



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluna: Tatiana Sanches Almeida de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas

Ano de Conclusão do Curso: 2004



TCC 172

Tatiana Sanches Almeida de Oliveira

“Análise comparativa da imunoexpressão das Células de Langerhans nas línguas de 15 pacientes com AIDS autopsiados e 15 pacientes autopsiados HIV negativos”.

Monografia apresentada ao Curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, para obtenção do diploma de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas

Piracicaba
2004

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família que sempre me apoiou e aos grandes amigos que foram feitos ao longo destes quatro anos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas pela
colaboração, apoio e pela habilidade com que
orientou nosso trabalho.

SUMÁRIO

1. LISTAS DE TABELAS E FIGURAS.....	
2. LISTAS DE PALAVRAS E ABREVIATURAS EM LATIM.....	
3. RESUMO.....	01
4. INTRODUÇÃO.....	02
5. DESENVOLVIMENTO.....	04
5.1. Material e Métodos.....	04
5.2. Resultados.....	06
5.3. Figuras.....	08
5.4. Discussão.....	09
6. CONCLUSÃO.....	12
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13

1. LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1 – Localização das regiões estudadas da língua	04
Tabela 1 – Média da quantidade de CL na língua de pacientes HIV+ e HIV-.....	06
Tabela 2 – Média da quantidade de CL nas regiões anterior (LA), média (LM), lateral (LL) e posterior (LP) da língua de pacientes HIV+ e HIV-.....	07
Figura 2 – Imunopositividade das CL no epitélio da língua (região lateral) de um paciente com AIDS autopsiado. (Imunoistoquímica: anticorpo CD1a, aumento de 100X).....	08
Figura 3 – Imunopositividade das CL no epitélio da língua (região lateral) de um paciente com AIDS autopsiado. (Imunoistoquímica: anticorpo S100, aumento de 200X).....	08
Figura 4 – Imunopositividade das CL no epitélio da língua (região posterior) de um paciente do Grupo Controle autopsiado. (Imunoistoquímica: anticorpo CD1a, aumento de 200X).....	09
Figura 5 – Imunopositividade das CL no epitélio da língua (região lateral) de um paciente do Grupo Controle autopsiado. (Imunoistoquímica: anticorpo S100, aumento de 200X).....	09

2. LISTAS DE PALAVRAS E ABREVIATURAS EM LATIM

et al- e outros (abreviatura de "et lii")

CL- Células de Langerhans

AIDS- Síndrome da imunodeficiência Adquirida

SVOC- Serviço de Verificação de Óbitos da Capital

FMUSP- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

3. RESUMO

Foi avaliada imunohistoquimicamente a quantidade de Células de Langerhans (CL) presentes na língua de 15 pacientes com AIDS autopsiados e 15 pacientes que morreram por outras causas (grupo controle). As autópsias foram realizadas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) no período de 1997 a 2001.

As línguas foram dissecadas em 4 regiões (anterior, média, posterior e lateral), cortadas em 6 fragmentos e os cortes histológicos corados em Hematoxilina & Eosina. Posteriormente realizamos as reações imunohistoquímicas com os anticorpos S-100 e CD1a (anti-Células de Langerhans) em todos os casos e em seguida imunomorfometria para análise quantitativa das CL.

Houve uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no número das CL nas 04 regiões epiteliais das línguas dos pacientes em fase avançada de AIDS quando comparado ao grupo controle. Além disso, observamos que ambos os anticorpos CD1a e S-100 foram úteis para detectar as CL. Nossos achados nos permitem afirmar que o número diminuído de CL nas línguas dos pacientes com AIDS em fase avançada pode propiciar uma maior incidência de lesões infecciosas, císticas e neoplásicas nas línguas destes pacientes.

4. INTRODUÇÃO

A pandemia de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) teve início na década de 80 e, atualmente (2001), aproximadamente 40 milhões de pessoas são portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em todo globo terrestre (Quinn, 2001). Cerca de 90% dos casos ocorrem em países subdesenvolvidos localizados na África, Ásia e América Latina, enquanto que nos países desenvolvidos os surtos epidêmicos estão estáveis ou mesmo decrescendo em certos grupos populacionais (Ministério da Saúde do Brasil, maio/2000; Quinn, 2001). O HIV pode ser adquirido através de leite materno, sêmen ou sangue, por relação heterossexual e homossexual masculina, pelo uso de drogas injetáveis (UDI), transfusão sangüínea e derivados e verticalmente da mãe para filho (Depaola *et al.*, 2000).

Os pacientes com AIDS apresentam um grande número de lesões de origem infecciosa e neoplásica que podem acometer a cavidade bucal e estruturas peribucais. Estima-se que 20% a 50% dos pacientes infectados pelo HIV desenvolverão alguma lesão na cavidade bucal durante a progressão da doença (Itin *et al.*, 1997). Relatos de alterações no número de CL na AIDS referem-se principalmente à pele, não havendo nenhum trabalho na língua. Trabalhos desta natureza são importantes para esclarecer se há alguma relação entre pacientes em estágios avançados da AIDS e diminuição na densidade de CL, uma vez que essas células fazem parte do sistema imune, principal alvo do vírus HIV.

As CL não podem ser identificadas microscopicamente em cortes de parafina corados por Hematoxilina & Eosina. Em roedores a técnica mais confiável parece ser a atividade ADPase. Quando essa técnica é aplicada em secções verticais do epitélio, as CL são predominantemente encontradas na camada supra basal e também em raros casos na camada basal. Através da microscopia eletrônica pode

ser observado os grânulos de Bisberck que parecem ser um marcador específico das CL. Considerando sua função, alguns autores afirmam que seu papel é mediar a recepção de endocitoses (Lombard *et al.*, 1993). As CL podem ser identificadas por imunistoquímica através da reação com a proteína S-100 e anticorpo monoclonal CD1a. Sendo o anticorpo CD1a mais específico contra as CL enquanto a proteína S-100 marca outras células como por exemplo os melanócitos e as células neurais.

O objetivo deste trabalho foi comparar quantitativamente a presença de CL através de imunistoquímica e imunomorfometria na língua de 15 pacientes com AIDS e 15 pacientes HIV negativos autopsiados entre 1997 a 2001 no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) - Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC). Além disso, analisou-se comparativamente a imunoreatividade dos anticorpos proteína S-100 e CD1a dirigidos contra as CL.

5. DESENVOLVIMENTO

5.1 Material e métodos:

Foram usadas neste trabalho as línguas de 15 pacientes com AIDS autopsiados e de 15 pacientes que morreram por outras patologias não associadas à AIDS (Grupo Controle) no período de 1997 a 2001 no SVOC da FMUSP (Figura 1). A dissecação das 30 autópsias seguiu as normas do SVOC da FMUSP.

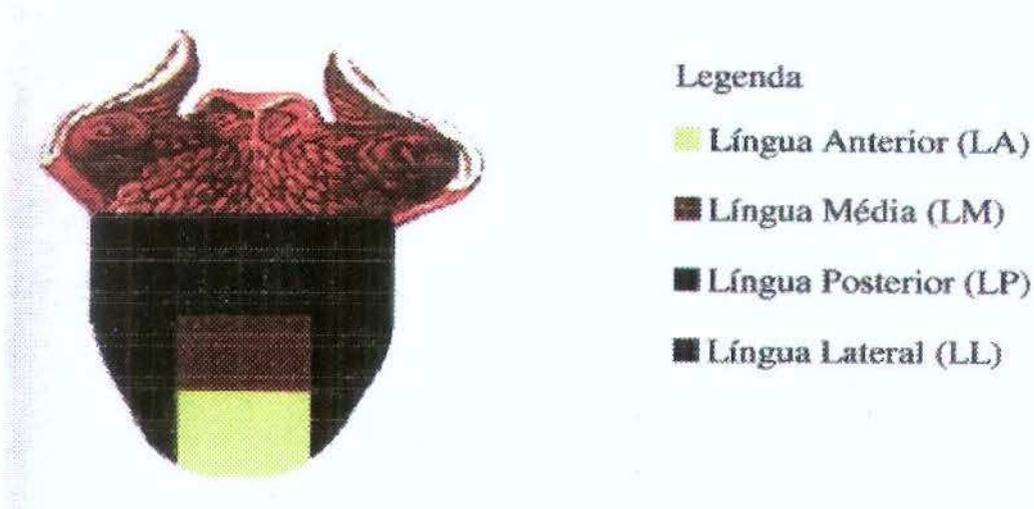


Figura 1. Esquema mostrando como foi dividida a língua para estudo histopatológico e imunohistoquímico.

Imunoperoxidase (Protocolo de Reações)

O estudo imunohistoquímico foi feito nos cortes parafinados (4 μm) das línguas obtidas das 30 autópsias realizadas no SVOC-FMUSP, utilizando-se os seguintes anticorpos dirigidos contra as CL: proteína S-100 (Dakocyt; 1:100000) e anticorpo CD1a (Dakocyt; 1:400). A quantificação da imunomarcação dos anticorpos foi realizada no software (Kontrom 400, Zeiss) analisador de imagem, o qual está acoplado com uma câmera digital Sony de captura de imagem. As lâminas foram avaliadas pelos pesquisadores (PAV e TSAO). Após a obtenção dos dados foi comparada a expressão dos anticorpos em cada região da língua separadamente. A seguir descrevemos o **protocolo de reações** usado na presente pesquisa.

(A) Primeira desparifinização (a quente): em xilol a 60 °C, por 30 minutos.

(B) Segunda desparifinização (a frio): em xilol, em temperatura ambiente, por 20 minutos.

(C) Hidratação dos cortes em: álcool absoluto (3 x); álcool 95%; álcool 80%; lavagens em água corrente e destilada.

() microondas - com solução de ácido cítrico 0,01M / pH 6.0, em duas incubações em potência máxima (750 W), por 9 minutos cada; esfriar até atingir a temperatura ambiente, e lavar em água corrente / destilada e em tampão PBS.

(E) Bloqueio da peroxidase endógena:

() água oxigenada a 3% (10 volumes), em dois banhos de 10 minutos cada;

(F) Incubação com anticorpo primário (específico para o antígeno), diluído em solução de albumina a 1% e azida sódica a 0,1% em PBS, em câmara úmida: 1 hora a 37°C ou 18 horas (overnight) a 4°C.

Lavagens (3 x) em tampão PBS.

(G) Incubação com anticorpo secundário * (específico para a espécie animal em que foi produzido o anticorpo primário), em câmara úmida: 30 minutos a 37°C.

Lavagens (3 x) em tampão PBS.

* na reação com Complexo Avidina-biotina-peroxidase (ABC), o anticorpo secundário foi biotinilado.

(H) Incubação com Complexo Peroxidase-anti-peroxidase (PAP) ou complexo Avidina-biotina-peroxidase (ABC), em câmara úmida: 30 minutos a 37°C.

Lavagens (3 x) em tampão PBS.

(I) Revelação com substrato cromogênico (diaminobenzidina 60 mg% em PBS + 2,0 ml de água oxigenada 10 volumes): 3 a 5 minutos (a 37°C).

Lavagens em água corrente e destilada.

(J) Contracoloração (leve) em Hematoxilina (de Harrys).

(J) Contracoloração (leve) em Hematoxilina (de Harys).

Lavagens em água corrente e destilada.

(A) Desidratação dos cortes em: álcool 50%; álcool 80%; álcool 95%; álcool absoluto (3 x); xilol (3 x) e montagem em Entellan.

5.2 Resultados:

Os valores médios obtidos para a quantidade de CL no epitélio da língua de pacientes HIV positivos e negativos estão descritos na tabela 1 e os valores obtidos para a média de CL presentes nas regiões epiteliais (anterior, média, lateral e posterior) da língua de pacientes com AIDS e pacientes HIV negativos de acordo com o anticorpo utilizado estão registrados na tabela 2. Os valores foram submetidos ao teste T e, subseqüentemente, as médias foram comparadas ao nível de 5% de significância. A tabela 3 mostra a imunofenotipagem de linfócitos dos pacientes HIV positivos pelo método de Citometria de Fluxo do Laboratório Central do Hospital das Clínicas de São Paulo.

A tabela 01 mostra a média absoluta da quantidade de CL presentes nas línguas de pacientes HIV positivos e negativos. Sendo que o grupo HIV negativo apresentou os maiores valores de CL para ambos os anticorpos quando comparado ao grupo com AIDS.

Tabela 1 – Média da quantidade de CL na língua de pacientes HIV+ e HIV-

Anticorpos	HIV+	HIV-
CD1a	29,28333	40,11389
S100	18,32115	45,92151

A tabela 02 mostra a média da quantidade de CL presentes em cada região epitelial (anterior, média, lateral e posterior) da língua de pacientes HIV positivos e negativos. Sendo que, no caso dos pacientes com AIDS, a maior média de células

encontradas quando usamos o anticorpo CD1a foi observada na região média (40,50%), seguida das regiões posterior (26,69%), anterior (22,45%) e lateral (10,36%); já quando foi utilizado o anticorpo S100 a maior média de células foi encontrada na região posterior (36,09%) seguida da região média (26,25%), anterior (22,21%) e lateral (15,46%). Em relação aos pacientes HIV negativos a maior média de células encontradas quando usamos o anticorpo CD1a foi observada na região média (40,11%) seguida das regiões lateral (26,95%), anterior (17,85%) e posterior (15,09%); já quando foi utilizado o anticorpo S100 a maior média de células foi encontrada na região média (29,00%) seguida das regiões posterior (24,85%), lateral (23,72%) e anterior (22,43%).

Tabela 2 – Média da quantidade de CL nas regiões anterior (LA), média (LM), lateral (LL) e posterior (LP) da língua de pacientes HIV+ e HIV-

Região da língua	CD1a		S100	
	HIV+	HIV-	HIV+	HIV-
LA	28,6a	28,4b	17,6a	41,6b
LM	51,6a	63,8b	20,8a	53,8b
LL	13,2a	42,875b	12,25a	44a
LP	34a	24b	28,6a	46,1b

médias seguidas de letras distintas diferem entre si ao nível de significância

A seguir estão as figuras 1 a 4. As figuras 1 e 2 mostram as CL no epitélio da língua (região lateral) de pacientes com AIDS autopsiado, na figura 1 foi utilizado o anticorpo CD1a já na figura 2 foi utilizado o anticorpo S-100. As figuras 3 e 4 mostram as CL no epitélio da língua de pacientes do Grupo controle, no caso da figura 3 é a região posterior e o anticorpo utilizado foi o CD1a, e a figura 4 é a região lateral, utilizando o anticorpo S100.

Não detectamos nenhuma infecção fúngica ou bacteriana nas 30 línguas analisadas usando as colorações de PAS, Ziehl-Neelsen e Grocott.

5.3 Figuras:

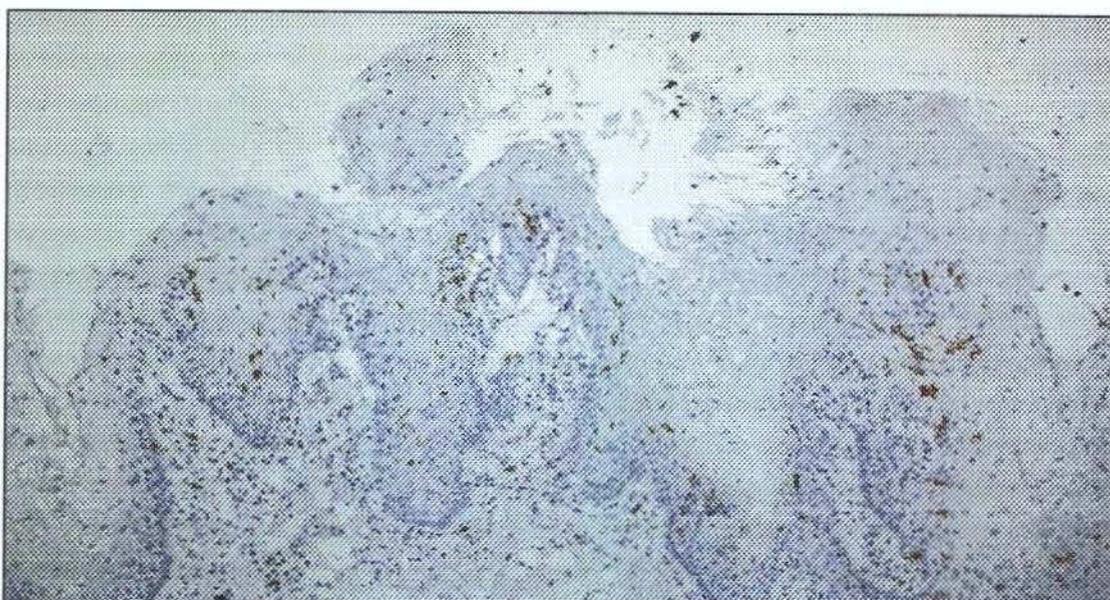


FIG (02): Imunopositividade das CL no epitélio da língua (região lateral) de um paciente com AIDS autopsiado. (Imunoistoquímica: anticorpo CD1a, aumento de 100X).

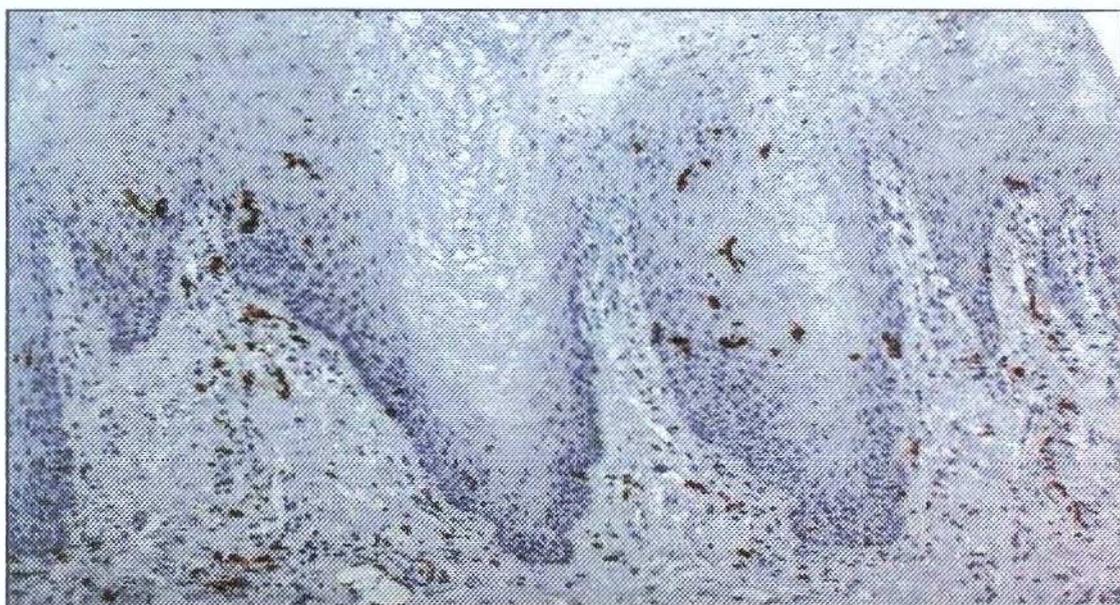


FIG (03): Imunopositividade das CL no epitélio da língua (região lateral) de um paciente com AIDS autopsiado. (Imunoistoquímica: anticorpo S-100, aumento de 200X).

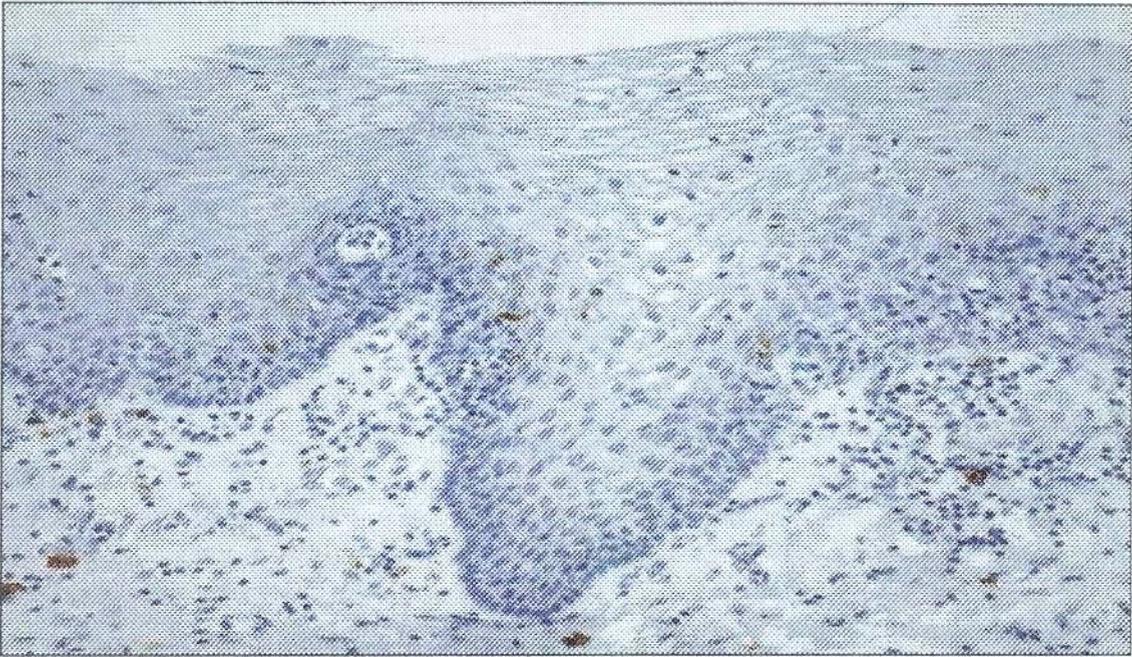


FIG (04):Imunopositividade das CL no epitélio da língua (região posterior) de um paciente do Grupo controle (Imunoistoquímica: anticorpo CD1a, aumento de 200x)

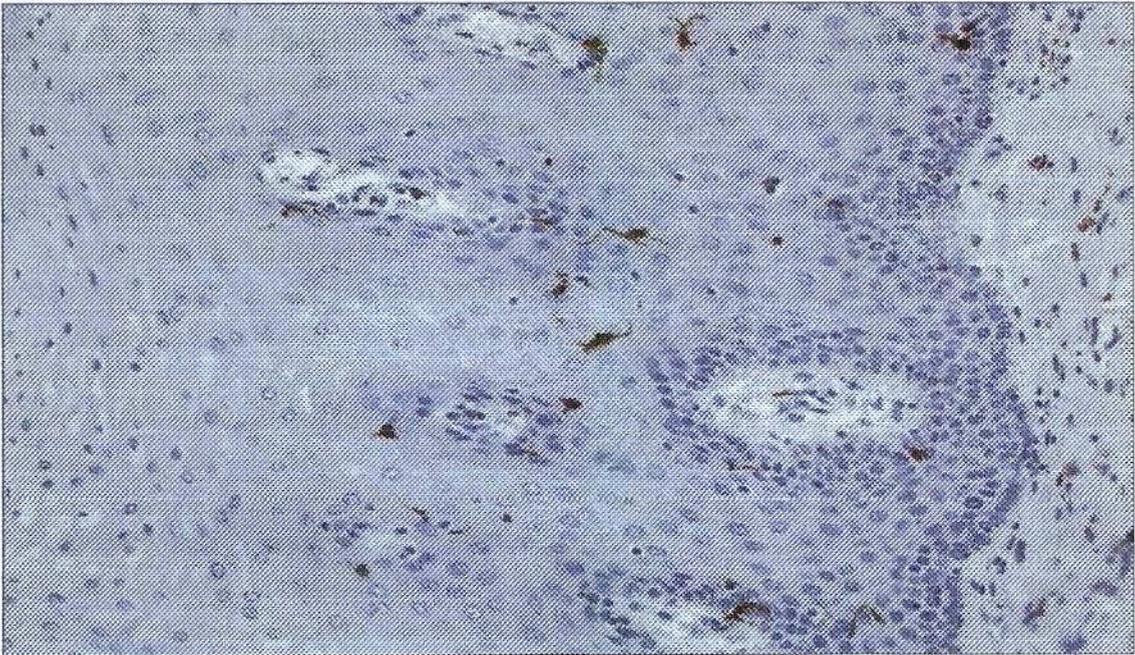


FIG (05): Imunopositividade das CL no epitélio da língua (região lateral) de um paciente do Grupo controle (Imunoistoquímica: anticorpo S100, aumento de 200x)

5.4 Discussão:

As CL constituem a menor população de células da epiderme, contudo têm um importante papel na imunorregulação da pele. Sua principal função é apresentar

antígenos para os linfócitos T e assim induzir uma resposta de células T via antígeno MHC classe II em indivíduos previamente sensibilizados. As CL são células dendríticas, mas de origem diferente das outras células dendríticas da epiderme como os melanócitos (Lombard *et al.*, 1993) e pertencem à linhagem monócito-macrófago (Nandwani *et al.*, 1995, Niedecken H *et al.*, 1987).

O HIV tem uma especial afinidade por células T helper CD4⁺ e as moléculas CD4 podem servir como sítio de ligação para o HIV (Braathen *et al.*, 1987). O número total de células CD4 em indivíduos HIV positivos depende de um perfeito equilíbrio entre a rápida produção viral e a destruição celular pelos linfócitos T citotóxicos. As CL infectadas pelo HIV mantêm a capacidade de interagir com os linfócitos e, neste caso, a transmissão desse retrovírus para o compartimento das células T pode ocorrer (Stingl *et al.*, 1990).

Estudos têm quantificado as CL em diferentes locais como, por exemplo, a pele (Belsito DV *et al.*, 1984; Kirkpatrick CH *et al.*, 1984; Braathen LR *et al.*, 1987), a vagina (Spinillo A *et al.*, 1993), a mucosa oral (Daniels TE *et al.*, 1987; Spörri B *et al.*, 1994) e o esôfago (Charton-Bain MC *et al.*, 1999) de pacientes com AIDS. Foi demonstrado que o número de CL em pacientes infectados pelo HIV está diminuído na pele e no esôfago. Spinillo *et al.* observou, por um estudo imunoistoquímico utilizando proteína S100, uma diminuição no número de CL na mucosa cervicovaginal HIV infectada, e que há uma correlação entre diminuição de CL e estágio de AIDS.

Charton-Bain MC *et al.* em 1999 mostraram que pacientes com AIDS possuem alterações na mucosa do esôfago similar às descritas na pele. O que sugere que uma alteração na mucosa, no número e na morfologia das CL durante a infecção pelo HIV, podem resultar em perda da função das CL, o que pode explicar a manifestação clínica mucocutânea vista no início da infecção pelo HIV e as

infecções dermatológicas oportunistas observadas em estágios mais avançados da doença (Nandwani *et al.*, 1996; Spöri B *et al.*, 1994).

Estudo realizado por Faria *et al.*, em 2004 afirmou que a maior incidência de lesões infecciosas, císticas e neoplásicas ocorreu na região lateral de língua (44,22%), seguida pela região anterior (25,33%), média (17,33%) e posterior (15,11%). Também foi observado que a língua dos pacientes com AIDS foram acometidas por Leucoplasia Pilosa (45,65%), lesões fúngicas (36,9%), Ulceração Crônica Inespecífica (18,47%), lesões virais (11,95%), císticas (2,17%), bacteriana (1,08%) e neoplásicas (1,08%). No grupo HIV negativo, nenhuma lesão fúngica, viral e bacteriana foi detectada. Neste trabalho, os pacientes encontravam-se em fase avançada da AIDS, o que significa baixo nível de linfócitos TCD4+ e alta carga viral. O número absoluto de células T helper no plasma é considerado um dos melhores indicadores de prognóstico do curso da infecção pelo HIV, analogicamente um estudo demonstrou que a contagem das CL também pode atuar desta maneira uma vez que o número dessas células foi menor em pacientes HIV positivos que apresentavam a doença nos estágios III e IV quando comparados com outros indivíduos no estágio II da doença (Dreno *et al.*, 1988). O que coincide com os resultados gerais encontrados em nosso estudo, demonstrando uma relação entre diminuição de CL e fase avançada de AIDS. Além disso, os nossos casos de AIDS fazem parte da casuística utilizada por Faria *et al.* (2004) e o menor número de CL encontrado em nosso trabalho na região lateral de língua pode ser uma das explicações para uma maior ocorrência de lesões infecciosas nesta região.

Nos pacientes HIV positivos foi observado que ambos os anticorpos utilizados, CD1a e S100, mostraram uma diminuição no número de CL na região lateral, contudo nas outras regiões não houve esta similaridade. No caso do CD1a após a região lateral, a região que possuiu o menor número de CL foi a região anterior

seguida das regiões posterior e média. Já em relação ao S100 a região lateral foi seguida da região anterior, média e posterior. Esses resultados diferentes entre CD1a e S100 pode ser decorrente talvez da menor especificidade para detectar CL pelo anticorpo S100, o qual também pode ter marcado melanócitos.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. As CL estão quantitativamente diminuídas na língua de pacientes com AIDS em comparação com pacientes HIV negativos.
2. No caso dos pacientes com AIDS a região lateral apresentou em média a menor quantidade de CL quando utilizamos ambos os anticorpos CD1a e S100 o que provavelmente está relacionado à maior incidência de lesões infecciosas nesta região.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Belsito DV, Sanchez MR, Baer R L *et al*. Reduced Langerhans cell Ia antigen and ATPase activity in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1984; 310; 1279-1282.
2. Braathen LR, Ramirez G, Kunze RO *et al* Langerhans cell as primary target cells for HIV infection. *Lancet* 1987; **ii**; 1094.
3. Charton-Bain MC, Terris B, Dauge MC, Marche C, Walker F, Bouchaud O, Xerri L, Potet F. Reduced number of Langerhans cells in oesophageal mucosa from AIDS patients. *Histopathology.* 1999 May; 34 (5) :399-404.
4. Daniels TE, Greenspan D, Greenspan J *et al* Absence of Langerhans cells in oral hairy leucoplakia, an AIDS-associated lesion. *J. Invest. Dermatol.* 1987; **89**; 178-182.
5. Depaola LG. Human immunodeficiency virus disease: Natural history and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000; 90:266-70.
6. Dreno B, Milpied B, Bigno JD, Stalder JF, Litoux P. Prognostic value of Langerhans cells in the epidermis of HIV patients. *Br J Dermatol.* 1988 Apr; 118 (4): 481-6.
7. Faria PR, Vargas PA, Saldiva PHN, Bohm GM, Naua DT, Almeida OP. Tongue disease en advanced AIDS. *Oral Diseases (in press) 2004.*
8. Itin PH, Lautenschlager S. Viral lesions of the mouth HIV-infected patients. *Dermatology* 1997; 194: 1-7.
9. Kirkpatrick CH, Davis KC, Horsburgh CR. Reduced Ia positive Langerhans cells in AIDS. *N. Engl. J. Med.* 1984; **341**; 857-858.
10. Lombard T, Hauser C, Budtz-Jorgensen E. Langerhans cells: structure, function and role in oral pathological conditions. *J Oral Pathol Med.* 1993 May; 22 (5): 193-202. Review.

11. Nandwani R, Gazzard BG, Barton SE, Hawkins DA, Zemelma V, Staughton RC. Does HIV disease progression influence epidermal Langerhans cell density? *Br J Dermatol*. 1996 Jun; 134(6): 1087-92.
12. Quinn TC. A pandemia mundial do HIV: lições do passado e vislumbres do futuro. *Hopkins HIV Report* 2001; 13: 4-5 e 16.
13. Spinillo A, Tenti P, Zappatore R *et al* Langerhans cell counts and cervical intraepithelial neoplasia in women with human immuno-deficiency virus infection. *Gynecol. Oncol*. 1993; **48**; 210-213.
14. Spörri B, von Overbeck J, Brand CU, Schimidli J, Sanchez ML, Grunow R, Braathen LR. Reduced number of Langerhans cells in oral mucosa washing from HIV-1 seropositives. *J Oral Pathol Med*. 1994; 23; 399-402.