a existência de produções altas ou baixas por meio dos genes das citocinas explica o papel dessas citocinas (NORDLANDER, A. *et al.*, 2002). Dessa forma, algumas séries de investigações comprovam que esses polimorfismos podem ser responsáveis por variações fenotípicas que têm sido associadas a várias doenças e resultados diversos no pós-transplante (CAVET, J. *et al.*, 2001; RESENDE, R. G. *et al.*, 2010; RESENDE, R. G. *et al.*, 2012b; RESENDE, R. G. *et al.*, 2013).

Na segunda parte deste trabalho, três grupos de estudo foram selecionados. O primeiro deles, composto por pacientes TCTH com DECHc bucal, apresentava mediana de idade igual

a 37,2 anos e o sexo predominante foi o masculino, o que também é reportado na literatura brasileira, conforme previamente discutido para os pacientes da primeira parte do estudo, (CASTRO JÚNIOR, C. G. *et al.*, 2003; GOUVEIA, R. V. *et al.*, 2007; ABREU, M. H. G. *et al.*, 2012). A maior parte dos pacientes apresentava como doença as neoplasias malignas, o que também está de acordo com a literatura (CASTRO JÚNIOR, C. G. *et al.*, 2003). Em desarmonia com os dados demográficos relatados na literatura, a principal fonte de células-tronco utilizada no transplante desses pacientes foram as células-tronco hematopoiéticas obtidas do sangue periférico (HAMERSCHLAK, N. *et al.*, 2006; ABREU, M. H. G. *et al.*, 2012). Por outro lado, quando se analisa o fato de que esse grupo era composto por pacientes com DECHc bucal, e a maioria deles recebeu as células-tronco advindas do sangue periférico, conclui-se que esses dados estão em concordância com outros trabalhos, que registraram casos mais graves de DECHc sistêmica e uma maior incidência de acometimento de mucosa bucal em pacientes que receberam células-tronco periféricas (AZEVEDO, W. e RIBEIRO, M. C. C., 2000).

No segundo grupo, constituído por pacientes TCTH sem DECHc bucal, a maioria deles também era de homens, com mediana de idade igual a 41,2 anos, e a principal fonte de células-tronco utilizadas foi a medula óssea.

Segundo os trabalhos publicados até o momento, a análise de citocinas e subpopulações de linfócitos pode ser útil para identificar possíveis biomarcadores e auxiliar na prevenção da DECHc. Por isso, na segunda parte deste estudo, foi realizada uma caracterização descritiva do perfil de citocinas e dos marcadores CTLA-4 e Fopx3, por meio da técnica de citometria de fluxo.

Observou-se um aumento de TNF- $\alpha$  e IL-10 nas células T CD4 totais e em T CD4<sup>+</sup>, e de IL-6 nas células T CD4 totais nos pacientes com DECHc bucal, em relação aos não doentes e aos IS. Por outro lado, as células T CD4/CD8 totais e T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> apresentaram menor expressão de IFN- $\gamma$  e IL-17A no mesmo grupo de indivíduos. Chen, X. *et al.* relataram em um trabalho apresentado em 2010, que a DECH é provocada por células T CD4, derivadas de doadores com fenótipos de Th1 e Th17. Os autores atribuem o surgimento de tais células a perda de células Tregs (Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), o que leva as células Th1 e Th17 a se expandirem e liberar citocinas pró-inflamatórias. Também foi verificada a redução da expressão de Foxp3 nas células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dos pacientes com DECHc bucal, nessas células sem estímulo. Outros estudos têm mostrado uma diminuição das células Tregs na DECH, possivelmente, relacionada a citocinas presentes quando ocorre a DECHa (CHEN, X. *et al.*, 2010). Por exemplo, a citocina IL-6 tem se mostrado deletéria na geração de células

Tregs em modelos animais, bloqueando a expressão de Foxp3 (BETTELLI, E., *et al.*, 2008). Além disso, o marcador CTLA-4 mostrou aumento nas células, tanto CD4<sup>+</sup> quanto CD8<sup>+</sup>, referentes a pacientes com DECHc bucal. Os poucos trabalhos conduzidos até o momento para esse marcador mostram que o CTLA-4 está associado à diminuição da expansão de células T em modelos *in vivo* e à prevenção da DECH (CHO, H. e CHUNG, Y. H., 2012; YOO, J. S. *et al.*, 2012).

Em um trabalho que avaliou 30 pacientes pós-TCTH, Skert, C. *et al.* (2009) investigaram níveis de citocinas, por ELISA, e subpopulações de células T, utilizando o citômetro de fluxo, e a correlação com a DECHc. Os autores notaram que a citocina TNF- $\alpha$  representa uma importante variável relacionada à detecção da DECHc, uma vez que apresenta determinante relação na patogênese da DECHa. Ainda nesse estudo, os pesquisadores não observaram relação entre IFN- $\gamma$ , IL-10 e células T Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> na doença. Um papel duplo de IFN- $\gamma$  e IL-10, no entanto, tem sido descrito: regulatório e imunoestimulador de citocinas (O'SHEA, J. J., MA, A. e LIPSKY, P., 2002; GROUX, H. e COTTREZ F., 2003). Acredita-se que essa atuação dicotômica entre anti-inflamatória/imunosupressão e pró-inflamatória/imunoestimulatória represente um fenômeno simples, não relacionado à atividade pleiotrópica dessas citocinas (SKERT, C. *et al.*, 2009). Sendo assim, o perfil de marcadores do presente trabalho, apesar de ausência de correlação estatística para esse tipo de análise, revelou-se pró-inflamatório nos pacientes TCTH com DECHc bucal: tendência a aumento de citocinas favorável à resposta inflamatória e diminuição das células Tregs.

Um reforço da evidência do perfil pró-inflamatório também foi encontrado nos pacientes com DECHc bucal após os estímulos com SEB e antiCD3-antiCD28. As amostras dos pacientes com a DECHc bucal foram estimuladas com a enterotoxina estafilocócica B (SEB), um superantígeno bem caracterizado, produzido por *Staphylococcus aureus* (Neumann, B. *et al.*, 1997), patogênico em humanos e em animais (KOTZIN, B. L., 1993). A estimulação de células T por SEB resulta na liberação de várias citocinas, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 e IFN- $\gamma$  (NEUMANN, B. *et al.*, 1997). Nas amostras de pacientes com a DECHc bucal, analisadas neste trabalho, notou-se um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , em células CD4 totais, estimuladas com SEB; IFN- $\gamma$ , em células CD4 totais, estimuladas com SEB; CD8, estimuladas com SEB e antiCD3-antiCD28; e IL-10, em células CD4 totais, estimuladas com SEB e antiCD3-antiCD28, comparado com o meio (condição sem estímulo). No entanto, constatou-se que a expressão de CTLA-4 por células CD4 totais encontrava-se reduzida quando os linfócitos foram estimulados. O CTLA-4 é um

marcador de inibição de ativação de linfócitos (THOMPSON, C. B. e ALLISON, J. P., 1997), sendo assim, sua expressão reduzida favorece a ativação da resposta inflamatória e a liberação das citocinas, conforme mostrado acima.

Um estudo avaliou a expressão de CD69 por subpopulações de células T de criança com DECH, estimuladas com SEB e sem estímulo (KALWAK, K. *et al.*, 2003). A expressão desse marcador em subpopulações de células T foi comparada com a de células de crianças também submetidas ao transplante, mas sem a doença. Nesse estudo, verificou-se um aumento de células T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> nos pacientes com DECH. Os autores ponderaram que a quantificação da expressão CD69<sup>+</sup> em amostras não estimuladas e estimuladas com SEB pode ser um método valioso para monitorar crianças após TCTH alogênico. Além disso, a alta proporção de células ativadas no grupo com DECH salienta o papel fundamental de CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> na patogênese da DECH, e a terapia imunossupressora futura pode ser ajustada de acordo com a proporção de células T ativadas (KALWAK, K. *et al.*, 2003).

Takenaka, K. *et al.* (2001) testaram o efeito do tratamento com SEB *in vivo* em modelos animais de DECHa e observaram uma falha de resposta das células T do doador contra os aloantígenos. Entretanto, devido à escassez e dificuldade de realização desses experimentos em humanos, a real aplicação da terapia com SEB permanece desconhecida.

Sob o estímulo de antiCD3-antiCD28, também foi observado um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10, em comparação ao meio, nos pacientes com DECHc bucal. A ligação cruzada do receptor da célula T com anticorpo monoclonal anti-CD3 desencadeia uma cascata de transdução de sinal, que resulta na proliferação de células T, na síntese de citocinas, e nas respostas imunes (VAN WAUWE, J. P., DE MEY, J. R. e GOOSEENS, J. G., 1980). A ativação e proliferação ideal exige a co-estimulação de CD28 em células T com o anticorpo monoclonal anti-CD28 ou moléculas B7 (CD80 e CD86). Essas interações aumentam a proliferação e estabilização de mRNAs para a IL -2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (LUM, L. G. *et al.*, 2001).

Em um trabalho efetuado com modelo animal, que avaliou a DECHa em amostras de cordão umbilical humano purificadas e expandidas, Yang, J. *et al.* (2012) mostraram que a estimulação com antiCD3-antiCD28 expandiu as células Tregs e preveniu significativamente DECH aguda *in vivo*, por meio da modulação da secreção de várias citocinas. Além disso, observou-se a polarização das células Tregs/Th17 em direção às células Tregs, o que sugere o uso potencial da expansão de Tregs como uma estratégia terapêutica na DECH.

Encontrou-se ainda, nesse trabalho, uma diminuição da percentagem de IL-17A<sup>+</sup> em células T CD4<sup>+</sup>, após o estímulo com SEB e antiCD3-antiCD28, juntamente com uma

percentagem de aumento de células T  $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD4}^+$ , após estímulo com SEB em células de pacientes com DECHc bucal. Estudos anteriores demonstraram que a citocina IL-17A e a citocina  $\text{IFN-}\gamma$  podem modular uma a outra. A produção de IL-17A por células T induz as células epiteliais, endoteliais e do estroma a secretar citocinas pró-inflamatórias ( $\text{IFN-}\gamma$ , IL-6,  $\text{TNF-}\alpha$ , IL- $1\beta$ , e G-CSF) e essas citocinas demonstraram aumento em pacientes com DECHc (CHEN, X. *et al.*, 2010). Por outro lado, o desenvolvimento de células Th17, a partir de células T naive, é inibido por  $\text{IFN-}\gamma$  (HARRINGTON, L. E., HATTON, R. D. e MANGAN, P. R., 2005). Estudos prévios demonstraram que em indivíduos com cardiopatia chagásica os níveis de  $\text{IFN-}\gamma$  em células CD4 totais aumentam, enquanto os níveis de IL-17A reduzem (MAGALHÃES, L. M. *et al.*, 2013). Dessa forma, sugere-se que a redução da expressão de IL-17A em células CD4 totais estimuladas com SEB e antiCD3-antiCD28, verificada neste trabalho, pode ser causada pelo efeito inibidor de  $\text{IFN-}\gamma$ , fenômeno que pode ser relevante para a patogênese de DECHc.

Em um dos trabalhos precursores no estudo de células T na etiopatogenia da DECHc bucal, Hiroki, A. *et al.* (1994) relataram infiltração difusa de células T em glândulas salivares e em mucosa bucal de pacientes com DECHc, além de expressão aberrante de HLA-DR e moléculas de adesão nas células epiteliais e endoteliais, que, segundo os autores, teriam possível envolvimento na patogênese de DECHc. Novos trabalhos foram conduzidos e modelos animais mostraram o papel de células Th17 e Tregs, mas pouco se elucidou sobre o predomínio de células Th1 ou Th2 (TESHIMA, T., MAEDA, Y. e OZAKI, K., 2011; Hayashida, J. N. *et al.*, 2013).

Neste estudo, investigou-se, também, os diferentes estímulos nos três grupos, confirmando-se o aumento da citocina  $\text{TNF-}\alpha$  em ambos, SEB e antiCD3-antiCD28, nos pacientes com DECHc bucal, em relação aos pacientes sem DECHc bucal e aos indivíduos saudáveis. Um trabalho recente, realizado na Universidade de Kyushu, no Japão, sugeriu que a DECHc pode ser iniciada e/ou mantida por células Th1/Th0, como  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IFN-}\gamma$ , e a progressão está relacionada às células Th2, via interação com quimiocinas e receptores de quimiocinas (HAYASHIDA, J. N. *et al.*, 2013).

Por fim, quando se analisou o perfil inflamatório de pacientes transplantados (pacientes sem DECHc bucal e pacientes com DECHc bucal agrupados), notou-se, também, um padrão pró-inflamatório nesse grupo de pacientes, comparados aos indivíduos não transplantados, com o aumento de  $\text{IFN-}\gamma$  em células T CD4 e CD8 totais, e  $\text{TNF-}\alpha$  em células T CD4 totais, após o estímulo com antiCD3-antiCD28, nos pacientes TCTH, em relação

àqueles Não TCTH. Esses resultados estão em concordância com os dados da literatura, quando afirmam que, após o alo-TCTH, o sistema imune pode sofrer um desequilíbrio na direção de uma resposta Th1. Assim, em lesões DECHc de pele e no sangue periférico desses pacientes, são encontrados células CD8<sup>+</sup> e altos níveis de citocinas Th1 (RITCHIE, D. *et al.*, 2005).

O entendimento da biologia da DECHc, englobando características genóticas, fenotípicas e funcionais de linfócitos, é de grande importância para o entendimento da patologia da DECHc e para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico precoces eficientes, além de medidas terapêuticas efetivas para o controle da doença.

Este estudo evidenciou significativa correlação entre citocinas derivadas de células T e a DECHc. Além disso, mostrou também a importância desses marcadores na DECHc bucal, sinalizando a importância do estudo de biomarcadores na doença da cavidade bucal. Demonstrou, ainda, pioneirismo nos estudos da DECHc bucal isoladamente. Trata-se de mais uma ferramenta para futuros avanços no sentido da melhoria para os pacientes, prevenindo e tratando melhor a DECHc.

## 8 CONCLUSÕES

Este estudo comprovou os seguintes achados:

- Relação significativa entre a DECHc sistêmica e os polimorfismos de *IL17A* e entre a DECHc bucal e o polimorfismo de *IL1B*, *IFNG* e o fenótipo alto produtor de *TNFA*;
- Associação entre aumento de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ , em sangue e em saliva, na DECHc bucal clínica;
- Associação entre diminuição de IFN- $\gamma$ , em sangue, e IL-1 $\beta$ , na saliva, DECHc bucal histológica;
- Associação entre aumento de citocinas IL-6, em sangue, na presença DECHc bucal histológica;
- Ausência de correlação entre os níveis das citocinas, em sangue e em saliva, e a DECH sistêmica;
- Relação entre citocinas CD4-derivadas (IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, TNF- $\alpha$ ) e do marcador CTLA-4 e a DECH bucal, após estímulos;
- Perfil pró-inflamatório dos pacientes TCTH em relação aos Não TCTH, após estímulos.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. H. G. *et al.* Análise sociodemográfica e clínica de pacientes submetidos ao transplante alogênico de células-troncos hematopoiéticas. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**. 2012, p. 345-350.
- AKPEK, G. Titrating graft-versus-host disease: is it worth a try? **Bone Marrow Transplant**. 2006; 36:653-6.
- ASAVAROENGCHAI, W. *et al.* An essential role for IFN-gamma in regulation of alloreactive CD8 T cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2007; 13:46-55.
- AZEVEDO, W. e RIBEIRO, M. C. C. Fontes de células-tronco hematopoiéticas para transplantes. **Medicina**. Ribeirão Preto, 2000; 33:381-9.
- AZUMA, M., PHILLIPS, J. H. e LANIER, L. L. CD28 co-stimulation of T cell mediated cytotoxicity. **Int. J. Cancer**. 1992; 7, 33-39.
- AWAD, M. *et al.* CA repeat allele polymorphism in the first intron of the human interferon- $\gamma$  gene is associated with lung allograft fibrosis. **Hum Immunol**. 1999; 60:343.
- BAIRD, K. e PAVLETIC, S. Z. Chronic graft versus host disease. **Curr Opin Hematol**. 2006; 13:426-35.
- BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nat Rev Immunol**. 2007; 7:875-888.
- BETTELLI, E., *et al.* Induction and effector functions of Th17 cells. **Nature Reviews**. 2008; 453:1051-1057.
- BLAZAR, B. R., MURPHY, W. J. e ABEDI, M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. **Nat Rev Immunol**. 2012; 12:443-458.
- BORAS, V. V. *et al.* Salivary interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in patients with recurrent aphthous ulceration. **J Oral Pathol Med**. 2006; 35(4):241-243.
- BOTSTEIN, D. *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am J Hum Genet**. 1980; 32: 314-331.
- CASTRO JÚNIOR, C. G. *et al.* Análise clínica e epidemiológica do transplante de medula óssea em um serviço de oncologia pediátrica. **J Pediatria**. 2003; 79:413-22.
- CAVET, J. *et al.* Interferon  $\gamma$  and interleukin-6 gene polymorphisms associated with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. **Blood**. 2001; 98:1594-1600.
- CHEN, X. *et al.* Interleukin 17 is not required for autoimmune-mediated pathologic damage during chronic graft-versus-host disease. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2010; 16:123-128.

CHO, H. e CHUNG, Y. H. Construction, and in vitro and in vivo analyses of tetravalent immunoadhesins. **J Microbiol Biotechnol**. 2012 Aug; 22(8):1066-76.

DICKINSON, A. M. *et al.* Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. **Br J Haematol**. 2004;127:479-90.

DICKINSON, A. M., HARROLD, J. L. e CULLUP, H. Haematopoietic stem cell transplantation: can our genes predict clinical outcome? **Expert Rev Mol Med**. 2007; 2; 9:1-19.

DICKINSON, A. M. e HOLLER, E. Polymorphisms of cytokine and innate immunity genes and GVHD. **Best Pract Res Clin Haematol**. 2008; 21:149-64.

DICKINSON, A. M. SNPs and GVHD prediction: where to next? **Blood**. 2012; 31; 119:5066-8.

DUTRA, W. O. *et al.* Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5<sup>+</sup> B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. **Scandinavian Journal of Immunology**. 2000; 51:91-97.

ESPINOZA, J. L. *et al.* A single nucleotide polymorphism of IL-17 gene in the recipient is associated with acute GVHD after HLA-matched unrelated BMT. **Bone Marrow Transplant**. 2011a; 46:1455-63.

ESPINOZA, J. L. *et al.* A Genetic Variant in the IL-17 Promoter Is Functionally Associated with Acute Graft-Versus-Host Disease after Unrelated Bone Marrow Transplantation. **PLoS ONE**. 2011b; 6: e26229.

FAIR, J. M. *et al.* Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repeatability. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 2008; 125: 268-273.

FALL-DICKSON, J. M. *et al.* NIH Chronic GVHD Study Group. Oral Symptom Intensity, Health-Related Quality of Life, and Correlative Salivary Cytokines in Adult Survivors of Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Oral Chronic Graft-Versus-Host Disease. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2010; 16:948-56.

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

FISHMAN, D. *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest**. 1998; 102:1369-76.

FOWLER, D. H. *et al.* Donor CD4-enriched cells of Th2 cytokine phenotype regulate graft-versus-host disease without impairing allogeneic engraftment in sublethally irradiated mice. **Blood**. 1994; 84:3540.

FUJIOKA, T. *et al.* Frequency of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T-cells at early stages after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic SCT predicts the incidence of acute GVHD. **Bone Marrow Transplant.** 2013;48:859-64

GAO, H. L. *et al.* Clinical significance of TNF-alpha, IL-1beta and IFN-gamma levels at early phase after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.** 2009; 17:1321-1325.

GARLISI, C. G. *et al.* Cytokine gene expression in mice undergoing chronic graft-versus-host disease. **Mol Immunol.** 1993; 30:669-77.

GOMEZ, R. S. *et al.* Oral recurrent human herpes virus infection and bone marrow transplantation survival. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2001; 91:552-6.

GOUVEIA, R. V. *et al.* Recidiva de leucemias agudas em adolescentes e crianças após TMO. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea, 11, 2007, Gramado. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.29, suplemento 2. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2007. p. 25.

GROUX, H. e COTTREZ F. The complex role of interleukin-10 in autoimmunity. **J Autoimmun.** 2003; 20: 281–285.

GUIMARÃES, A. L. *et al.* Investigation of functional gene polymorphisms IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF-a in individuals with recurrent aphthous stomatitis. **Archives of oral biology.** 2007; 52: 268-272.

HAMERSCHLAK, N. *et al.* Estudo retrospectivo do tratamento de leucemia mieloide aguda com o transplante de medula óssea: a experiência brasileira. **Rev Bras Hematol Hemoter.** 2006; 28:11-8.

HARDING, F. *et al.* CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents the induction of anergy in T cell clones. **Nature.** 1992; 356: 607-609.

HARRINGTON, L. E., HATTON, R. D. e MANGAN, P. R. Interleukin 17-producing CD4<sub>+</sub> effector T cells develop via lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat Immunol.** 2005; 6: 1123.

HAYASHIDA, J. N. *et al.* Possible involvement of cytokines, chemokines and chemokine receptors in the initiation and progression of chronic GVHD. **Bone Marrow Transplant.** 2013;48:115-23.

HEMPEL, L. *et al.* High interleukine – 10 serum levels are associated with fatal outcome in patients after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation.** 1997; 20:365-68.

HIROKI, A. *et al.* Significance of oral examination in chronic graft-versus-host disease. **J Oral Pathol Med.** 1994; 23:209-15.

HOLLOWIECKI, J. Indications for hematopoietic stem cell transplantation. **Pol Arch Med Wewn.** 2008;118:658-63.

HORN, T. D. *et al.* The significance of oral mucosal and salivary gland pathology after allogeneic bone marrow transplantation. **Arch Dermatol**, v.131, n.8, 1995, p. 964-5.

IMAMURA, M., HASHINO, S. e KOBAYASHI, H. Serum cytokine levels in bone marrow transplantation: synergistic interaction of interleukin-6, interferon- $\gamma$ , and tumor necrosis factor- $\alpha$  in graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplantation**. 1994; 13:745-51.

IMANGULI, M., SWAIM, W. D. e LEAGUE, S. C. Increased Tbet+ cytotoxic effectors and type 1 interferon-mediated processes in cGVHD of the oral mucosa. **Blood**. 2009; 113:3620-3630.

JANG, W. C. *et al.* Interleukin-17F gene polymorphisms in Korean patients with Behçet's disease. **Rheumatol Int**. 2008; 29:173-8.

KALWAK, K. *et al.* Clinical value of the flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation: spontaneous activation of T-cell subpopulations is associated with acute GvHD. **Transplant Proc**. 2003; 35:1559-62.

KARABON, L. The role of cytokine gene polymorphisms in organ and haematopoietic stem cell transplantation. **Postepy Hig Med Dosw**. 2004; 58:270-84.

KARABON, L. *et al.* IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms of patients and donors of allogeneic sibling hematopoietic stem cell transplants associate with the risk of acute graft-versus-host disease. **Human Immunology**. 2005; 66: 700-710.

KAWAGUCHI, M. *et al.* IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity. **J Allergy Clin Immunol**. 2006; 117:795-801.

KLEIN, W. *et al.* The polymorphism at position -174 of the IL-6 gene is not associated with inflammatory bowel disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol**. 2001;13:45-7.

KOCH, W. *et al.* Interleukin-10 And Tumor Necrosis Factor Gene Polymorphisms And Risk Of Coronary Artery Disease And Myocardial Infarction. **Atherosclerosis**. 2001; 159:137-144.

KÖGLER, G. *et al.* Recipient cytokine genotypes for TNF- $\alpha$  and IL-10 and the minor histocompatibility antigens H-Y and CD31 codon 125 are not associated with occurrence or severity of acute GvHD in unrelated cord blood transplantation. **Transplantation**. 2002; 74:1167-1175.

KORNMAN, K. S. *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. **J Clin Periodontol**. 1997; 24:72-7.

KOTZIN, B. L. Autoimmune disease. Twins and T-cell responses. **Nature**. 1993; 364:187-8.

KRUMMEL, M. F. e ALLISON, J. P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. **J. Exp. Med**. 1995; 182, 459-465.

LIU, Y. J. *et al.* The role of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cell and FOXP3 in hshot acute graft rejection. **Zhonghua Nei Ke Za Zhi**. 2006; 45:835-8.

LINSLEY, P. S. e LEDBETTER, J. A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annu Rev Immunol**. 1993;11,191-212.

LUM, L. G. *et al.* Immune modulation in cancer patients after adoptive transfer of anti-CD3/anti-CD28-costimulated T cells-phase I clinical trial. **J Immunother**. 2001; 24:408-19.

MACMILLAN, M. L. *et al.* Interleukin-1 genotype and outcome of unrelated donor bone marrow transplantation. **Br J Haematol**. 2003; 121(4):597–604

MAGALHÃES, L. M. *et al.* High IL-17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. **J Infect Dis**. 2013; 207:661-5.

MAJORANA, A. *et al.* Oral complications of pediatric hematopoietic cell transplantation: diagnosis and management. **Support Care Cancer**. 2000; 8:353-65.

MILLER, M. C., MOHRENWEISER, H. W. e BELL, D. A. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. **Toxicology Letters**. 2001; 120:269-80.

MIN, C-K. *et al.* The kinetics of circulating cytokines including IL-6, TNF $\alpha$ , IL-8 and IL-10 following allogeneic Hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**. 2001; 28:935-940.

MLYNARCZEWSKA, A. *et al.* Lack of IFN-gamma 2/2 homozygous genotype independently of recipient age and intensity of conditioning regimen influences the risk of aGVHD manifestation after HLA-matched sibling haematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**. 2004; 34:339-44.

MOREIRA, P. R. *et al.* A functional interleukin-1b gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. **J Periodont Res**. 2005. 40; 306-311.

MOSMANN, T. R. *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol**. 1986; 136, 2348-2357.

MOSMANN, T. R. e SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**. 1996; 17:138-146.

MULLIGHAM, C. G. e BARDY, P. G. New directions in the genomics of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**. 2007; 13: 124-144.

MULLIGHAM, C. G. e PETERSDORF, E. W. Genomic polymorphism and allogeneic hematopoietic transplantation outcome. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**. 2006; 12: 19-27.

NEUMANN, B. *et al.* Induction of acute inflammatory lung injury by staphylococcal enterotoxin B. **J. Immunol**. 1997; 158: 1862–1871.

NORDLANDER, A. *et al.* The TNFd4 allele is correlated to moderate-to-severe acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. **Br J Haemat.** 2002; 119:1133–1136.

OISHI, Y. *et al.* The IL6 gene polymorphism -634C>G and IL17F gene polymorphism 7488T>C influence bone mineral density in young and elderly Japanese women. **Gene.** 2012; 504:75-83.

ONDREY, F. G., DONG, G. e SUNWOO, J. Constitutive activation of transcription factors NK- ( $\kappa$ ) B, AP-1, and NF-IL6 in human head and head neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. **Mol. Carcinog.** 1999; 26: 119-29.

O'SHEA, J. J., MA, A. e LIPSKY, P. Cytokines and autoimmunity. **Nat Rev Immunol.** 2002; 2: 37–45.

OTTO, P. G. **Genética humana e clínica.** São Paulo: Rocca, 1998, 333 p.

PALLANDRE, J. R. *et al.* Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory lymphocyte generation: implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity. **J Immunol.** 2007; 179:7593-604.

PARK, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology.** 2005; 6: 1133–1141.

PENACK, O., HOLLER E. e VAN DEN BRINK, M. R. M. Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. **Blood.** 2010; 115: 1865-72.

PRAVICA, V. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- $\gamma$  gene: Absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- $\gamma$  production. **Hum Immunol.** 2000; 61:863-66.

RAGHUPATHY, R. Pregnancy: successes and failure within Th1/Th2/Th3 paradigm. **Semin. Immunol.** 2001; 13:219-227.

RESENDE, R. G. *et al.* Association between IL1B (+ 3954) polymorphisms and IL-1b levels in blood and saliva, together with acute graft-versus-host disease. **Journal of interferon & cytokine research.** 2013; 33:392-97.

RESENDE, R. G. *et al.* Investigation of Functional IL-10 Gene Polymorphism and IL-10 Levels in Acute Graft-Versus-Host Disease. **J Clin Immunol.** 2010; 30(3): 465-73

RESENDE, R. G. *et al.* Oral cGVHD screening tests in the diagnosis of systemic chronic graft-versus-host disease. **Clin Oral Investig.** 2012a; 16:565-70.

RESENDE, R. G. *et al.* Saliva and blood interferon gamma levels and IFNG genotypes in acute graft-versus-host disease. **Oral Dis.** 2012b; 18(8):816-22.

RHODUS, N. L. *et al.* A comparison of the pro-inflammatory, NF- $\kappa$ B-dependent cytokines:TNF-alpha, IL-1-alpha, IL-6, and IL-8 in different oral fluids from oral lichen planus patients. **Clinical Immunology**. 2005; 114: 278–283.

RITCHIE, D. *et al.* Prospective monitoring of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma to predict the onset of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2005; 11:706-12.

ROCHA, V. *et al.* Host defense and inflammatory gene polymorphisms are associated with outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. **Blood**. 2002; 100:3908-18.

SAD, S., MARCOTTE, R. e MOSMANN T. R. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. **Immunity**. 1995; 2: 271-279.

SAKAGUCHI, S. e POWRIE, F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. **Science**. 2007; 317: 627-629.

SAKURAI, J. Immunosuppressive effect of CTLA-4 blockade and regulatory role of CD8 T cells in Th2-mediated humoral immune responses. **Kokubyo Gakkai Zasshi**. 2000; 67: 146-54.

SANCHO, D. *et al.* Functional analysis of ligand-binding and signal transduction domains of CD69 and CD23 C-type lectin leukocyte receptors. **J. Immunol**. 2000; 165, 3868-3875.

SANCHO, D., GÓMEZ, M. e SÁNCHEZ-MADRID, F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. **Trends in Immunology**. 2005; 26, 136-140.

SCHUBERT, M. M. *et al.* Clinical assessment scale for the rating of oral mucosal changes associated with bone marrow transplantation. **Cancer**. 1992; 69: 2469-77.

SCHUBERT, M. M. e CORREA, M. E. Oral graft-versus-host disease. **Dent Clin North Am**. 2008; 52: 79-109, viii-ix.

SHARMA, J. **Avian Cellular Immunology**. CRC Press, 1990.

SHULMAN, H. M. *et al.* Chronic graft-versus-host syndrome in man: a long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. **Am J Med**. 1980; 69: 204-217.

SKERT, C. *et al.* Kinetics of Th1/Th2 cytokines and lymphocyte subsets to predict chronic GVHD after allo-SCT: results of a prospective study. **Bone Marrow Transplant**. 2009; 44(11): 729-37.

SOIFFER, R. J. Immune modulation and chronic graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplantation**. 2008; 42: 566-69.

SOUZA, A. S. *et al.* Experiência Brasileira com o transplante de medula óssea em leucemias agudas. In: Simpósio ítalo-brasileiro em oncohematologia e transplante de medula óssea, 6.,

2007, São Paulo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.29, suplemento 1. Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2007, p. 28-32.

TAKENAKA, K. *et al.* Prevention of murine acute graft-versus-host disease by staphylococcal enterotoxin B treatment. **Clin Exp Immunol**. 2001.123:155-61.

TAYLOR, J. J., PRESHAW, P. M e DONALDSON, P. T. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. **Periodontology** 2000. 2004; 35:158-182.

TESHIMA, T., MAEDA, Y. e OZAKI, K. Regulatory T cells and IL-17-producing cells in graft-versus-host disease. **Immunotherapy**. 2011; 3:833-852.

THOMAS, E. D. *et al.* One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. **Blood**. 1977; 49:511-533.

THOMPSON, C. B. e ALLISON, J. P. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. **Immunity**. 1997; 7: 445-450.

TREISTER, N. S. *et al.* Oral chronic graft-versus-host disease in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2005; 11:721-731.

TURNER, D. M. *et al.* An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur J Immunogenet**. 1997; 24:1-8.

VAN WAUWE, J. P., DE MEY, J. R. e GOOSEENS, J. G. OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. **J Immunol**. 1980; 124:2708-13.

VISENTAINER, J. E. L. *et al.* Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. **Experimental Hematology**. 2003; 31: 1044-1050.

WILSON, A. G. *et al.* Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1997; 94:3195-9.

WU, X. *et al.* Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer. **Int J Cancer**. 2010. 1;127:86-92

YANG, J. *et al.* Amelioration of acute graft-versus-host disease by adoptive transfer of ex vivo expanded human cord blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> forkhead box protein 3<sup>+</sup> regulatory T cells is associated with the polarization of Treg/Th17 balance in a mouse model. **Transfusion**. 2012; 52:1333-47.

YI, T. *et al.* Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft versus host disease. **Blood**. 2009 1;114: 3101-12.

YOO, J. S. *et al.* Mice Exhibit Reduced T Cell Proliferation in vivo Compared to CD-28-KO Mice in a Graft-versus-host Disease Model. **Korean J Physiol Pharmacol**. 2012; 16(5):349-53.

YSSEL, H. *et al.* IL-10 is produced by subsets of human CD4<sup>+</sup> T cell clones and peripheral blood T cells. **J Immunol.** 1992; 149: 2378-2384.

ZEKARIAS, B. *et al.* Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. **Veterinary Research**, v.33, n.2, 2002, p. 109-125.

ZIEGLER, S. F. *et al.* Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. **Eur J Immunol.** 1993; 23:1643-1648.

## ANEXO 1 – PARECER Nº ETIC 0124.0.203.000-11 COEP-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0124.0.203.000-11

Interessado(a): Prof. Ricardo Santiago Gomes  
Departamento de Clínica, Patologia e  
Cirurgia Odontológica  
Faculdade de Odontologia - UFMG

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 04 de maio de 2011, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação molecular de citocinas na doença do enxerto contra o hospedeiro em pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas" e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
Prof. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG

## ANEXO 2 – PROCESSO Nº 037/11 DEPE/HC-UFMG



Universidade Federal de Minas Gerais  
Hospital das Clínicas  
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão - DEPE

UFMG

Belo Horizonte, 27 de maio de 2011.

**PROCESSO: Nº 037/11 "AVALIAÇÃO MOLECULAR DE CITOCINANA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS"**

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do HC e a aprovação pelo COEP/UFMG em 04/05/2011, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à DEPE *relatório* parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,



PROF.ª ANDRÉA MARIA SILVEIRA  
Diretora da DEPE/HC-UFMG

Ao Sr.  
Prof. Ricardo Santiago Gomez  
Depto. Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica  
Faculdade de Odontologia- UFMG

## **ANEXO 3 – TERMO DE ESCLARECIMENTO/TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTE)**

Universidade Federal de Minas Gerais – Faculdade de Odontologia

### **TERMO DE ESCLARECIMENTO**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTE)**

Este documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa **“AVALIAÇÃO MOLECULAR DE CITOCINAS NA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS”**.

Nos pacientes que fizeram o transplante de medula óssea, também conhecido como transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é muito frequente, podendo causar várias complicações no tratamento e até mesmo, em alguns casos, a morte após o transplante. A doença do enxerto contra o hospedeiro é uma reação imunológica das células do doador contra o organismo do paciente.

Esse projeto de pesquisa tem como objetivo estudar algumas substâncias relacionadas a essa reação imunológica, presentes no organismo, que podem levar ao aparecimento da DECH ou complicar essa doença em pacientes após o transplante. Para este estudo, será necessário coletar saliva com um tubo especial e também realizar uma coleta do seu sangue (20 ml), semanalmente, até o dia +100 e após um ano, para que sejam realizados exames de análise dessas substâncias. Esses exames servirão para identificar a presença dessas substâncias inflamatórias no sangue e na saliva. Nossa ideia é que existem variações nos níveis dessas substâncias na saliva e no sangue dos pacientes. Além disso, será importante também estudar se as células do doador também podem fazer uma quantidade maior ou menor dessas substâncias após o transplante. Essas variações podem servir para prever o aparecimento da DECH.

Este estudo não oferecerá riscos à sua saúde, uma vez que o sangue já é colhido de rotina para realização de outros exames durante o transplante, e a coleta da saliva também não causará qualquer risco à sua saúde, pois o material é descartável. As amostras coletadas apenas serão utilizadas para a finalidade do projeto e serão descartadas após o estudo. Por outro lado, essa pesquisa nos ajudará a entender a DECH, e no futuro permitir que o

aparecimento dessa doença seja descoberto antecipadamente, contribuindo para uma possível prevenção e tratamento individualizado. Portanto, melhorando a qualidade de vida do paciente, diminuindo os desconfortos que a DECH causa.

## **TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO**

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a realização das coletas de sangue e saliva para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
NOME DO RESPONSÁVEL

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ Nº: \_\_\_\_\_

Pesquisador: **Renata Gonçalves de Resende** – Telefone: (31) 3409-2477

Orientador: **Ricardo Santiago Gomez** – Telefone: (31) 3490-2477

## **ANEXO 4 – TERMO DE ESCLARECIMENTO/TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (DOADOR)**

Universidade Federal de Minas Gerais – Faculdade de Odontologia

### **TERMO DE ESCLARECIMENTO**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (DOADOR)**

Este documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa **“AVALIAÇÃO MOLECULAR DE CITOCINAS NA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS”**.

Nos pacientes que fizeram o transplante de medula óssea, também conhecido como transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH), a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é muito frequente, podendo causar várias complicações no tratamento e até mesmo, em alguns casos, a morte após o transplante. A doença do enxerto contra o hospedeiro é uma reação imunológica das células do doador contra o organismo do paciente.

Esse projeto de pesquisa tem como objetivo estudar algumas substâncias relacionadas a essa reação imunológica, presentes no organismo, que podem levar ao aparecimento da DECH ou complicar essa doença em pacientes após o transplante. Para este estudo, será preciso realizar uma coleta do seu sangue (3 ml), para que sejam realizados exames de análise. Esses exames servirão para identificar a presença dessas substâncias inflamatórias no seu sangue. Nossa idéia é de que variações nas formas dessas substâncias em paciente e doadores, assim como a presença delas no sangue dos pacientes possam servir para prever o aparecimento da DECH.

Este estudo não oferecerá riscos à sua saúde, uma vez que o sangue será colhido somente uma vez e o material é descartável. A amostra obtida será utilizada para a finalidade do projeto e será descartada após o estudo. Por outro lado, essa pesquisa nos ajudará a entender a DECH, e no futuro permitir que o aparecimento da doença seja descoberto antecipadamente, contribuindo para uma possível prevenção e tratamento individualizado. Portanto, melhorando a qualidade de vida do paciente, diminuindo os desconfortos que a DECH causa.

## TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a realização da coleta de sangue para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
NOME DO RESPONSÁVEL

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ Nº: \_\_\_\_\_

Pesquisador: **Renata Gonçalves de Resende** – Telefone: (31) 3409-2477

Orientador: **Ricardo Santiago Gomez** – Telefone: (31) 3490-2477

## **ANEXO 5 – ARTIGO SUBMETIDO**

**Title:** IL-17A evaluation in oral chronic graft versus host disease

Renata Gonçalves Resende<sup>1</sup>

Jeane de Fátima Correia-Silva<sup>1</sup>

Ulisses Eliezer Salomão<sup>2</sup>

Érica Leandro Marciano Vieira<sup>3</sup>

Walderez Ornelas Dutra<sup>4</sup>

Ricardo Santiago Gomez<sup>1</sup>

### **Corresponding Author:**

Ricardo Santiago Gomez<sup>1</sup>

Faculdade de Odontologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antonio Carlos, 6627.

Belo Horizonte- MG

Cep 31270-901

e-mail:

Phone: 55 31 34092477

---

<sup>1</sup>Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

<sup>2</sup>Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

<sup>4</sup>Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

## **Abstract**

*Purpose:* Although interleukin (IL)-17A expression has been associated with several autoimmune diseases, there is no data on the association between IL-17A and oral chronic graft-versus-host disease (cGVHD). The objective of this study was to investigate IL-17A levels in blood and saliva, and to evaluate IL-17 expression by lymphocytes and CD4+ T cells in patients with oral cGVHD. Because interferon (IFN)- $\gamma$  may also influence IL-17 production, its levels were also analyzed. *Methods:* To determine IL-17A serum and salivary levels by ELISA, 34 consecutive allogeneic hematopoietic stem cell transplant (allo-HSCT) recipients were studied. Saliva and blood levels were assessed at days +35 and +100 after allo-HSCT. For the evaluation of IL-17A and IFN- $\gamma$  expression by lymphocytes and CD4+ T cells, 8 patients with oral cGVHD were selected, as well as 4 HSCT recipients without cGVHD and 3 healthy individuals. *Results:* IL-17A levels in the group with oral cGVHD were not statistically different from the group without it. In flow cytometry analysis, no statistical difference in total IL-17A expression or in the frequency of CD4+IL17+ cells was found between patients with oral GVHD and those without. However, decreased expression of IL-17A was observed in patients with oral cGVHD after stimulation with superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB) and anti-CD3 plus anti-CD28, unlike that observed in the case of media treatment. In addition, higher expression of IFN- $\gamma$  was observed in patients with oral GVHD after SEB stimulation compared than after media treatment. *Conclusions:* Our study shows that stimulated lymphocytes of patients with oral cGVHD show decreased IL-17A expression and increased IFN- $\gamma$  expression.

**Keywords:** Hematopoietic stem cell transplantation; graft-versus-host disease; polymorphisms; IL-17A and IFN- $\gamma$  cytokine levels

## **Introduction**

Hematopoietic stem cell transplant (HSCT) is a definitive immunotherapy for malignancy and immunological diseases [1, 2]. However, graft-versus-host disease (GVHD) is an important complication of HSCT that limits its success and can be fatal in approximately 15% of HSCT patients [3]. Acute GVHD (aGVHD) and chronic GVHD (cGVHD) involve distinct pathological processes; the former has strong inflammatory components whereas the latter displays more autoimmune and fibrotic features [3]. Oral manifestations occur in about 70% of peripheral blood stem cell (PBSC) recipients and 53% of bone marrow stem cell (BMSC) recipient with cGVHD [4]. The most common findings are erythema, mucosal atrophy, lichenoid changes, mucositis, and xerostomia [5].

Recently, the roles of IL-17 and Th17 cells have been investigated in the pathogenesis of aGVHD and cGVHD [6]. Th17 cells are a functional lineage of CD4<sup>+</sup>T helper cells that produce cytokines such as Interleukin (IL)-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, tumor necrosis factor (TNF), granulocyte macrophage-colony stimulating (GM-CSF), and some chemokines [6]. Cytokines from the IL-17 family can be produced by most immune cells, as well as by epithelial cells, fibroblasts, and CD4<sup>+</sup> T cells [6]. IL-17A, the original member of this family, is known as a pro-inflammatory cytokine and acts predominantly as a chemoattractant to different cell types by the induction of certain cytokines, such as granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), and chemokines [7].

During the early stages of HSCT, alloreactive CD4<sup>+</sup>T cells secrete proinflammatory cytokines that play a role in the pathogenesis of GVHD, resulting in the activation of immune cells and tissue damage [2]. Recent data have shown that the Th17 pathway is associated with GVHD, particularly in cGVHD in skin and lung [6], but no study has investigated this population of Th cells with regard to oral cGVHD. The aim of the present study was to investigate salivary and serum levels of IL-17A together with the immunophenotypic profile in oral cGVHD. In

addition, because IL-17 and interferon (IFN)- $\gamma$  act in different ways in the immune response and may modulate each other [8], we also evaluated IFN- $\gamma$  expression in CD4<sup>+</sup> T cell in patients with oral cGVHD.

## **2. Methods**

### **2.1 Detection of IL-17A levels**

#### **Subjects and cGVHD diagnosis**

From an initial group of 47 allo-HSCT recipients, 34 allo-HSCT recipients from Hospital das Clínicas at Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) that survived until day +100 were deemed eligible and included in this prospective study (Table 1). Recipients were conditioned for allo-HSCT according to the specific protocols from the Stem Cell Transplant Unit at HC-UFMG, which varied according to the type of disease, disease status, and previous treatment at the time of transplantation. Cyclosporin, in combination with methotrexate or mycophenolatemofetil, was used for GVHD prophylaxis, whereas 2 mg/kg of methylprednisolone, in combination with cyclosporin, was used for GVHD treatment.

The presence of cGVHD was determined according to the NIH Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials. The oral cGVHD diagnosis was made according to a modified model of the Oral Rating Scale (OMRS) employed to determine oral clinical involvement in cGVHD [9].

#### **Saliva/blood collection**

To determine cytokine levels, saliva and blood samples were obtained on days +35 and +100 after allo-HSCT. The saliva sample was collected in Salivette tubes (Sarstedt AG & Co, Numbrecht, Germany) according to the manufacturer's instructions; this procedure has been described elsewhere [10]. Briefly, the saliva samples collected were diluted (1:1) in a phosphate-buffered saline (PBS) solution containing protease inhibitors and 0.05% Tween-20,

and subsequently stored at -20°C until analysis. The total protein content in the saliva was determined using the Bradford Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and the BSA standard (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lithuania). The total protein content was used to correct the IL-17A values for each sample. The serum samples were obtained from venous blood samples, centrifuged within 2 hours after blood collection, and stored at -20°C.

### **ELISA reaction**

The cytokine concentration was determined by means of a quantitative sandwich ELISA technique using a Human IL-17 DuoSet Kit (DY1335, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

## **2.2 Immunophenotyping**

### **Subjects and oral cGVHD diagnosis**

For immunophenotypic evaluation, additional patient selection was performed and 3 different groups were established: HSCT patients with oral cGVHD (n = 8), HSCT patients without oral cGVHD (n = 4), and healthy individuals (n = 3). All patients with oral cGVHD presented clinical lesions at the time of sample collection. Clinical data from this group are described in Table 2.

### **Blood collection and cell stimulation**

Nine milliliters (9 ml) of blood were collected from the ulna vein of each individual in a vacuum tube containing sodium heparin by a qualified healthcare professional, complying with the rules for the use of sharp instruments in an aseptic environment. Whole blood was subjected to 3 different conditions – media, stimulus with superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB) (120 ng/ml), and stimulus with anti-CD3 plus anti-CD28 ( $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28) monoclonal antibody (Abs) (10  $\mu$ g/ml) – for 20 hours. Brefeldin-A (at 1  $\mu$ g/ml) was added during the last 4 hours of culture. After culture, red blood cell lysis was performed using 1 $\times$

RBC lysis buffer (eBioscience, San Diego, CA, USA) for flow cytometry, as recommended by the manufacturer.

### **Cell surface and intracellular staining**

After lysis, leukocytes from whole blood were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD4 monoclonal antibody (eBioscience; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) for 20 minutes at 4°C. The cells were then fixed using 2% formaldehyde (Sigma-Aldrich). The fixed cells were permeabilized and stained, using phycoerythrin (PE)-labeled anti-cytokine monoclonal antibodies for IL-17A (eBioscience) or IFN- $\gamma$  (eBioscience). FITC- or PE-labeled isotype control antibodies and an unstimulated cell control were included in all experiments. Preparations were acquired on a FACSCanto II (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). A minimum of 50,000 gated events on the lymphocyte population were acquired for analysis due to the low frequency of positive events being analyzed. The acquisition was processed using the Diva® software (Becton & Dickinson).

### **Flow cytometry data analysis**

CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were analyzed for their intracellular expression of IL-17A or IFN- $\gamma$  using the FlowJo program (Tree Star, Ashland, OR, USA). Analyses were performed using a lymphocyte gate (Figure 1a). We determined the total expression of IL-17 in the lymphocyte gate (Figure 1b, R4); we also determined the frequency of Th1 and Th17 cells by analyzing the frequency of CD4+IFN- $\gamma$ + and CD4+IL-17+ cells, respectively (Figure 1b, R3). The expression of IL-17 within the CD4+ T cells was assessed by further gating on the total CD4+ population (Figure 1b, R2) and requesting a histogram analysis of such gating (Figure 1c). The same strategy was used for IFN- $\gamma$ . Limits for the quadrant markers were always set based on negative populations and isotype controls.

### **2.3 Statistics**

The Shapiro-Wilk Test was used to determine if samples followed normal distribution. Two independent groups were compared by the Student's t test and by the Wilcoxon test. Univariate analyses were performed using the Chi-Square, Mann-Whitney, and Friedman tests, and the Student's t test. The SPSS software was used for the analyses (SPSS Inc., version 19.0, Chicago, IL). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

### **3. Results**

#### **3.1 Detection of IL-17A levels**

##### *Clinical outcomes*

The median age of the recipients was 29.5 years (range: 5–56) and the median donor age was 31.5 years (range: 6–69). Clinical data from patients and donors are described in Table 1. Sixteen of the 34 patients developed oral cGVHD (47.0%); all of these patients presented systemic cGVHD. In addition, 5 of the subjects presented only systemic cGVHD without oral involvement (14.7%).

##### *IL-17A levels in saliva and blood and the incidence of cGVHD*

Table 3 summarizes the mean IL-17A levels in saliva and blood at the 2 time points evaluated (days +35 and +100) following allo-HSCT. Although we observed a trend towards lower IL17 expression in the blood and saliva of patients with oral and systemic cGVHD compared to levels seen in individuals without the disease, it was not statistically different.

#### **3.2 Flow cytometric analysis of IL-17 expression and Th17 frequencies**

##### *Clinical outcomes*

Seven out of 8 patients of the group with oral cGVHD presented systemic cGVHD (87.5%). None of the patients from the group without oral cGVHD presented the systemic form of the disease.

### ***Expression of IL-17A in CD4<sup>+</sup> T cells and oral cGVHD***

Although it was not statistically different, the expression of total IL-17A, IL-17A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> in total T cells, as well as percentage of IL-17A in CD4<sup>+</sup> T cells tended to be lower in unstimulated cells from patients with oral cGVHD than in patients without oral cGVHD (Figure 2a, 2b, 2c).

### ***Expression of IL-17A in CD4<sup>+</sup> T cells and oral cGVHD after stimulus***

Decreased IL-17A expression was observed in CD4 T cells of patients with oral cGVHD after stimulation with SEB ( $p = 0.008$ ) and  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 ( $p = 0.008$ ) stimulus, compared to media-stimulated control cells (Figure 3a). In patients without oral cGVHD or in healthy individuals, the expression of IL-17A in CD4 T cells after stimulation with SEB or  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD2 was not statistically different than that seen in media-stimulated control cells (data not shown). Overlapping histograms for IL-17A fluorescence are shown in Figure 3c.

### ***Expression of IFN- $\gamma$ in CD4<sup>+</sup> T cells and oral cGVHD after stimulus***

Higher expression of IFN- $\gamma$  in CD4 T cells was seen in patients with oral cGVHD after SEB ( $p = 0.01$ ) stimulation compared to media stimulation (Figure 3b). In patients without oral cGVHD or in healthy individuals, the expression of IFN- $\gamma$  in CD4<sup>+</sup> T cells after stimulation with SEB or  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD2 was not statistically different from that seen after stimulation with media. Overlapping histograms for IFN- $\gamma$  fluorescence are shown in Figure 3d.

## **Discussion**

In this study, we investigated the relationship between IL-17A levels in saliva and blood and the occurrence of oral cGVHD. Although we did not find statistical significance, a trend towards lower levels of the cytokine was observed in patients that developed oral cGVHD and systemic cGVHD. There is no consensus in the literature regarding IL17A levels in the context of different organs affected by cGVHD. Wang et al [11] and Dander et al [12]

reported that plasma levels of IL-17 were significantly increased in patients with systemic cGVHD compared to patients without clinical signs of GVHD. On the other hand, IL-17 was not detected in the serum of patients with ocular GVHD [13]. Although the role of IL17 remains to be established, Th17 cells can down-regulate Th1 differentiation, reducing aGVHD in allogeneic recipients [14].

The expression of IL-17A and IFN- $\gamma$  in CD4<sup>+</sup> T cells before and after stimulation was also investigated. We found a decreased percentage of IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells after stimulus with SEB and  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 together with an increased percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells following SEB stimulus. Previous studies have demonstrated that IL-17A and IFN- $\gamma$  may modulate each other [8]. T-cell production of IL-17 induces epithelial, endothelial, and stromal cells to secrete proinflammatory cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and G-CSF), and the levels of these cytokines have shown to be higher in patients with cGVHD [15]. On the other hand, the development of Th17 cells from naive precursor cells is potently inhibited by IFN- $\gamma$  [8]. Previous studies by us have shown that, while IFN-gamma levels increase in individuals with cardiac disease as a result of *Trypanosoma cruzi* infection (Souza et al., 2007, Infection and Immunity), IL-17 levels decrease (Magalhães et al, 2012, JID). Therefore, decreased expression of IL-17A in the stimulated cells observed in this work may be caused by the inhibitory effect of IFN- $\gamma$ , and this phenomenon may be relevant to the pathogenesis of cGVHD.

## **Conclusions**

Our study shows that stimulated lymphocytes of patients with oral cGVHD present decreased expression of IL-17A and increased expression of IFN- $\gamma$ .

## **Acknowledgements**

This study was supported in part by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. RS Gomez, TA Silva and WO Dutra are CNPq research fellows.

## References

1. Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Blazar BR, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. *Blood*. 2005; 105:2227–2234.
2. van den Brink MR, Burakoff SJ. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:273–281.
3. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12:443-458.
4. Pavletic SZ, Smith LM, Bishop MR, Lynch JC, Tarantolo SR, Vose JM, Bierman PJ, Hadi A, Armitage JO, Kessinger A. Prognostic factors of chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem-cell transplantation. *Am J Hematol*. 2005; 78:265-274.
5. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, and Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft - versus - host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005; 11: 945–956.
6. Serody JS, Hill GR. The IL-17 differentiation pathway and its role in transplant outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012; 18:56-66
7. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004; 21:467-476.

8. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005; 6:1123-1132.
9. Busca A, Locatelli F, Vai S, Dall'Omo AM, Gargiulo A, Falda M. Clinical grading of oral chronic graft-versus-host disease in 104 consecutive adult patients. *Haematologica.* 2005; 90: 567-569.
10. Resende R, Correia-Silva J, Silva T, Xavier S, Bittencourt H, Gomez R, Abreu M. Saliva and blood interferon gamma levels and IFNG genotypes in acute graft-versus-host disease. *Oral Dis.* 2012; 18:816-822
11. Wang J, Wang XB, Wang J, Liu HL, Geng LQ, Ding KY, Sun ZM. Detection of Th17/treg cell-associated cytokines in peripheral blood of patients with graft-versus-host disease and its clinical significance. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2011; 19:422-426
12. Dander E, Balduzzi A, Zappa G, et al. Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation.* 2009; 88:1261-1272.
13. Riemens A, Stoyanova E, Rothova A, Kuiper J. Cytokines in tear fluid of patients with ocular graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Mol Vis.* 2012; 18:797-802
14. Yi T, Zhao D, Lin CL, et al. Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2008; 112:2101-2110.
15. Chen X, Das R, Komorowski R, van Snick J, Uyttenhove C, Drobyski WR. Interleukin 17 is not required for autoimmune-mediated pathologic damage during chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16:123-128.

## Tables

**Table 1: Characteristics of recipients and donors (n=34)**

<b>Variable</b>	
<b>Gender</b>	
Female	16 (47.4%)
Male	18(52.6%)
<b>Primary Disease</b>	
- Malignant	22 (64.7%)
- Non-malignant	12 (35.3%)
<b>HLA match</b>	
- HLA matched related	30 (88.2%)
- HLA matched unrelated	2 (5.9%)
- HLA mismatched related	2 (5.9%)
<b>Gender</b>	
Female	16 (47.4%)
Male	18 (52.6%)
<b>Source of stem</b>	
- BMSC	23 (47.0%)
- PBSC	11 (53.0%)
<b>GVHD</b>	
Systemic cGVHD	11 (32.4%)
Oral cGVHD	16 (47.0%)

BMSC= bone marrow stem cells    PBSC=peripheral blood stem cells

Table 2: Characteristics of recipients with oral cGVHD (n=4), recipients without oral cGVHD (n=8) and healthy individuals (n=3) included in the immunophenotypic analysis.

<b>Groups</b>	<b>n</b>	<b>Age media n</b>	<b>Individuals gender</b>	<b>Donor Gender</b>	<b>Source of cells</b>	<b>Media time post- HSCT</b>
<b>With oral cGVHD</b>	8	37.2	Female=2(2) Male=6(75)	Female=1(1) Male=7(87)	BMSC=2( PBSC=6(7	5 years and 8
<b>Without oral</b>	4	41.5	Female=3(7) Male=1(25)	Female=2(5) Male=2(50)	BMSC=4( PBSC=0	6 years and 1
<b>Healthy individuals</b>	3	26.6	Female=2(6) Male=1(33)	-	-	-

BMSC= bone marrow stem cells      PBSC=peripheral blood stem cells

Table 3: Association between saliva and blood IL-17A levels and oral cGVHD (n=16) and systemic cGVHD (n=11)

	GVHD	Days	n valid	Blood Levels <sup>a</sup>	Range <sup>a</sup>	n valid	<i>p</i> <sup>*</sup>	Saliva Levels <sup>b</sup>	Range <sup>b</sup>	<i>p</i> <sup>*</sup>
Oral cGVHD	-	+35	5	43.67	0.00-480.14	5	NS	0.00	7.0-158.7	NS
	+		16	9.25	7.0-52224.6	13		0.00	0.0-9.6	
	-	+100	5	0.00	0.0-43768.9	5	NS	4.71	0.0-	NS
	+		14	0.00	0.0-1716.3	14		0.00	0.0-4.3	
Systemic cGVHD	-	+35	19	76.22	0.0-47491.3	18	NS	2.70	0.0-158.7	NS
	+		11	0.00	0.0-52224.6	08		2.11	0.0-1.6	
	-	+100	17	21.55	0.0-26520.5	15	NS	8.24	0.0-81.2	NS
	+		9	18.76	0.0-43768.9	08		6.06	0.0-	

NS: not significant - : patients without the disease; +: patients affected by cGVHD

\* Mann Whitney test <sup>a</sup> pg/mL – median levels <sup>b</sup> pg/mg protein – median levels

## Figures

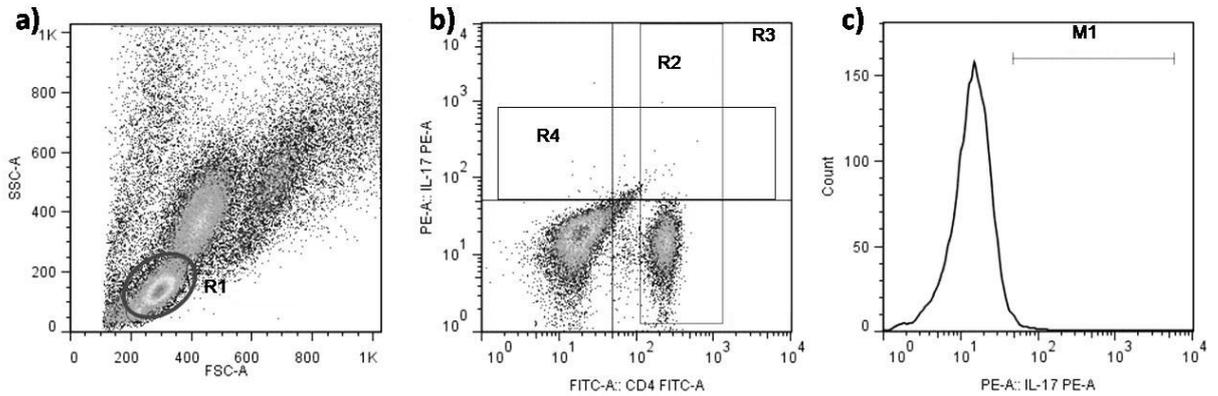


Fig. 1- Representative flow cytometry graphs of CD4<sup>+</sup> lymphocytes expressing intracellular cytokine IL-17A. Flow cytometry dot-plots demonstrate the lymphocyte region (R1) selected (a) and the data analyzed in total CD4<sup>+</sup> T cells (R2) (b). A single-color histogram (M1) (c) expressing IL-17A in the CD4<sup>+</sup> T cells was obtained from the R2 region (c). Double-positive CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> in total lymphocytes (R3) and total IL-17A production (R4) were also analyzed in a dot-plot graphic (b).

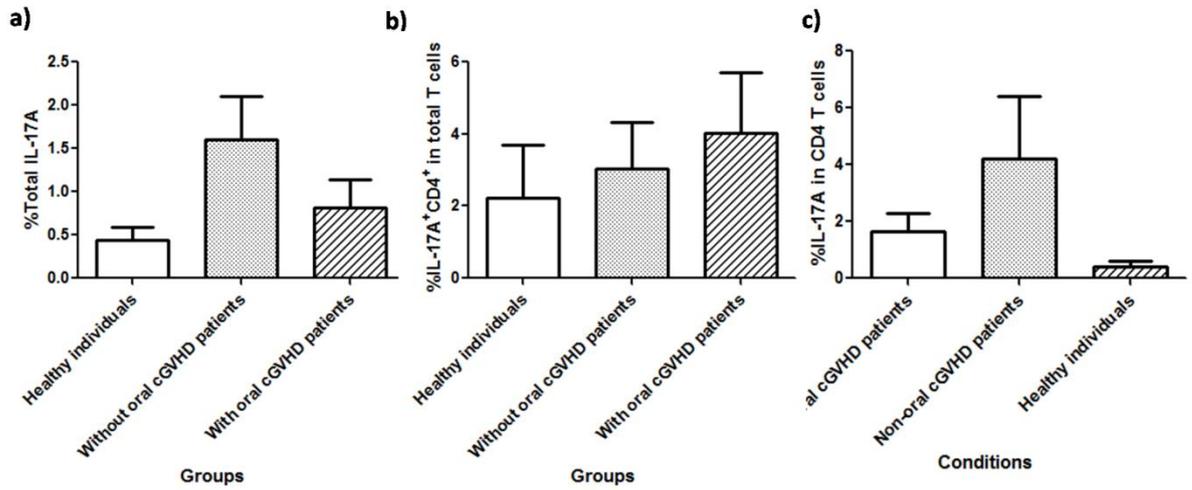


Fig. 2- Descriptive expression of total IL-17A expression. (a), IL-17A in CD4 T cells, (b) IL-17A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> in total T cells, (c) in HSCT patients with oral cGVHD (n = 8), in HSCT patients without oral cGVHD (n = 4) and in healthy individuals (n = 3).

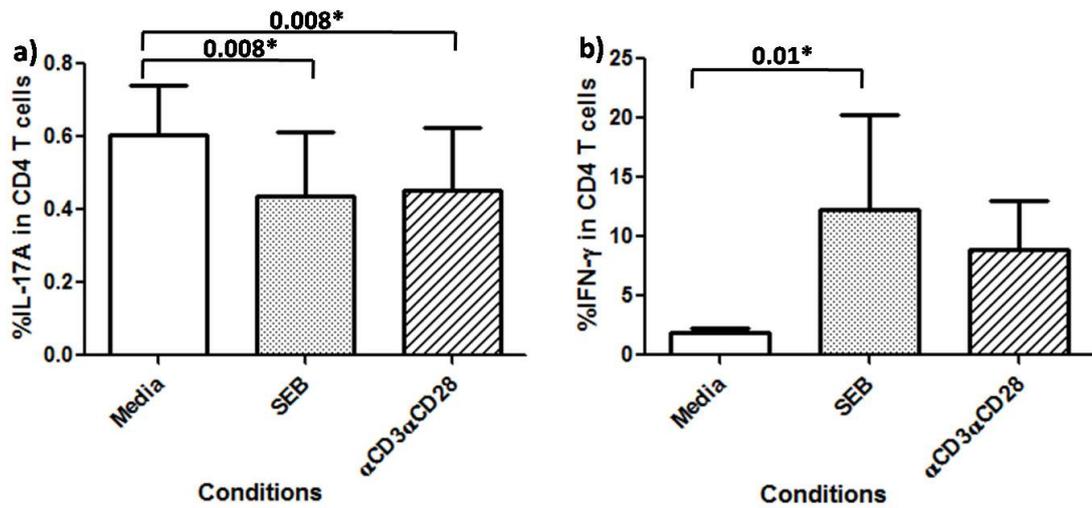
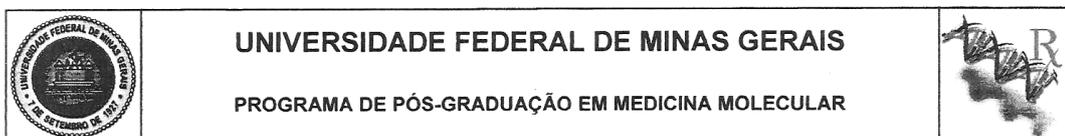


Fig. 3- IL-17A and IFN- $\gamma$  expression by CD4<sup>+</sup> T cells from HSCT patients with oral cGVHD following culture with SEB and  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28. Whole blood from HSCT patients with oral cGVHD was maintained in culture without stimulus (media), as well as with SEB and  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28. IL-17A (a) and IFN- $\gamma$  (b) expression in CD4<sup>+</sup> T cells. The \* indicates a p-value  $\leq 0.05$  between media and stimulus conditions using Wilcoxon's matched pairs test. The overlap histogram graphics represent IL-17 (c) and IFN- $\gamma$  (d) expression in CD4<sup>+</sup> T cells.

## ANEXO 6 – ATA DA DEFESA DA TESE



### ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA RENATA GONÇALVES DE RESENDE - 2010723427

Realizou-se, no dia 13 de agosto de 2013, às 14:00 horas, Faculdade de Odontologia da UFMG -Sala 3403, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada **Avaliação molecular e imunológica na doença do enxerto contra o hospedeiro crônica**, apresentada por RENATA GONÇALVES DE RESENDE, graduada no curso de ODONTOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Ricardo Santiago Gomez - Orientador (UFMG), Prof(a). Jeane de Fatima Correia Silva - coorientadora (UFMG), Prof(a). Rodrigo Villamarim Soares (PUC-MG), Prof(a). Andre Luiz Sena Guimaraes (UNIMONTES), Prof(a). Marina Gonçalves Diniz (UFMG), Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes (UFMG).

A Comissão considerou a tese:

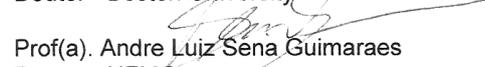
- Aprovada  
 Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa  
 Reprovada

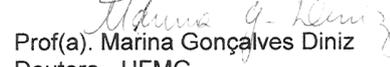
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.  
Belo Horizonte, 13 de agosto de 2013.

  
Prof(a). Ricardo Santiago Gomez  
Doutor - USP

  
Prof(a). Jeane de Fatima Correia Silva  
Doutora - UFMG

  
Prof(a). Rodrigo Villamarim Soares  
Doutor - Boston University

  
Prof(a). Andre Luiz Sena Guimaraes  
Doutor - UFMG

  
Prof(a). Marina Gonçalves Diniz  
Doutora - UFMG

  
Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes  
Doutora - UFMG

  
CONFERE ORIGINAL  
Centro de Pós-Graduação  
Faculdade de Medicina - UFMG