

Estudo da relação entre a infecção por *Candida sp.* e a presença de células CD 20+ em hiperplasias inflamatórias

A study of the relationship between Candida infection and the presence of CD 20+ cells in inflammatory hyperplasias.

Cristiano Macabú Badauy*
 João Jorge Diniz Barbachan**
 Panthelis Varvaki Rados**
 Manoel Sant`Ana Filho**
 José Artur Bogo Chies***

RESUMO

O objetivo do presente estudo é mapear e quantificar as populações de células CD 20+ em Hiperplasias inflamatórias (HI) e estabelecer relação com a infecção por *Candida sp.* Foram utilizados 41 casos de HI do Laboratório de Patologia Bucal da UFRGS. Novos cortes de todos os casos foram submetidos à técnica de coloração do PAS, criando – se 2 grupos: com e sem infecção por *Candida sp.* Seguiu – se a marcação imunohistoquímica com anticorpo monoclonal anti CD 20 para se avaliar a localização, a distribuição e quantificação das células positivamente marcadas em 3 campos consecutivos (400x), escolhidos sobre a área de maior concentração do infiltrado inflamatório. Os resultados da recontagem dos campos mostraram que o examinador estava calibrado pelo teste “t” de Student. As células CD 20+ não apresentaram relação com a infecção por *Candida sp.* Concluiu – se que o envolvimento do braço humoral da resposta imune na infecção por *Candida sp.* na cavidade oral de indivíduos imunocompetentes com hiperplasia inflamatória parece não ser significante.

PALAVRAS- CHAVE

Hiperplasia, diagnóstico. Candidíase bucal. Linfócito B CD 20 positivo.

INTRODUÇÃO

O fungo da espécie *Candida albicans* é um microrganismo encontrado na cavidade bucal de indivíduos com mucosa clinicamente sadia (RINDUN; STENDERUP; HOLMSTRUP, 1994). Na presença de fatores predisponentes, tais como baixa imunidade, diminuição do fluxo salivar e uso de prótese total desadaptada, este fungo, antes comensal, assume a forma de hifas e torna-se patogênico (CANNON et al., 1995).

O trauma crônico ocasionado pelo uso de uma prótese total desadaptada produz uma resposta da mucosa bucal, que se manifesta sob a forma de hiperplasia inflamatória (BUDTZ-JORGENSEN; THEILADE; THEILADE, 1983). Um estudo envolvendo pacientes imunocompetentes com hiperplasia inflamatória mostrou que em 85 % dos casos o fungo se apresentava no interior do epitélio da lesão (BARBACHAN; DOMINGUES; RADOS, 1996).

Sabe-se que o infiltrado inflamatório presente nas hiperplasias inflamatórias é composto principalmente de linfócitos (BADAUY; BARBACHAN; RADOS, 2002) e que a infecção por *Candida sp.* ativa a resposta imune. A resposta imune é mediada por uma série de diferentes células efetoras, destacando-se entre elas os linfócitos T, os macrófagos e os linfócitos B, estes últimos responsáveis pela produção de anticorpos específicos e, conse-

qüentemente pela resposta imune humoral do organismo.

Estudos sorológicos realizados em pacientes com hiperplasia inflamatória indicaram a existência de alto título de anticorpos contra *Candida albicans*, sugerindo um envolvimento importante do braço humoral da resposta imune no combate a este tipo de infecção (AXELSEN, 1973).

Portanto, é objetivo do presente estudo investigar a relação entre a infecção por *Candida sp.* e a resposta imune humoral em hiperplasias inflamatórias em pacientes imunocompetentes, através da análise da presença e posicionamento de linfócitos CD20+ (linfócitos B) em relação a hifas de *Candida sp.* neste tipo de lesão.

REVISÃO DA LITERATURA

O papel protetor da imunidade humoral no que se refere à infecção por *Candida sp.*, como afirmado por Fidel (2002), ainda permanece duvidoso. No entanto, cabe salientar que análises já foram realizadas em diferentes modelos de infecção por *Candida sp.*, incluindo candidíase vaginal, oral ou sistêmica e que tanto indivíduos imunocompetentes quanto imunodeprimidos foram avaliados, sendo este um fator complicante para a determinação do real envolvimento das células B na resposta a esta infecção fúngica oportunista.

Assim, Drobacheff et al (2001) dosaram diferentes classes de anticorpos anti

C. albicans (IgA, IgG e IgM) em pacientes HIV positivos com candidíase bucal e em pacientes normais sem infecção. Neste estudo, foi observado um título mais elevado de anticorpos específicos nos indivíduos com infecção pelo fungo quando comparado ao grupo sem infecção.

Viudes, Perea e Lopez-Ribot (2001), analisaram “in vitro” a imunogenicidade de uma proteína de superfície de *Candida albicans* que elicitava uma forte resposta humoral durante candidíase e De Bernardis et al (2000) em estudo de candidíase vaginal, quantificaram os linfócitos B concluindo que estas células desempenham um importante papel na defesa contra a infecção por *Candida sp.*

No entanto, Williams et al (1997) estudaram as células presentes no infiltrado inflamatório de 10 lesões de hiperplasia inflamatória por *Candida* e concluíram que as células B, em número reduzido, predominaram na região superior do tecido conjuntivo em distribuição focal e Katou et al (1999) analisaram as subpopulações linfocitárias presentes em enxertos de pele realizados na mucosa bucal de 20 pacientes tratados com cirurgia radical para remoção de tumores intra-buciais. Os espécimes foram submetidos à coloração por PAS para pesquisa e contagem das hifas de *Candida albicans*, sendo observado que o número de células CD20 positivas não apresentava varia-

* Mestre em Patologia Bucal UFRGS

** Professores doutores do Programa de Pós Graduação em Odontologia da UFRGS

*** Professores doutor do Programa de Pós Graduação em Genética da UFRGS

ções significativas quando comparados os enxertos com *Candida* e aqueles que não apresentavam o fungo.

É importante ainda salientar que Heimdahl e Nord (1990) discutiram o mecanismo de defesa imunológica contra infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos e concluíram que o principal mecanismo de defesa contra *Candida sp.*, neste modelo, é a resposta imune inespecífica mediada por neutrófilos e macrófagos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os critérios de inclusão no presente estudo foram: diagnóstico histopatológico de hiperplasia inflamatória, peça removida por biópsia total (biópsia excisional) realizada entre 2000 e 2002, e presente no arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ficha de biópsia completamente preenchida, lesão maior que 5 mm e menor que 11 mm no seu maior diâmetro, em blocos que permitissem a realização de 3 ou mais cortes, e epitélio de revestimento da lesão sem ulceração nos cortes em estudo.

Foram realizados 3 cortes histológicos de cada caso estudado, sendo o primeiro corte submetido à técnica de coloração por hematoxilina e eosina (HE) para avaliação microscópica da lesão.

O segundo corte foi submetido à técnica de coloração por PAS (Ácido periódico de Schiff) para detecção de *Candida sp.*, e divisão em 2 grupos: com infecção por *Candida sp.* e controle. O critério de positividade para infecção por *Candida sp.* foi morfologia de hifa e parede celular corada de rosa.

Os casos selecionados foram então cortados em micrótomo (espessura de 3 mm), montados em lâminas histológicas silanizadas (S3003, Dako®, Dinamarca) e submetidos à técnica imunohistoquímica da estreptoavidina-biotina, utilizando-se um anticorpo anti CD20 (clone L26, Dako®, Dinamarca), para identificação e quantificação dos linfócitos B. Os controles positivo e negativo dos anticorpos foram realizados em apêndices humanos provenientes de material de arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da UFRGS.

As células marcadas com coloração acastanhada foram avaliadas por 1 exa-

minador previamente calibrado num microscópio óptico marca ZEISS® com aumento de 100 vezes obedecendo aos seguintes critérios:

✓ Distribuição, conforme as células se apresentem de forma focal (células concentradas em uma ou mais regiões da lesão) ou difusa (células distribuídas por toda extensão da lesão).

✓ Localização anatômica predominante das células positivamente marcadas quando estiverem infiltrando o epitélio, na camada sub-epitelial ou profundamente no tecido conjuntivo. A distribuição e localização anatômica das células positivamente marcadas foi relacionada à localização das hifas de *Candida sp.* no grupo com infecção, para avaliação da possível relação entre estas e o fungo.

Para a contagem das células marcadas positivamente e do total de linfócitos capturaram-se 3 campos microscópicos em aumento de 400 vezes. O primeiro campo foi posicionado sobre a área de maior concentração do infiltrado inflamatório (WILLIAMS *et al.* 1997), procurando-se englobar o maior número de células positivamente marcadas, sendo os outros dois campos selecionados da esquerda para a direita a partir deste, resultando em três campos microscópicos contíguos e não superpostos (SANT'ANA FILHO, 1995).

Para que uma célula fosse considerada positiva para marcação com anticorpo anti-CD20 foi observado que sua membrana citoplasmática apresentasse marcação completa de coloração acastanhada (HANH, 1989), além de presença de núcleo (KATOU *et al.* 1999) e morfologia de linfócito.

ANEXOS

Gráfico 01. Comparação da contagem de células CD 20 positivas e dos linfócitos totais entre os grupos com e sem infecção.

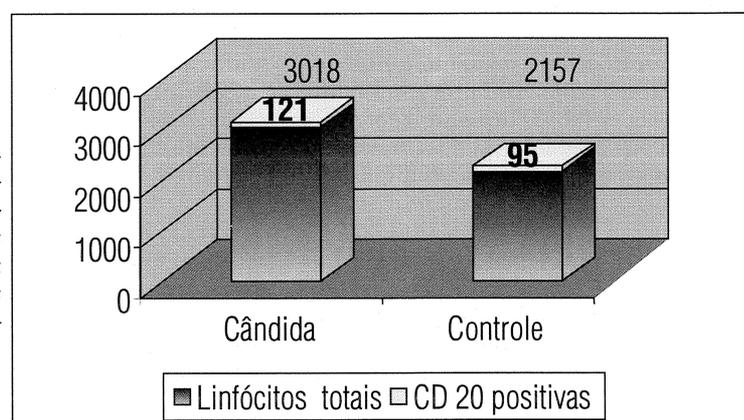


Tabela 01. Comparação das médias / desvios padrão entre os grupos com infecção e controle para marcação com anti-CD 20. Análise estatística pelo teste "t" com 5 % de significância.

Grupo	Células CD 20 positivas	Linfócitos totais	Razão CD 20 positivas / linfócitos totais
Cândia	5,5 / 4,67	137,18 / 71,04	0,0335 / 0,0189
Controle	5 / 3,61	113,52 / 65,57	0,0386 / 0,0293
p	0,7082	0,2774	0,5127

A análise dos dados não indicou diferenças estatisticamente significativas no número de células CD20 positivas ($p=0,7082$), no número de linfócitos totais ($p=0,2774$) ou na razão entre linfócitos CD20+/ linfócitos totais entre os grupos controle e com infecção por *Candida sp.*

DISCUSSÃO

A distribuição das células CD20+, na maioria dos casos, apresentou-se de forma difusa e com localização profunda no tecido conjuntivo. Nos poucos casos em que a distribuição das células CD20+ apresentou padrão focal, estas se localizaram na camada subepitelial. No presente estudo não foi observada qualquer situação em que houvesse um padrão de penetração do epitélio pelas células CD20 positivas. Assim, considerando-se ambos grupos controle e com infecção, não houve diferença entre a distribuição e localização das células CD20 positivas.

A análise quantitativa indicou um maior número de linfócitos B no grupo com infecção por *Candida sp.* quando comparado ao grupo controle (Gráfico 01 e Tabela 01), ao passo que a razão células CD20 positivas/ linfócitos totais foi mais alta no grupo controle do que no grupo com infecção por *Candida sp.* No entanto, apesar de existir uma tendência para os resultados acima indicados, a análise não revelou diferença estatisticamente significativa em qualquer das avaliações. Estes resultados sugerem que não há relação entre a resposta imune humoral, representada pelo número de células CD20+ no local da lesão e a infecção por *Candida sp.* em lesões de hiperplasia inflamatória em indivíduos imunocompetentes.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com Katou *et al* (1999) e Williams *et al* (1997) ao sugerirem que a infecção por *Candida sp.* não apresenta uma relação direta com a distribuição e a localização das células CD20 positivas na mucosa da cavidade oral. Em relação à análise quantitativa, Williams *et al* (1997) sugeriram que os linfócitos T representam o principal tipo celular presente nas candidíases hiperplásicas sendo os linfócitos B encontrados em número reduzido. Cabe salientar que mesmo em uma situação envolvendo enxertos intra-buciais Katou *et al* (1997) não observaram diferença no número de linfócitos B em biópsias com presença ou ausência de infecção por *Candida sp.*

Entretanto, Eversole *et al* (1997), descreveram células CD20+ com padrão de penetração do epitélio associadas a hifas de *Candida sp.* É importante salientar que

estes autores avaliavam a resposta imune contra candida em pacientes HIV+ imunocomprometidos, e que *Candida sp.* é considerado um patógeno oportunista.

Assim, pode-se sugerir que o padrão de resposta imune montado por um organismo em sua defesa contra infecções fúngicas oportunistas varia de acordo com a capacidade imunológica do mesmo. Esta situação parece também ser apoiada pelos trabalhos de Viudes, Perea e Lopez-Ribot (2001) e De Bernardis *et al* (2000).

Viudes, Perea e Lopez-Ribot (2001) identificaram uma série de epitopos imunodominantes para células B sobre uma proteína de parede celular de *Candida albicans* e sugeriram que não somente estes epitopos eram alvos importantes do sistema imune durante a resposta imune normal a este patógeno como poderiam ser utilizados para o desenvolvimento de novos métodos que visassem o desenvolvimento de técnicas terapêuticas, de diagnóstico e de profilaxia de candidíase baseadas em anticorpos. No caso do trabalho de De Bernardis *et al* (2000), cabe salientar que este centrava-se em um modelo de candidíase vaginal em ratos. Neste sistema, o número de células B apresentou uma associação com proteção contra a infecção experimental por *Candida albicans*.

CONCLUSÃO

A resposta imune dirigida contra *Candida sp.* parece diferir dependendo do sistema analisado. Assim, de acordo com dados obtidos em nosso laboratório relativos à análise de células T CD4+ e CD8+ (submetidos para publicação) e CD20+, em conjunto com dados da literatura, pode-se sugerir que o principal mecanismo de defesa contra candidíase oral em indivíduos imunocompetentes com hiperplasia inflamatória é representado pela resposta imune celular associada à resposta imune inata. O envolvimento do braço humoral da resposta imune na infecção por *Candida sp.* na cavidade oral de indivíduos imunocompetentes com hiperplasia inflamatória parece não ser significativa. No entanto, convém salientar que a produção de anticorpos específicos pode ter papel essencial no controle da disseminação da infecção por *Candida sp.* em outros sistemas.

ABSTRACT

The aim of this study is register and quantify the CD 20+ lymphocyte population in inflammatory hiperplasia (IH) and to establish a relationship with

Candida infection. 41 cases of the IH from the Laboratory of Oral Pathology of the UFRGS were stained with PAS for Candida evidenciacion and divided into two groups: infected and control. After immunoreaction with monoclonal antibodies, the localization and distribution of the marked cells was appraised. The lymphocyte positive were quantified in 3 consecutive fields (400x), where the inflammatory infiltration was concentrated. The researcher was calibrated for Student's "t" test ($p<0,05$). The CD 20+ cells did not show relationship with Candida infection. It was conclude that the humoral response is not significant for the host defense against Candida infection in the mouth of immunocompetents individuals with IH.

KEYWORDS

Hyperplasia, diagnostic. Candidosis, oral. CD 20 positive B-lymphocytes.

REFERÊNCIAS

- AXELSEN, N.N. Quantitative Immunoelectrophoretic Methods as Tools for a Polyvalent Approach to Standardization in the Immunochemistry of *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, Bethesda, v. 7, no. 6, p. 949-960, June, 1973.
- BADAUY, C.M.; BARBACHAN, J.J.; RADOS, P.V. Avaliação das Características Microscópicas Presentes nas Hiperplasias Inflamatórias. *Rev. Fac. Odontol.*, Porto Alegre, v. 43, n. 2, p. 48-52, dez. 2002.
- BARBACHAN, J.J.; DOMINGUES, M.G.; RADOS, P.V. Study of Presence of *Candida* in Inflammatory Hyperplasias. *J. Dent. Res.*, Washington, v. 75, no. 5, p.1100, May, 1996.
- BUDTZ-JORGENSEN, E.; THEILADE, E.; THEILADE, J. Quantitative Relationship Between Yeasts and Bacteria in Denture Induced Stomatitis. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v. 91, no. 2, p. 134-142, Apr. 1983.
- CANNON, R.D et al. Oral *Candida*: Clearance, Colonization, or Candidiasis? *J. Dent. Res.*, Washington, v. 74, no. 5, p. 152-161, 1995.
- De BERNARDIS, F. et al. Local Anticandidal Immune Responses in a Rat Model of Vaginal Infection by and Protection Against *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, Bethesda, v. 68, no. 6, p. 3297-3304, June 2000.

DROBACHEFF, C. et al. Increased Serum and Salivary Immunoglobulins Against *Candida albicans* in HIV-Infected Patients with Oral Candidiasis. **Clin. Chem. Lab. Med.**, Berlin, v. 39, no. 6, p. 519-526, June 2001.

EVERSOLE, L.R. et al. Oral Keratinocyte Immune Responses in HIV - Associates Candidiasis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 84, no. 4, p. 373 - 380, Oct. 1997.

FIDEL, P.L. Distinct Protective Host Defense Against Oral and Vaginal Candidiasis. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 40, no. 4, p. 359-375, Aug. 2002.

HAHN, C.L. A Study of T and B Cells in Pulpal Pathosis. **J. Endod.** Baltimore, v. 15, no. 1, p. 20-26, Jan. 1989.

HEIMDAHL, A.; NORD, C.E. Oral Yeast Infection in Immunocompromised and Seriously Diseased Patients. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 48, no. 1, p. 77- 84, Feb. 1990.

JOHANNESSEN, A.C. et al. In Situ Characterization of the Inflammatory Cells Infiltrates of Hyperplastic Denture Stomatitis. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 44, no. 3, p. 187-192, June 1986.

KATOU et al. Unique Inflammatory Features Noted in Intraorally Transferred Skin Flaps: Correlation with *Candida albicans* Infection. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radio. Endod.**, St. Louis v. 87, no. 6, p. 676- 684, June 1999.

RINDUM, J.; STENDERUP, A.; HOLMSTRUP, P. Identification of *Candida albicans* Types Related to Healthy and Pathological Oral Mucosa. **J. Oral. Pathol. Med.** Copenhagen, v. 23, no. 9, p.406- 412, Oct. 1994.

ROITT, I.V.; BRUSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1999. 423 p.

SANT'ANA FILHO, M. **Avaliação Quantitativa das Células de Langerhans no Papiloma, Displasia Epitelial e Carcinoma Espinocelular**. 1995. 47 f. Tese (Doutorado em

Estomatologia) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

VIUDES, A.; PEREA, S.; LOPEZ-RIBOT, J.L. Identification of Continuous B-Cell Epitopes on the Protein Moiety of the 58-kiloDalton Cell Wall Mannoprotein of *Candida albicans* Belonging to a Family of Immunodominant Fungal Antigens. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 69, no. 5, p. 2909-2919, May 2001.

WILLIAMS, D. W. et al. Characterization of the Inflammatory Cell Infiltrate in Chronic Hyperplastic Candidosis of the Oral Mucosa. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 26, no. 2, p. 83- 89, Feb 1997.

Recebido: 11 de maio/2004

Aceito: 06 de junho/2004

Endereço para correspondência:
Prof. João Jorge Diniz Barbachan
Rua Ramiro Barcelos, 2492
Faculdade de Odontologia UFRGS