



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

Expressão de antígenos MHC classe I e de células CD4 e CD8 na polimiosite e dermatomiosite



Carla Renata Graça* e João Aris Kouyoumdjian

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 3 de junho de 2014

Aceito em 6 de outubro de 2014

On-line em 21 de novembro de 2014

Palavras-chave:

Patologia muscular

Imuno-histoquímica muscular

Biópsia muscular

Antígenos de complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC-I)

Miopatias inflamatórias

R E S U M O

Objetivo: Analisar as frequências de expressão dos antígenos de complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC-I) e células CD4 e CD8 no músculo esquelético na polimiosite (PM) e dermatomiosite (DM).

Métodos: Estudo retrospectivo de 34 casos de PM, oito casos de DM e 29 controles com miopatias não inflamatórias.

Resultados: Os antígenos MHC-I expressaram-se no sarcolema e/ou sarcoplasma em 79,4% dos casos de PM, 62,5% dos casos de DM e 27,6% dos controles (a expressão de CD4 foi observada em 76,5%, 75% e 13,8%, respectivamente). Quando os antígenos de MHC-I foram coexpressados com CD4, houve elevada suspeita de PM/DM (principalmente PM). Em 14,3% dos casos de PM/DM, observou-se a expressão isolada dos antígenos MHC-I, sem células inflamatórias.

Conclusão: A expressão dos antígenos MHC-I e a positividade do CD4 podem aumentar a suspeita diagnóstica de PM/DM. Não foi observado infiltrado celular em 14,3% dos casos.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

MHC class I antigens, CD4 and CD8 expressions in polymyositis and dermatomyositis

A B S T R A C T

Objective: To analyze the frequencies of the expression of major histocompatibility complex class I (MHC-I) antigens, and CD4 and CD8 cells in skeletal muscle in polymyositis (PM) and dermatomyositis (DM).

Methods: This was a retrospective study of 34 PM cases, 8 DM cases, and 29 control patients with non-inflammatory myopathies.

Results: MHC-I antigens were expressed in the sarcolemma and/or sarcoplasm in 79.4% of PM cases, 62.5% of DM cases, and 27.6% of controls (CD4 expression was observed in 76.5%, 75%, and 13.8%, respectively). There was a high suspicion of PM/DM (mainly PM) in patients in whom MHC-I antigens and CD4 were co-expressed. In 14.3% of PM/DM cases, we observed MHC-I antigens expression alone, without inflammatory cells.

Keywords:

Muscle pathology

Muscle immunohistochemistry

Muscle biopsy

Major histocompatibility complex class I antigens (MHC-I)

Inflammatory myopathies

* Autor para correspondência.

E-mails: cgraca@hotmail.com, jaris@terra.com.br (C.R. Graça).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2014.10.005>

0482-5004/© 2014 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Conclusion: MHC-I antigens expression and CD4 positivity might add to strong diagnostic suspicion of PM/DM. No cellular infiltration was observed in 14.3% of such cases.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

As miopatias inflamatórias (MI) constituem um grupo heterogêneo de doenças autoimunes caracterizadas clinicamente por fraqueza e inflamação do músculo esquelético. O diagnóstico preciso é fundamental, pois as MI são potencialmente tratáveis. Com base nas características clínicas e histopatológicas, são definidos três subgrupos principais de MI: polimiosite (PM), dermatomiosite (DM) e miosite por corpos de inclusão (MCI). O diagnóstico dessas doenças é baseado em exames clínicos e laboratoriais, particularmente os níveis de creatinoquinase, eletromiografia e os achados do exame patológico dos músculos feito por meio de biópsia.¹⁻³ As características patológicas marcantes para o diagnóstico correto são necrose da fibra muscular (geralmente em áreas isoladas) e a presença de células inflamatórias no perimísio e no endomísio e também algumas vezes em regiões perivasculares. Achado típico é a invasão linfocítica em fibras não necróticas, que logo substituída por macrófagos e células T e então se torna necrótica.⁴ A atrofia perifascicular é específica e característica da DM, assim como os vacúolos *rimmed* são para a MCI.⁴ É bem reconhecido que a ausência de infiltrados inflamatórios não exclui MI. Nesses casos, a presença de antígenos do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC-I) no sarcolema e/ou sarcoplasma pode contribuir para o diagnóstico em casos suspeitos de MI, embora não seja específico.

No caso das fibras musculares normais, os antígenos MHC-I são detectados apenas nos vasos sanguíneos e podem ser facilmente vistos nos capilares do endomísio. Em contraste, na MI, a expressão dos antígenos MHC-I é observada no sarcolema e também internamente (sarcoplasma) em várias fibras.^{5,6} A indução e a expressão dos antígenos MHC-I ocorrem precocemente, com frequência antes dos infiltrados inflamatórios, e continua durante toda a evolução da doença crônica, mesmo com o uso de imunossupressores e depois de aparente remissão clínica.^{1,7-10} As fibras musculares em regeneração e/ou imaturas expressam antígenos MHC-I no sarcolema independentemente da presença de doença,¹¹ por causa disso, é importante distinguir esse achado normal de outro anormal e aplicar a técnica imuno-histoquímica para miosina neonatal,⁴ marcador de imaturidade. A expressão do MHC-I no sarcolema e/ou sarcoplasma das fibras musculares maduras é anormal e representa uma ferramenta útil para o diagnóstico de MI, particularmente na ausência de infiltrados inflamatórios, necrose da fibra muscular, vacúolos *rimmed* ou atrofia perifascicular.

Este estudo visa a enfatizar a importância da análise rotineira dos antígenos MHC-I juntamente com a expressão de subtipos de células T nas técnicas de biópsia muscular quando houver suspeita de MI. Embora o achado patológico característico da MI seja infiltrado inflamatório (como salientado anteriormente), algumas vezes ele pode estar ausente.

Material e métodos

Pacientes

Foram estudados 71 pacientes atendidos no Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp), entre junho de 2005 e junho de 2013. Eles foram encaminhados para biópsia muscular por médicos de várias especialidades, particularmente neurologia e reumatologia.

Foram constituídos dois grupos de pacientes para a avaliação. O grupo 1 foi composto por 42 pacientes com quadro clínico e patológico característicos de miopatia inflamatória, PM ou DM: presença de necrose muscular, infiltrado inflamatório no endomísio e/ou perivascular (fig. 1A e B), invasão de fibras musculares não necróticas e/ou atrofia perifascicular. O grupo 2 foi formado por 29 pacientes encaminhados para biópsia muscular por suspeita de outras miopatias não inflamatórias e cujo resultado foi normal ou com presença de anormalidades miopáticas discretas e não específicas.

Biópsia muscular

Todas as biópsias foram feitas por médico especializado em doenças neuromusculares no músculo *Deltioideus* por meio de técnica aberta, sob anestesia local. A amostra do músculo foi enviada ao Laboratório de Investigação Neuromuscular em estado fresco, sem fixadores ou aditivos, imediatamente congelada em nitrogênio líquido a -176°C e armazenada até o processamento. As espécimes musculares congeladas foram cortadas no criostato na temperatura de -30°C em seções de $5\ \mu\text{m}$ de espessura. O tecido cortado foi montado em lâminas de vidro revestidas com polilisina. A distribuição dos antígenos MHC-I foi analisada com o uso de anticorpo monoclonal pela técnica de imunoperoxidase. A marcação dos anticorpos a serem visualizados sob microscopia óptica foi feita com um sistema de detecção de polímero (NovoLink Max Polymer Detection System, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon-Tyne, England), de acordo com as instruções do fabricante. Os anticorpos usados foram: anti-MHC-I (Rhea Biotech, Campinas, Brasil), anti-CD8 (anticorpo monoclonal de camundongo, clone 1A5, isotipo IgG1) e anti-CD4 (anticorpo monoclonal de camundongo, clone 4B12, isotipo IgG1). Os anticorpos CD4 e CD8 eram da DakoCytomation Denmark A/S, Dinamarca.

Análise estatística

Foi usado teste de qui-quadrado para a comparação de duas proporções, expresso como porcentagem. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

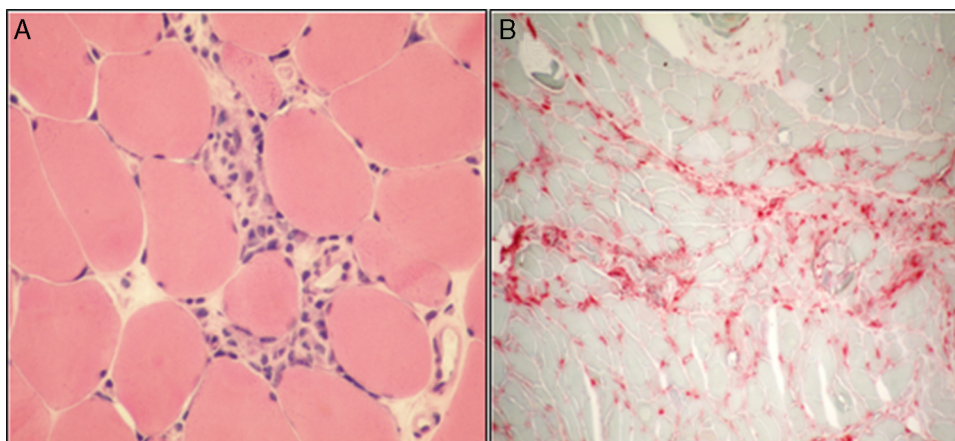


Figura 1 – Biópsia muscular de paciente com miopatia inflamatória. (A) Necrose da fibra muscular e infiltrado inflamatório endomisial (hematoxilina & eosina). (B) Aumento da atividade lisossomal (fosfatase ácida).

Ética

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Famerp.

Resultados

O grupo 1 incluiu 42 pacientes (PM ou DM): 28 do sexo feminino (66,7%) e 14 do masculino (33,3%), com média de $44,7 \pm 19,9$ anos (variação de seis a 80). Desses 42 casos, 34 (80,1%) eram pacientes com PM, 22 mulheres (64,7%) e 12 homens (35,3%); média de $49,3 \pm 17,7$ anos (variação de oito a 80). Os outros oito casos (19,9%) eram DM, seis mulheres (75%) e dois homens (25%); a média era de $25,3 \pm 17,4$ anos (variação de seis a 51). O grupo 2 incluiu 29 pacientes: 17 mulheres (58,6%) e 12 homens (41,4%), com média de $34,2 \pm 21,9$ anos (variação de um a 71).

A frequência de expressão dos antígenos MHC-I nas fibras musculares é mostrada em detalhes na tabela. A [figura 2A-C](#) mostra sua expressão no sarcolema ou sarcoplasma, assim como ausência de expressão. A expressão dos antígenos MHC-I foi observada tanto no sarcoplasma quanto no sarcolema em 79,4% dos pacientes com PM, 62,5% dos com DM e 27,6% dos controles. Não foi observada expressão dos antígenos MHC-I no sarcolema nem no sarcoplasma em 20,6% dos pacientes com PM, 37,5% dos com DM e 72,4% dos controles.

As frequências de positividade de anticorpos para CD4 e CD8 estão detalhadas na [tabela 1](#). A [figura 3A-C](#) mostra a expressão de CD4/CD8 principalmente no endomísio. A maior parte dos casos de PM (76,5%) revelou positividade na expressão de CD4; em 23,5% havia negatividade para expressão de ambos, CD4 e CD8. De modo semelhante, 75% dos casos de DM revelaram positividade para expressão de CD4; em 25% havia negatividade para expressão de ambos, CD4 e CD8. A expressão de CD4 ou CD8 foi observada em 24,1% dos pacientes controle; em 75,9% havia negatividade para expressão de CD4 e CD8; já a positividade de ambos, CD4 e CD8, não foi observada.

A expressão dos antígenos MHC-I no sarcoplasma ou sarcolema foi observada em conjunto com positividade para CD4 em 88,2% dos pacientes com PM, 50% dos com DM e 3,5% dos

do grupo controle. Em comparação, a expressão dos antígenos MHC-I no sarcoplasma ou sarcolema foi observada em conjunto com a positividade para CD8 em 35,3% dos casos de PM, 12,5% dos de DM e 0% dos do controle.

Em cinco casos de PM (14,7%) e em um caso de DM (12,5%) os antígenos MHC-I foram marcados no sarcolema ou no sarcoplasma na ausência de expressão para CD4 e CD8.

Discussão

Este estudo demonstrou que a expressão de antígenos MHC-I no sarcolema ou sarcoplasma ocorreu mais frequentemente em pacientes com PM/DM do que nos controles, embora apenas a diferença entre os controles e os pacientes com PM tenha sido estatisticamente significativa. De modo geral, os antígenos MHC-I estavam expressos em 79,4% dos pacientes com PM/DM. Segundo a literatura, a sensibilidade do teste para o diagnóstico de MI é de 78%, semelhantemente à encontrada neste estudo (79,4%).¹² Quando se considerou apenas a expressão dos antígenos MHC-I no sarcolema, não houve diferença estatisticamente significativa entre os controles e os pacientes com PM ou DM. Quando se considera apenas a expressão dos antígenos MHC-I no sarcoplasma, a diferença foi significativa apenas entre os pacientes controle *versus* PM. Os antígenos MHC-I não estavam expressos no sarcolema nem no sarcoplasma na maior parte dos controles, o que diferiu significativamente apenas nos casos de PM. De acordo com Karpati et al.,¹¹ na PM, a maior parte das fibras musculares apresenta uma expressão forte dos antígenos MHC-I no sarcolema; na DM, as fibras musculares perifasciculares ou em regiões distribuídas ao acaso também revelaram forte expressão.

No geral, 76,2% dos pacientes com PM/DM revelaram positividade na expressão de CD4 e/ou CD8. A positividade das células inflamatórias (CD4) foi maior no caso dos indivíduos com PM/DM *versus* controles, com diferença significativa para ambos. A positividade para CD8 foi menos pronunciada, mas ainda significativa para os casos de PM, embora não para os casos de DM. O percentual de negatividade dos controles para CD4 e CD8 foi significativo quando comparado tanto com a PM

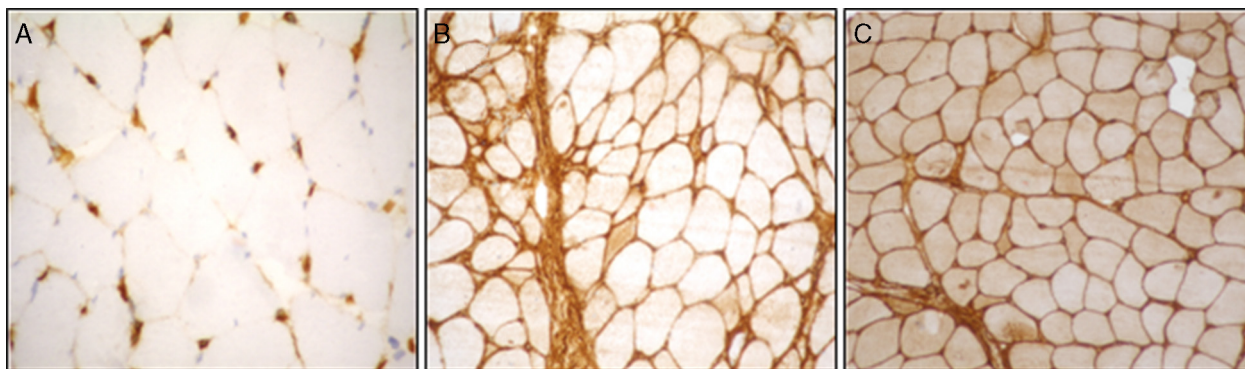


Figura 2 – Expressão de antígenos MHC-I nas fibras musculares: (A) negativo; (B) sarcolema; (C) sarcolema e sarcoplasma.

quanto com a DM. Nenhum controle revelou positividade para CD4 e CD8, o que representou um achado notável.

A expressão dos antígenos MHC-I no sarcolema ou sarcoplasma em combinação com a positividade para CD4 foi o achado mais comum na PM em relação aos controles e mais útil para o diagnóstico. Já para o diagnóstico de DM ele foi menos comum, embora ainda útil na ausência de outros achados típicos. Também vale a pena ressaltar que não foram observados casos de associação entre a expressão dos antígenos MHC-I (no sarcolema ou sarcoplasma) e a expressão do CD8 no grupo controle. Esse achado provavelmente representa uma ferramenta muito útil para descartar PM/DM.

Não foi observado infiltrado inflamatório em cinco casos de PM e um de DM, embora os antígenos MHC-I estivessem expressos no sarcolema ou no sarcoplasma. Esse achado mostra que aproximadamente 15% dos casos de PM/DM podem não ser diagnosticados com base apenas no infiltrado inflamatório, o que corrobora a afirmação de Dalakas¹ de que a expressão dos antígenos MHC-I é um marcador útil para confirmar o diagnóstico de MI, mesmo quando não existam células inflamatórias na biópsia do músculo.

De acordo com os resultados obtidos da biópsia muscular por Van der Pas et al.,¹³ a expressão dos antígenos MHC-I foi observada em 67% dos pacientes com DM e em 61% dos com PM. Nos casos de DM, a análise imuno-histoquímica revelou expressão significativamente maior dos antígenos MHC-I no tipo juvenil (96,4%) do que no tipo adulto (50%).¹² A expressão dos antígenos MHC-I foi observada em 11% das biópsias de pacientes com distrofia muscular e em 4% das biópsias de pacientes com doenças neuromusculares variadas, totalizando 15% (menor do que a expressão de 27,6% encontrada neste estudo).

A maior parte das fibras musculares invadidas por células T, CD4 e/ou CD8, expressa os antígenos MHC-I em sua superfície.⁷ No entanto, como citado anteriormente, em alguns casos foi observada expressão dos antígenos MHC-I sem invasão por células mononucleares. Nyberg et al.¹⁴ também enfatizaram a importância da expressão dos antígenos MHC-I na PM ou DM crônica inativa com fraqueza muscular persistente na ausência tanto de infiltrados inflamatórios quanto de sinais de inflamação na ressonância magnética. Além disso, a expressão dos antígenos MHC-I não é modificada pelo tratamento prévio com fármacos imunossupressores,

Tabela 1 – Expressão de antígenos MHC-I (sarcolema e sarcoplasma), CD4 e CD8 em biópsias musculares de pacientes com polimiosite (PM), dermatomiosite (DM) e controles (C)

	PM	DM	Controles	p	p
				PM/C	DM/C
N	34	8	29		
Idade	49,3 ± 19,9	25,3 ± 17,4	34,2 ± 21,9		
Masculino	35,3% (12)	25% (2)	41,4% (12)		
Feminino	64,7% (22)	75% (6)	58,6% (17)		
MHC-I (+) sarcolema	47,1% (25)	62,5% (5)	24,1% (7)	0,1037	0,1035
MHC-I (+) sarcoplasma	73,5% (16)	50,0% (4)	13,8% (4)	< 0,0001	0,0860
MHC-I (+) ambos	41,2% (14)	50,0% (4)	10,3% (3)	0,0135	0,0424
MHC-I (+) um ou outro	79,4% (27)	62,5% (5)	27,6% (8)	0,0001	0,1579
MHC-I (-) ambos	20,6% (7)	37,5% (3)	72,4% (21)	0,0001	0,1579
CD8 (+)	38,2% (13)	12,5% (1)	10,3% (3)	0,0247	0,6410
CD4 (+)	76,5% (26)	75,0% (6)	13,8% (4)	< 0,0001	0,0027
CD4 e CD8 (+)	38,2% (13)	12,5% (1)	nenhum (0)	0,0006	0,4846
CD4 e/ou CD8 (+)	76,5% (26)	75,0% (6)	24,1% (7)	0,0001	0,0243
CD4 e CD8 (-)	23,5% (8)	25,0% (2)	75,9% (22)	0,0001	0,0243
MHC-I (um ou outro) e CD4 (+)	88,2% (30)	50,0% (4)	3,5% (1)	< 0,0001	0,0048
MHC-I (um ou outro) e CD8 (+)	35,3% (12)	12,5% (1)	nenhum (0)	0,0012	0,4846

p < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

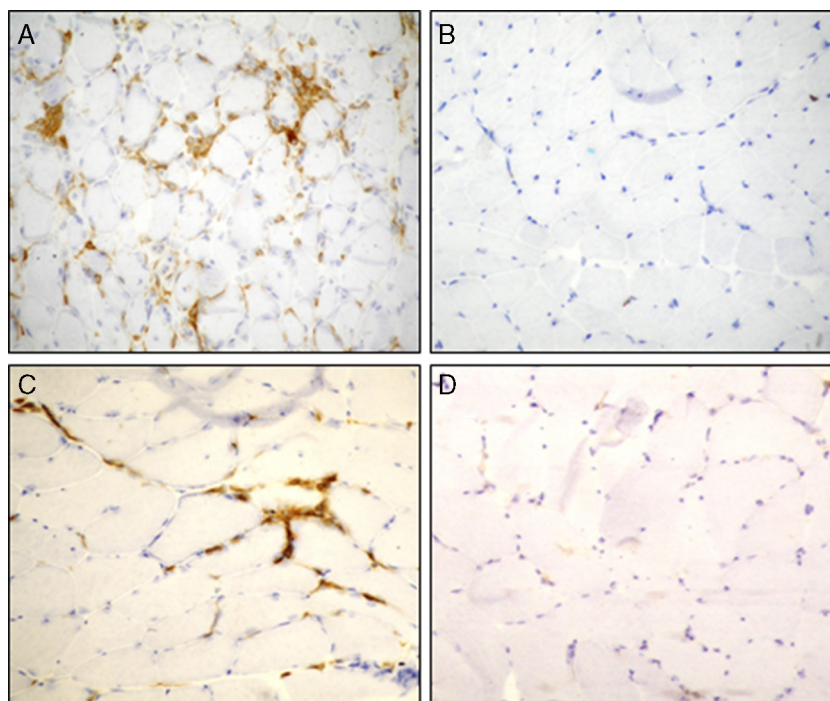


Figura 3 – Expressão de CD4 e CD8: (A) CD4-positivo; (B) CD4-negativo; (C) CD8-positivo; (D) CD8-negativo.

embora Van der Pas et al.¹³ tenham relatado diminuição da sensibilidade para o teste dos antígenos MHC-I depois de quatro semanas de terapia imunossupressora.

Deve-se enfatizar que os antígenos MHC-I também podem ser expressos nas distrofias musculares, principalmente na deficiência de disferlina, que se manifesta clinicamente como uma distrofia das cinturas dos membros ou miopatia distal.¹⁵ Nesses casos, foi observado aumento da resposta inflamatória, em conjunto com o padrão distrófico ativo. Os infiltrados celulares sugerem que a reação inflamatória é secundária à necrose. Os antígenos MHC-I foram superexpressos principalmente em associação com a fagocitose e a regeneração das fibras.^{15,16} Nas disferlinopatias, os linfócitos CD8 são raros e os linfócitos T invadem fibras musculares apenas ocasionalmente, enquanto ambos são achados comuns na PM.¹⁷ A disferlinopatia deve ser considerada no diagnóstico diferencial de MI que não responde aos esteroides.

Conclusão

A presença de expressão de antígenos MHC-I e subtipos de células T pode ser útil na diferenciação de miopatias inflamatórias de outras não inflamatórias, muitas vezes um desafio clínico. Os antígenos MHC-I foram mais frequentemente expressos na PM; células foram mais positivas para CD4 na PM e na DM; os antígenos MHC-I foram expressos sem células inflamatórias em 14,6% dos casos de PM/DM; existe forte suspeita de PM/DM (principalmente PM) quando os antígenos MHC-I são expressos em combinação com positividade para CD4; e há uma alta probabilidade de excluir tanto a PM quanto a DM na ausência de expressão de antígenos MHC-I e CD4.

Financiamento

Bolsa de Auxílio à Pesquisa, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Dalakas MC. Muscle biopsy findings in inflammatory myopathies. *Rheum Dis Clin N Am.* 2002;28:779-98.
2. Chinoy H, Lamb JA, Ollier WER, Cooper RG. Recent advances in the immunogenetics of idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Research & Therapy.* 2011;13(3):216.
3. Salaroli R, Baldin E, Papa V, Rinaldi R, Tarantino L, De Giorgi LB, et al. Validity of internal expression of the major histocompatibility complex class I in the diagnosis of inflammatory myopathies. *J Clin Pathol.* 2012;65:14-9.
4. Dubowitz V, Sewry CA. Muscle biopsy. In: *A practical approach.* 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
5. Appleyard ST, Dunn MJ, Dubowitz V, Rose ML. Increased expression of HLA ABC class I antigens by muscle fibres in duchenne muscular dystrophy, inflammatory myopathy, and other neuromuscular disorders. *Lancet.* 1985;1(8425):361-3.
6. McDouall RM, Dunn MJ, Dubowitz V. Expression of class I and class II MHC antigens in neuromuscular diseases. *J Neurol Sci.* 1989;89:213-26.
7. Emslie-Smith AM, Arahata K, Engel AG. Major histocompatibility complex class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes, and T

- cell-mediated cytotoxicity in myopathies. *Hum Pathol*. 1989;20:224-31.
8. Choi JH, Park YE, Kim SI, Kim JI, Lee CH, Park KH, Kim DS. Differential immunohistological features of inflammatory myopathies and dysferlinopathy. *J Korean Med Sci*. 2009;24:1015-23.
 9. Singh P, Kohr D, Kaps M, Blaes F. Skeletal muscle cell MHC I expression: implications for statin-induced myopathy. *Muscle Nerve*. 2010;41:179-84.
 10. Vincze M, Danko K. Idiopathic inflammatory myopathies. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2012;26:25-45.
 11. Karpati G, Pouliot Y, Carpenter S. Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles. *Annals of Neurology*. 1988;23:64-72.
 12. Shinjo SK, Sallum AM, Silva CA, Marie SK. Skeletal muscle major histocompatibility complex class I and II expression differences in adult and juvenile dermatomyositis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(8):885-90.
 13. Van der Pas J, Hengstman GJD, Ter Laak HJ, Borm GF, Van Engelen BGM. Diagnostic value of MHC class I staining in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75:136-9.
 14. Nyberg P, Wikman A, Nennesmo I, Lundberg I. Increased expression of interleukin 1 a and MHC class I in muscle tissue of patients with chronic, inactive polymyositis and dermatomyositis. *J Rheumatol*. 2000;27:940-8.
 15. Fanin M, Angelini C. Muscle pathology in dysferlin deficiency. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2002;28:461-70.
 16. Dalakas MC. Inflammatory disorders of muscle: progress in polymyositis, dermatomyositis and inclusion body myositis. *Current Opinion in Neurology*. 2004;17:561-7.
 17. Confalonieri P, Oliva L, Andreetta T, Lorenzoni R, Dassi P, Mariani E, et al. Muscle inflammation and MHC class 1 upregulation in muscular dystrophy with lack of dysferlin: an immunopathological study. *Journal of Neuroimmunology*. 2003;142:130-6.