



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ANA LUZIA ARAÚJO BATISTA**

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS Ki-67 E  
BCL-2 EM CRESCIMENTOS GENGIVAIS INDUZIDOS POR DROGAS  
E HIPERPLASIAS GENGIVAIS INFLAMATÓRIAS**

**CAMPINA GRANDE/PB**

**2012**

**ANA LUZIA ARAÚJO BATISTA**

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS Ki-67 E  
BCL-2 EM CRESCIMENTOS GENGIVAIS INDUZIDOS POR DROGAS  
E HIPERPLASIAS GENGIVAIS INFLAMATÓRIAS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba em cumprimento à exigência como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia com área de concentração em Clínica Odontológica.

**Orientadora: Prof. Dra. Ruthinéia Diógenes Alves Uchôa Lins**

**Co-orientador: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**

**CAMPINA GRANDE/PB**

**2012**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

B333e      Batista, Ana Luzia Araújo.  
Expressão imuno-histoquímica das proteínas Ki-67 e Bcl-2 em crescimentos gengivais induzidos por drogas e hiperplasias gengivais inflamatórias [manuscrito] / Ana Luzia Araújo Batista. – 2012.  
112 f. : il. color.

Digitado  
Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2012.

“Orientação: Profa. Dra. Ruthineia Diógenes Alves Uchôa Lins, Departamento de Odontologia”  
“Co-Orientação: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka, Departamento de Odontologia.”

1. Saúde bucal.    2. Hiperplasia gengival.    3. Anomalia dentária. I. Título.

21. ed. CDD 616.31

**ANA LUZIA ARAÚJO BATISTA**

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS Ki-67 E  
BCL-2 EM CRESCIMENTOS GENGIVAIS INDUZIDOS POR DROGAS  
E HIPERPLASIAS GENGIVAIS INFLAMATÓRIAS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia com área de concentração em Clínica Odontológica.

Data da defesa: 24/07/2012



---

**Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka/ UEPB**

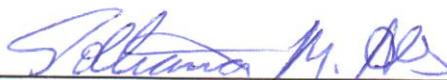
**Membro titular (Co-orientador)**



---

**Profa. Dra Roseana de Almeida Freitas/ UFRN**

**Membro titular (1ª Examinadora)**



---

**Profa. Dra Pollianna Muniz Alves/ UEPB**

**Membro titular (2ª Examinadora)**

## DEDICATÓRIA

*A Deus*

*Aos Meus pais*

*Ao meu companheiro George*

*A esta criança que já carrego no ventre*

*Aos meus irmãos e sobrinhos*

*Aos meus amigos de coração*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus que me carrega nos braços e cuida sempre de mim.*

*A papai, **Manoel Batista**, meu grande mestre, detentor de uma sabedoria divina tão bem aperfeiçoada pelas experiências de vida.*

*A mamãe, **Maria Madalena**, minha fortaleza, meu braço forte que me ergueu nos primeiros passos e que até hoje me ensina a caminhar.*

*A **George**, meu grande companheiro nessa vida que, com muito amor, está sempre ao meu lado.*

*Aos meus cinco irmãos, **Ana Cláudia**, **Ana Grazielle**, **Ana Cristina**, **Ana Virgínia** e **Zé Neto**, por me ajudarem a construir essa irmandade e permanecer na união de uma família que para mim é algo sagrado.*

*A **Anália** e **Marlito**, meus pais de coração, protagonistas também na formação do meu caráter.*

*A toda **minha família** que não me ajudaram a escrever essa dissertação, mas me ajudam constantemente a escrever minha história de vida.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Agradeço, em especial, ao meu amado **Prof. Gustavo Godoy**, coordenador do Mestrado, que me dá lições de vida e me ensina, com seu exemplo de retidão de caráter e personalidade, como se tornar um ser humano completo. Agradeço ainda a **Profa. Patrícia Meira**, coordenadora adjunta, pela atenção que sempre me tem dispensado e a **Márcia Leite**, secretária e amiga de trabalho, pelas inúmeras ajudas nas horas de maior sacrifício.*

*A todos os professores do Mestrado que com muita dedicação nos transmitiram ensinamentos e nos impulsionaram a conquistar mais uma etapa da vida. Em especial, agradeço a minha queridíssima orientadora **Profa. Ruthineia Alves Uchôa Lins**, pelo exemplo de cristã, professora, mãe, filha, esposa e amiga que, com sua pureza de alma e orientação divina, consegue assumir muito bem todos esses papéis. Aproveito para agradecer ao seu esposo, Robinson, e a seu filho, Rafael, pelo acolhimento em seu lar.*

*Ao **Prof. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, colega de trabalho e gênio, que me encanta não apenas pela sua tamanha inteligência mas, sobretudo, por utilizar o conhecimento como dom, colocando-se sempre a disposição. Admira-me ainda seu empenho pelo trabalho e o compromisso com a ciência. Um enviado de Deus para a minha vida.*

*A **Profa. Pollianna Muniz Alves**, colega de trabalho, ser humano surpreendente e de uma sensibilidade incrível. Obrigada pelo apoio e pelas palavras de carinho e conforto.*

*A **Profa. Raquel Christina Barbosa** pelos aprendizados em Periodontia.*

*A todos os colegas de mestrado pela companhia. Agradeço, em especial, a **Jadson, Marília, Vanda, Vera e Soraya**, pela amizade estabelecida. Vou sentir saudade.*

*A UEPB que me permitiu realizar o sonho de fazer um mestrado, sendo aluna e servidora ao mesmo tempo. Agradeço em especial a Chefia do Departamento, representada pela **Profa. Darlene Eloy Dantas e Profa. Carmem Lúcia Soares** e aos meus ex-professores da graduação que torceram pela minha vitória. Agradeço ainda aos meus colegas de trabalho e que a minha conquista seja exemplo para que eles também vençam. Deixo minha gratidão e carinho a **Abraão, Alexandre, Amanda, Andrea, Ângela, Cristiane, Felipe, Geórgia, Marileide e Rejane**.*

*A UFPB, meu local de trabalho que também me possibilitou estudar e me aperfeiçoar. Destaco a Chefia do Departamento representada pelo **Profa. Suzana Araújo e Prof. Danilo Tancler Stipp**, aos professores que trabalham diretamente comigo, **Prof. Márcio Menezes e Prof. Ricardo Guerra** e as professoras e amigas **Profa. Katerin Bohorquez Grondona e Profa Valeska Shelda Melo**. Agradeço ainda aos meus colegas de trabalho **Antônio, Daniela, Karla, Lourdinha, Marquiliano, Juliana, Rafael, Temístocles e Vânia** pela torcida.*

*A UFRN, a todos os professores da Disciplina de Patologia Oral, em especial a **Profa. Lélia Batista, Profa. Roseana Freitas e Profa. Éricka Janine Dantas** por disporem do seu tempo, conhecimento e espaço para que essa pesquisa fosse possível. Aproveito para deixar meu agradecimento aos servidores técnicos-administrativos, destacando **Hévio e Sandrinha**.*

*Aos demais colaboradores, em especial ao **ISAS e HAT**, destacando o apoio de **Dr. Rafael Maciel, Dra. Mayara Camerin e Simone Couto**, ao **Prof. Rivadávio da UnB**, a **Profa. Roberta da UNIFOR**, a minha amiga, irmã e cumadre **Elizabeth Calina Freitas**, parceira de todas as horas e ao meu xodó **Arley Leitão**, aluno da graduação que esteve durante muito tempo do meu lado.*

*Aos anjos que Deus coloca na minha vida constantemente, **Iara, Luzia, Inalda, D. Socorro** e tantos outros que vão suavizando o caminho árduo.*

*A cada paciente que cedeu seu material biológico para que essa pesquisa fosse possível. Eles também contribuem com o desenvolvimento científico.*

*A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelos auxílios financeiros que possibilitaram a realização desta pesquisa.*

*“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade;  
Outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade;  
Outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe;  
Outras, para serem edificadas, e isso é prudência;  
Outras, para edificarem os outros, e isso é caridade”*

*Santo Agostinho*

## RESUMO

Considerando-se que o desequilíbrio entre a apoptose e a proliferação celular pode exercer um papel importante na patogênese do crescimento gengival induzido por drogas (CGID), o presente estudo se propôs a avaliar a expressão imuno-histoquímica das proteínas Ki-67 e Bcl-2 e a sua relação com as características histomorfológicas em CGIDs e hiperplasias gengivais inflamatórias (HGIs), em comparação com espécimes de gengiva saudável (GS). O estudo foi descritivo-analítico, transversal, observacional, qualitativo e quantitativo. A amostra foi constituída por 20 casos de CGID, 20 casos de HGI e 20 casos de GS, os quais foram submetidos à análise histomorfológica e imuno-histoquímica. Na análise histomorfológica, foram avaliados os seguintes aspectos: presença de cristas epiteliais alongadas, grau de colagenização, grau de vascularização, intensidade e distribuição do infiltrado inflamatório. No estudo imuno-histoquímico, foram determinados os índices de positividade (IPs) para os anticorpos anti-Ki-67 e anti-Bcl-2, tanto no revestimento epitelial quanto no tecido conjuntivo dos espécimes teciduais. Os resultados histomorfológicos revelaram a presença de cristas epiteliais alongadas em direção ao tecido conjuntivo apenas nos CGIDs, bem como associação estatisticamente significativa deste grupo com o grau de colagenização intenso ( $p = 0,010$ ). Para todos os grupos, constatou-se uma maior proporção de casos com intensa vascularização, apresentando infiltrado inflamatório de moderado a intenso e com distribuição focal ( $p > 0,05$ ). Quanto à análise imuno-histoquímica, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação aos IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial ( $p > 0,05$ ). No tecido conjuntivo, CGIDs, HGIs e GSs apresentaram baixos IPs para o Ki-67 ( $p > 0,05$ ). No tocante aos IPs para o Bcl-2 no epitélio, a maior média foi encontrada no grupo de CGID ( $p = 0,061$ ). Por sua vez, no tecido conjuntivo, CGIDs revelaram maior número de casos imunopositivos para o Bcl-2 (45,0%), mas sem diferenças entre os IPs em relação às HGIs e GSs ( $p > 0,05$ ). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos IPs para o Ki-67 e para o Bcl-2 em relação às características histomorfológicas dos CGIDs, HGIs e GSs ( $p > 0,05$ ). Além disso, não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre os IPs para o Ki-67 e para o Bcl-2, em nenhum dos três grupos. Portanto, os achados do presente estudo sugerem que o aumento da proliferação e a diminuição da apoptose dos fibroblastos não estão envolvidos na patogênese dos CGIDs. Por outro lado, o padrão morfológico das cristas epiteliais alongadas, observadas nessas lesões, poderiam ser decorrentes da inibição da apoptose dos ceratinócitos e não do aumento na proliferação destes tipos celulares.

**Palavras-chave:** Hiperplasia gengival. Hipertrofia gengival. Apoptose. Proliferação celular. Imuno-histoquímica.

## ABSTRACT

Considering that the imbalance between apoptosis and cell proliferation may play an important role in the pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth (DIGO), the present study aimed to evaluate the immunohistochemical expression of Ki-67 and Bcl-2 proteins and their relationship with histomorphologic features in DIGOs and inflammatory gingival hyperplasias (IGHs), compared with specimens of healthy gingiva (HG). The study was descriptive-analytical, cross-sectional, observational, qualitative and quantitative. The sample consisted of 20 cases of DIGO, 20 cases of IGH and 20 cases of HG, which underwent histomorphologic and immunohistochemical analysis. In histomorphologic analysis, the following aspects were evaluated: presence of elongated epithelial rete pegs, degree of collagenization, degree of vascularization, intensity and distribution of the inflammatory infiltrate. In immunohistochemical study, the labeling indexes (LIs) for anti-Ki-67 and anti-Bcl-2 antibodies were determined, both in epithelial and connective tissue of specimens. The histomorphologic results revealed presence of elongated epithelial rete pegs toward the connective tissue only in DIGOs, as well as statistically significant association of this group with intense degree of collagenization ( $p = 0.010$ ). For all groups it was found a higher proportion of cases with intense vascularization, and moderate to intense inflammatory infiltrate with focal distribution ( $p > 0.05$ ). With respect to immunohistochemical analysis, there were no statistically significant differences between groups regarding the Ki-67 LIs in the epithelial lining ( $p > 0.05$ ). In the connective tissue, DIGOs, IGHs and HGs showed low Ki-67 LIs ( $p > 0.05$ ). Regarding the Bcl-2 LIs in the epithelium, the highest mean was found in the group of DIGO ( $p = 0.061$ ). In turn, in connective tissue, DIGOs showed higher number of immunopositive for Bcl-2 (45.0%) in comparison with IGHs and HGs, but no differences regarding LIs ( $p > 0.05$ ). There were no statistically significant differences in Ki-67 and Bcl-2 LIs in relation to the histomorphologic characteristics of DIGOs, IGHs and HGs ( $p > 0.05$ ). Furthermore, in all groups, there were no statistically significant correlations between Ki-67 and Bcl-2 LIs. Therefore, the findings of this study suggest that neither increased fibroblast proliferation nor reduced fibroblast apoptosis is involved in the pathogenesis of DIGOs. On the other hand, the morphology of elongated epithelial rete pegs observed in these lesions may be due to inhibition of apoptosis of keratinocytes rather than an increase in the proliferation of these cell types.

**Key-words:** Gingival hyperplasia. Gingival hypertrophy. Apoptosis. Cell proliferation. Immunohistochemistry.

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Anticorpo, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	64
--	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Distribuições absoluta e relativa e significância estatística dos graus de colagenização e vascularização do tecido conjuntivo com relação aos grupos avaliados. Campina Grande – PB, 2012.....	71
TABELA 2.	Distribuições absoluta e relativa e significância estatística da intensidade e da distribuição do infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo com relação aos grupos avaliados. Campina Grande – PB, 2012.....	72
TABELA 3.	Tamanho da amostra, média±desvio-padrão, estatística <i>F</i> e significância estatística ( <i>p</i> ) para os IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de CGID, HGI e GS. Campina Grande – PB, 2012.....	74
TABELA 4.	Tamanho da amostra, média±desvio-padrão, estatística <i>F</i> e significância estatística ( <i>p</i> ) para os IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Campina Grande – PB, 2012.....	75
TABELA 5.	Tamanho da amostra, média±desvio-padrão, estatística <i>t</i> , significância estatística ( <i>p</i> ) e intervalo de confiança (95%) para os IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. Campina Grande – PB, 2012.....	76
TABELA 6.	Tamanho da amostra, média±desvio-padrão, estatística <i>t</i> , significância estatística ( <i>p</i> ) e intervalo de confiança (95%) para os IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de acordo com o grau de vascularização do tecido conjuntivo. Campina Grande – PB, 2012.....	78
TABELA 7.	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística KW e significância estatística ( <i>p</i> ) para os IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de CGID, HGI e GS. Campina Grande – PB, 2012.....	80
TABELA 8.	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística ( <i>p</i> ) para os IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. Campina Grande – PB, 2012.....	81

TABELA 9.	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística ( <i>p</i> ) para os IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de acordo com o grau de vascularização. Campina Grande – PB, 2012.....	82
TABELA 10.	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística ( <i>p</i> ) para os IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de acordo com o grau de colagenização. Campina Grande – PB, 2012.....	83
TABELA 11.	Tamanho da amostra, média±desvio-padrão, estatística <i>F</i> e significância estatística ( <i>p</i> ) para os IPs para o Bcl-2 nos revestimentos epiteliais dos espécimes de CGID, HGI e GS. Campina Grande – PB, 2012.....	87
TABELA 12.	Tamanho da amostra, média±desvio-padrão, estatística <i>F</i> e significância estatística ( <i>p</i> ) para os IPs para o Bcl-2 no revestimento epitelial de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Campina Grande – PB, 2012.....	88
TABELA 13.	Tamanho da amostra, média±desvio-padrão, estatística <i>t</i> , significância estatística ( <i>p</i> ) e intervalo de confiança (95%) para os IPs para o Bcl-2 no revestimento epitelial de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. Campina Grande – PB, 2012.....	89
TABELA 14.	Tamanho da amostra, média±desvio-padrão, estatística <i>t</i> , significância estatística ( <i>p</i> ) e intervalo de confiança (95%) para os IPs para o Bcl-2 no revestimento epitelial de acordo com o grau de vascularização do tecido conjuntivo. Campina Grande – PB, 2012....	90
TABELA 15.	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística ( <i>p</i> ) para os IPs para o Bcl-2 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de acordo com o grau de vascularização. Campina Grande – PB, 2012.....	92

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1.	Barra de erros da média +/- desvio padrão dos IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de CGID, HGI e GS. Campina Grande – PB, 2012.....	74
GRÁFICO 2.	Barra de erros da média +/- desvio padrão dos IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Campina Grande – PB, 2012.....	75
GRÁFICO 3.	Barra de erros da média +/- desvio padrão dos IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. Campina Grande – PB, 2012.....	76
GRÁFICO 4.	Barra de erros da média +/- desvio padrão dos IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de acordo com o grau de vascularização do tecido conjuntivo. Campina Grande – PB, 2012.....	77
GRÁFICO 5.	Box-plot relativo aos IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de CGID, HGI e GS. Campina Grande – PB, 2012.....	80
GRÁFICO 6.	Box-plot relativo aos IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. Campina Grande – PB, 2012.....	82
GRÁFICO 7.	Box-plot relativo aos IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de acordo com o grau de vascularização. Campina Grande – PB, 2012.....	83
GRÁFICO 8.	Box-plot relativo aos IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de acordo com o grau de colagenização. Campina Grande – PB, 2012.....	84
GRÁFICO 9.	Barra de erros da média +/- desvio padrão dos IPs para o Bcl-2 nos revestimentos epiteliais dos espécimes de CGID, HGI e GS. Campina Grande, PB – 2012.....	87
GRÁFICO 10.	Barra de erros da média +/- desvio padrão dos IPs para o Bcl-2 no revestimento epitelial de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Campina Grande, PB – 2012.....	88

GRÁFICO 11. Barra de erros da média +/- desvio padrão dos IPs para o Bcl-2 no revestimento epitelial de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. Campina Grande – PB, 2012.....	89
GRÁFICO 12. Barra de erros da média +/- desvio padrão dos IPs para o Bcl-2 no revestimento epitelial de acordo com o grau de vascularização do tecido conjuntivo. Campina Grande – PB, 2012.....	90
GRÁFICO 13. Box-plot relativo aos IPs para o Bcl-2 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de acordo com o grau de vascularização. Campina Grande – PB, 2012.....	93

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Fotomicrografias representativas das características histopatológicas observadas em GSs (A), CGIDs (B) e HGIs (C) (LSAB, 100×).....	70
FIGURA 2.	Positividade para o Ki-67 em células das camadas basal e parabasal do epitélio de revestimento de HGI (A) e GS (B) (LSAB, 100×).....	73
FIGURA 3.	Positividade para o Ki-67 em células das camadas basal e parabasal do epitélio de revestimento de CGID (A) e em célula mononucleada fusiforme (seta), dispersa em meio à MEC (B) (LSAB, 400×).....	79
FIGURA 4.	Positividade para o Bcl-2 em células da camada basal do epitélio de revestimento de HGI (A) e CGID (B) (LSAB, 400×).....	85
FIGURA 5.	Positividade para o Bcl-2 em células da camada basal do epitélio de revestimento de GS (seta) (A) e em célula mononucleada fusiforme (seta), dispersa em meio à MEC (B) (LSAB, 400×).....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Do inglês <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> , traduzido como síndrome da imunodeficiência adquirida.
AIF	Do inglês <i>apoptosis inducing factor</i> , traduzido como fator indutor da apoptose.
ATP	Adenosina trifosfato.
Bak	Do inglês <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i> , refere-se à proteína Bak.
Bcl-2	Do inglês <i>B-cell CLL/ lymphoma 2</i> , refere-se à proteína Bcl-2.
Bcl-xL	Do inglês <i>B-cell lymphoma-extra large</i> , refere-se à proteína Bcl-xL.
BCC	Bloqueador de canais de cálcio.
CSA	Ciclosporina A.
CGID	Crescimento gengival induzido por drogas.
CTGF	Do inglês <i>connective tissue growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento do tecido conjuntivo.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
FGF	Do inglês <i>fibroblast growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento de fibroblastos.
GAG	Glicosaminoglicano.
GS	Gengiva saudável.
HGI	Hiperplasia gengival inflamatória.
IGF	Do inglês <i>insulin-like growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento semelhante à insulina.
IL	Interleucina.
LPS	Lipopolissacarídeo.
MEC	Matriz extracelular.
MMP	Do inglês <i>matrix metalloproteinase</i> , traduzido como metaloproteinase de matriz.
PDGF	Do inglês <i>platelet derived growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento derivado de plaquetas.
P53	Do inglês <i>protein 53</i> , refere-se à proteína P53.
TGF	Do inglês <i>transforming growth factor</i> , traduzido como fator transformador de crescimento.

TIMP Do inglês *tissue inhibitor of metalloproteinase*, traduzido como inibidor tecidual de metaloproteinase.

TNF Do inglês *tumor necrosis factor*, traduzido como fator de necrose tumoral.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b> 21
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b> 24
2.1	CRESCIMENTO GENGIVAL..... 24
2.2	HIPERPLASIA GENGIVAL INFLAMATÓRIA..... 25
2.3	CRESCIMENTO GENGIVAL INDUZIDO POR DROGAS..... 26
<b>2.3.1</b>	<b>Etiopatogenia e fatores de risco.....</b> 27
<b>2.3.2</b>	<b>Características clínicas.....</b> 32
<b>2.3.3</b>	<b>Características histopatológicas.....</b> 34
<b>2.3.4</b>	<b>Tratamento.....</b> 36
2.4	DROGAS INDUTORAS DE CRESCIMENTO GENGIVAL..... 39
<b>2.4.1</b>	<b>Drogas imunossupressoras.....</b> 39
2.4.1.1	<i>Ciclosporina A.....</i> 42
<b>2.4.2</b>	<b>Drogas bloqueadoras de canais de cálcio.....</b> 45
2.4.2.1	<i>Nifedipina.....</i> 46
<b>2.4.3</b>	<b>Drogas anticonvulsivantes.....</b> 48
2.4.3.1	<i>Fenitoína.....</i> 49
2.5	PROLIFERAÇÃO CELULAR..... 51
<b>2.5.1</b>	<b>Marcador de proliferação celular: proteína Ki-67.....</b> 52
<b>2.5.2</b>	<b>Estudos envolvendo a proteína Ki-67 e o CGID.....</b> 52
2.6	APOPTOSE CELULAR..... 53
<b>2.6.1</b>	<b>Marcador apoptótico: proteína Bcl-2.....</b> 55
<b>2.6.2</b>	<b>Estudos envolvendo a proteína Bcl-2 e o CGID.....</b> 56
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b> 59
3.1	OBJETIVO GERAL..... 59
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 59
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b> 61
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS..... 61
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO..... 61
4.3	POPULAÇÃO..... 61

4.4	AMOSTRA.....	61
4.4.1	<b>Critérios de inclusão.....</b>	62
4.4.2	<b>Critérios de exclusão.....</b>	62
4.5	ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO.....	62
4.6	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	64
4.6.1	<b>Método imuno-histoquímico.....</b>	64
4.6.2	<b>Análise imuno-histoquímica.....</b>	66
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
5	<b>RESULTADOS.....</b>	69
5.1	RESULTADOS HISTOMORFOLÓGICOS.....	69
5.2	RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS.....	72
5.2.1	<b>Análise da expressão da proteína Ki-67.....</b>	72
5.2.2	<b>Análise da expressão da proteína Bcl-2.....</b>	84
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	95
7	<b>CONCLUSÕES.....</b>	103
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	105
	<b>ANEXO.....</b>	

## ***INTRODUÇÃO***

---

## 1 INTRODUÇÃO

Os tecidos periodontais permanecem constantemente em uma situação de injúria e reparo. O crescimento gengival corresponde a qualquer condição clínica na qual ocorre um aumento no tamanho da gengiva, sendo causada por uma variedade de estímulos, sejam eles locais ou sistêmicos (PEREZ et al., 2004; CORRÊA et al., 2011). Esses múltiplos fatores incluem inflamação, doenças sistêmicas e neoplasias, podendo ser idiopático, secundário a uma deficiente higiene bucal, ao uso de medicamentos, a condições genéticas ou a outros estados fisiológicos específicos, como a gravidez (KHERA, ZIRWAS, ENGLISH, 2005; CHANG, YANG, LAI, 2012).

O crescimento gengival induzido por drogas (CGID) é um efeito colateral da administração de alguns medicamentos, tais como anticonvulsivantes, imunossupressores e bloqueadores de canais de cálcio (BCCs) (CONDÉ et al., 2009; CHANG, YANG, LAI, 2012). A ciclosporina A (CSA), a fenitoína e a nifedipina são as drogas que produzem alterações mais significativas em termos de prevalência e severidade do crescimento gengival, embora continuem a representar a primeira escolha na prevenção da rejeição de transplantes, na prevenção de convulsões epiléticas e no tratamento da hipertensão, respectivamente (BUDUNELI et al., 2007; SOUSA, NAVARRO, SPOSTO, 2011).

Desde o primeiro relato de CGID por Kimbal, em 1939, vários estudos têm sido realizados na tentativa de compreender os fatores que atuam sobre esse processo (SOUSA, NAVARRO, SPOSTO, 2011). Clínica e histologicamente o crescimento gengival induzido por diferentes fármacos é indistinguível, mostrando prevalências diferentes entre os agentes, todavia, permanece desconhecido porque drogas com ações farmacológicas diferentes induzem crescimentos gengivais similares (BUDUNELI et al., 2007; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009).

Os tecidos gengivais são submetidos a situações de injúria, reparo e remodelação. Esses eventos são regulados por citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, tais como interleucina (IL) e prostaglandina, produzidos por células inflamatórias, como macrófagos e linfócitos e, em menor extensão, por fibroblastos (CORRÊA et al., 2011).

Para manter a arquitetura normal do epitélio gengival, os eventos em série de crescimento, diferenciação e morte são estritamente modulados. Esse fenômeno de homeostase tissular envolve a integração entre a diferenciação epitelial e a apoptose, num

equilíbrio entre a proliferação e a morte celulares (SHIMIZU et al., 2002; BUDUNELI et al., 2003).

Acredita-se que o CGID constitui uma alteração histomorfológica resultante dos efeitos adversos da medicação sobre os fibroblastos e a matriz extracelular (MEC) (SOUSA, NAVARRO, SPOSTO, 2011). Foi proposto que determinadas drogas poderiam reagir com uma subpopulação fenotipicamente distinta de fibroblastos gengivais, estimulando a sua proliferação e a síntese de proteínas (BUDUNELI et al., 2007).

Embora a etiopatogenia do CGID não seja conhecida definitivamente, tal desordem parece ser induzida pelo rompimento da homeostase entre a síntese e a degradação de colágeno e outros componentes da MEC (CHANG, YANG, LAI, 2012), bem como entre os fenômenos de proliferação e apoptose celulares envolvendo o epitélio e o tecido conjuntivo gengivais.

Considerando que o desequilíbrio entre a apoptose e a proliferação celulares parece exercer um importante papel na patogênese do CGID, o presente estudo se propôs a avaliar a expressão imuno-histoquímica das proteínas Ki-67 e Bcl-2 e a sua relação com as características histomorfológicas em CGIDs e hiperplasias gengivais inflamatórias (HGIs), em comparação com espécimes de gengiva saudável (GS).

***REVISÃO DE LITERATURA***

---

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CRESCIMENTO GENGIVAL

O crescimento gengival compreende qualquer condição clínica na qual é observado um aumento do tamanho da gengiva, representando uma característica comum da doença gengival (MARAKOGLU et al., 2004; MUKHOPADHYAY, 2009; CORRÊA et al., 2011). A terminologia aceita atualmente para essa condição é alargamento gengival ou crescimento gengival, que são termos estritamente descritivos clínicos (MUKHOPADHYAY, 2009). Portanto, o crescimento gengival nem sempre está vinculado a uma alteração da quantidade de células do tecido (hiperplasia), podendo ser consequência de uma alteração no volume dos constituintes celulares (hipertrofia) ou ainda da MEC, quando não ocorre uma associação desses acontecimentos (SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). Porém, de acordo com Buduneli et al. (2007), essas lesões proliferativas nem representam uma hipertrofia celular nem uma hiperplasia.

Hiperplasia é o termo histológico usado para descrever um aumento no tamanho de um tecido ou um órgão, produzido pelo aumento do número de componentes celulares e representa uma resposta à demanda funcional, resultando em células capazes de promover divisões mitóticas quando estimuladas a intensificar suas atividades (MARAKOGLU et al., 2004; PEREZ et al., 2004). Por sua vez, o termo hipertrofia é o aumento do tamanho de um órgão ou tecido em consequência do aumento do tamanho de seus componentes celulares individuais. Dessa maneira, um organismo hipertrofiado não tem células novas, mas sim células maiores. O aumento no volume celular ocorre devido a uma síntese dos componentes ultraestruturais em maior número, por exemplo, o acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs) no tecido conjuntivo gengival. Assim, a hipertrofia e a hiperplasia estão bem correlacionadas e, muitas vezes, desenvolvem-se concomitantemente (AUAD, QUIRINO, 2000).

Há muitos tipos de crescimentos gengivais, que variam de acordo com a etiopatogenia, sendo causados por uma multiplicidade de estímulos (MARAKOGLU et al., 2004; CORRÊA et al., 2011). Os crescimentos gengivais representam uma resposta exacerbada do tecido gengival a condições de etiologia variada, sejam elas locais ou sistêmicas (PEREZ et al., 2004). O crescimento gengival pode estar associado à ingestão de drogas, ser idiopático, isto é, sem uma causa extrínseca aparente ou ainda ser resultante de um componente hereditário, como é o caso da fibromatose gengival hereditária – condição rara que é transmitida aos

descendentes por um gene autossômico de caráter dominante ou recessivo. As neoplasias malignas, como as leucemias, também se manifestam na cavidade bucal como um crescimento gengival generalizado (LISBOA, 2004; PEREZ et al., 2004).

Dentre as doenças periodontais, o crescimento gengival de origem inflamatória é causado pela presença de biofilme dental e irritantes locais, como o cálculo dentário, sendo frequentemente chamado de HGI, enquanto que o crescimento gengival de origem não inflamatória é produzido por outros fatores (LISBOA, 2004; MARAKOGLU et al., 2004; MUKHOPADHYAY, 2009). Vale ressaltar que mudanças hormonais durante a puberdade e a gravidez, o uso de certos medicamentos e o uso de aparelho ortodôntico podem resultar em crescimento gengival (GURSOY et al., 2007; MUKHOPADHYAY, 2009).

Com relação ao uso de medicamentos, sabe-se que algumas drogas ministradas sistemicamente podem afetar os tecidos periodontais de proteção, modificando a resposta inflamatória e imunológica (SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). Tais drogas podem afetar a composição do biofilme, o metabolismo dos tecidos gengival e ósseo, o fluxo e a composição do fluido gengival e a secreção da saliva (PEREZ et al., 2004).

## 2.2 HIPERPLASIA GENGIVAL INFLAMATÓRIA

A HGI é considerada o mais frequente dos processos proliferativos reacionais não neoplásicos (PEDRON et al., 2009). Geralmente, esta condição está relacionada a fatores irritantes crônicos de baixa intensidade, como por exemplo, em decorrência da presença de doenças periodontais, como consequência do acúmulo de cálculos e biofilme dentários, assim como da própria inflamação e infecção gengivais (CARRANZA, NEWMAN, TAKEI, 2007). Além disso, pode-se citar a presença de outros fatores irritantes locais, como próteses mal adaptadas, aparelhos ortodônticos e bordas de restaurações excessivas, sendo ainda relatada a possibilidade da resposta não usual do hospedeiro frente ao irritante local ser exacerbada por alterações hormonais (CARRANZA, NEWMAN, TAKEI, 2007; PEDRON et al., 2009).

Os processos proliferativos na gengiva de origem inflamatória caracterizam-se, geralmente, pelo aumento de tecido gengival, que emergem da papila interdentária ora bem delimitados como nódulos ora difusos como massas teciduais (PEDRON et al., 2009). No estágio inicial, a gengiva inflamada apresenta consistência flácida, superfície lisa e brilhante, coloração eritematosa, aspecto edematoso, com sangramento ao toque e durante o atrito da mastigação, do uso da escova e do fio dental (OLIVEIRA et al., 2005; KHERA, ZIRWAS, ENGLISH, 2005; CARRANZA, NEWMAN, TAKEI, 2007). Nos estágios mais avançados,

apresenta consistência fibrosa, coloração rósea, sintomatologia variável e perda do aspecto de normalidade da superfície (casca de laranja), podendo exibir ainda a superfície ulcerada, sob trauma de oclusão (CARRANZA, NEWMAN, TAKEI, 2007; PEDRON et al., 2009).

Tais alterações gengivais são mais comuns no gênero feminino em decorrência dos níveis elevados de progesterona na gestação ou à utilização de contraceptivos orais; assim como em pacientes com doenças sistêmicas, como o diabetes mellitus; déficit do estado nutricional (proteínas, ácido fólico e zinco); respiração bucal; e tabagistas (KHERA, ZIRWAS, ENGLISH, 2005; NEVILLE et al., 2009; PEDRON et al., 2009).

O quadro histopatológico da HGI é caracterizado por um epitélio pavimentoso estratificado paraceratinizado que emite projeções em direção ao tecido conjuntivo. A lâmina própria é constituída por tecido conjuntivo denso, bem celularizado e colagenizado, permeado por um intenso infiltrado inflamatório crônico mononuclear. Áreas de fibrose, hiperemia, edema e hemorragia podem ainda estar presentes (NEVILLE et al., 2009; PEDRON et al., 2009). Encontram-se acentuadas alterações na rede de vasos sanguíneos, capilares e também na população leucocitária. Células inflamatórias como linfócitos, macrófagos e neutrófilos são possíveis de serem detectadas. O progresso da doença periodontal é caracterizado por um infiltrado inflamatório crônico, onde os linfócitos T e B juntamente com os plasmócitos são as células predominantes (SILVEIRA, ALVES, 2009).

Diversas modalidades de tratamentos foram sugeridas. Primeiramente, deve-se iniciar pela remoção dos fatores causais através do tratamento periodontal básico, que inclui sessões de raspagem, alisamento e polimento corono-radiculares e orientação de higiene bucal (CARRANZA, NEWMAN, TAKEI, 2007). Tratamentos cirúrgicos diversificados também são preconizados, como a excisão total da lesão. Esse procedimento pode ser realizado através da técnica de gengivectomia em dois passos, utilizando-se a eletrocoagulação seguida de procedimentos de raspagem e alisamento radiculares. No caso da presença de bolsa periodontal, com perda de inserção, há necessidade da realização da técnica do retalho, além de uma rigorosa curetagem na base da lesão, com o intuito de evitar a recorrência (CARRANZA, NEWMAN, TAKEI, 2007; PEDRON et al., 2009).

### 2.3 CRESCIMENTO GENGIVAL INDUZIDO POR DROGAS

Dentre os efeitos adversos provocados por medicamentos de uso sistêmico, é de fundamental interesse na Odontologia o crescimento gengival, sendo por isso chamado de CGID (PIRES, LAGES, 2003; FONSECA et al., 2010).

A razão da localização desse efeito na gengiva é desconhecida. Acredita-se que é possível que o tecido gengival esteja exposto a concentrações mais altas dessas drogas do que os outros tecidos, ora através da corrente sanguínea ora a partir da cavidade oral por meio do epitélio crevicular (DAS, PARKAR, OLSEN, 2001). Em geral, a presença de dente, de uma fenda gengival e do biofilme é essencial para gerar o CGID, sugerindo que a presença do fluido crevicular gengival pode ser importante para o crescimento da gengiva (SATO et al., 2005).

No sistema atual de classificação das doenças periodontais, o CGID foi classificado dentro do grande grupo de doenças gengivais induzidas por biofilme. Dessa forma, seu desenvolvimento e sua severidade foram apontados como sendo influenciados pelo acúmulo de biofilme (CORRÊA et al., 2011).

O CGID é uma preocupação fundamental na prática clínica uma vez que, a depender de sua severidade, poderá causar problemas funcionais, como na mastigação; estéticos, através de uma aparência desagradável; e fonéticos, em decorrência dos problemas de erupção dentária, independentemente das dosagens e das concentrações das drogas (OLIVEIRA et al., 2003; RAMALHO et al., 2003; GURKAN et al., 2009). Além disso, tal condição patológica está se tornando um problema muito mais frequente em virtude do grande número de pessoas que vem se tratando com determinadas drogas que causam o crescimento gengival, em função do aumento das prescrições (DAS, PARKAR, OLSEN, 2001; CORRÊA et al., 2005).

Atualmente, três categorias de drogas estão associadas ao crescimento gengival, incluindo os imunossupressores, os BCCs e os anticonvulsivantes (OLIVEIRA et al., 2003; RAMALHO et al., 2003; PEREZ et al., 2004; TAMAMORI et al., 2005; KATAOKA et al., 2005; CORRÊA et al., 2005; CONDÉ et al., 2011). Várias drogas induzem o crescimento gengival, entretanto a fenitoína, a ciclosporina e a nifedipina produzem alterações significativas em termos de prevalência e severidade dessa doença (SOUSA, NAVARRO, SPOSTO, 2011). Ressalta-se que drogas com estruturas químicas e indicações terapêuticas diversas são capazes de induzir crescimentos gengivais semelhantes sob o ponto de vista clínico e histológico (PEREZ et al., 2004; CASTRO, 2006).

### **2.3.1 Etiopatogenia e fatores de risco**

O exato mecanismo da patogênese do CGID permanece obscuro, apesar de existirem várias teorias com relação à etiologia dessa alteração (DAS, PARKAR, OLSEN, 2001; PIRES, LAGES, 2003; PEREZ et al., 2004; SPOLIDORIO et al., 2005; BUDUNELI et al.,

2007; GURKAN et al., 2009). O crescimento gengival tem sido associado à presença de uma subpopulação geneticamente determinada de fibroblastos sensíveis à droga, que culmina no aumento do seu número em virtude de um metabolismo diferente e uma atividade proliferativa anormal, quando comparados aos fibroblastos de gengivas saudáveis, ou ao aumento no volume de colágeno extracelular devido ao aumento de sua síntese ou à diminuição de sua degradação ou ambos (PIRES, LAGES, 2003; PEREZ et al., 2004; SPOLIDORIO et al., 2005).

O CGID ocorre provavelmente como consequência de um distúrbio no equilíbrio homeostático entre a síntese e a degradação das moléculas da MEC; de uma interferência na razão da proliferação de fibroblastos; ou da acumulação de fibroblastos pela inibição da apoptose, prolongando assim a vida da célula (SPOLIDORIO et al., 2005; BULUT, OZDEMIR, 2007; CORRÊA et al. 2011).

Niimi et al. (1990) relataram que a proliferação epitelial não aumenta no CGID, especulando, portanto, que o que ocorre é um prolongamento da vida dos ceratinócitos, resultando no espessamento do epitélio gengival.

Sugere-se ainda que a interação entre a droga e os fibroblastos gengivais é cálcio-dependente, uma vez que as drogas que afetam o metabolismo intracelular de cálcio ou o seu transporte podem estimular fibroblastos gengivais (SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). Além disso, acredita-se que as drogas indutoras do crescimento gengival, pelo mesmo mecanismo de ação de inibição do fluxo de cálcio para o interior das células, podem provocar uma redução da secreção da collagenase, diminuindo a degradação do colágeno e, por conseguinte, promovendo o crescimento gengival (LISBÔA, 2004).

As reações inflamatórias que ocorrem na gengiva resultam da interação entre as drogas, os fibroblastos e o biofilme. As drogas podem influenciar diretamente a resposta inflamatória, afetando naturalmente o infiltrado celular e a produção de várias citocinas, prostaglandinas e fatores de crescimento que podem refletir no controle da matriz de colágeno, alterando a sua síntese e a função proliferativa dos fibroblastos gengivais e das células epiteliais, sendo tais proliferações celulares responsáveis pelo aumento de volume do tecido gengival (DAS, PARKAR, OLSEN, 2001; PIREZ, LAGES, 2003; CASTRO, 2006). Todos esses fatores são de fundamental importância para a fisiopatologia do crescimento gengival (DAS, PARKAR, OLSEN, 2001).

O papel do biofilme na indução da inflamação gengival reflete os diferentes efeitos dos lipopolissacarídeos (LPSs) bacterianos sobre o tecido gengival, podendo ser este, o LPS, um importante componente das células bacterianas responsável pela ação citotóxica sobre os

fibroblastos gengivais. Além disso, a irritação tecidual pode provocar proliferação dos elementos fibrosos dos tecidos gengivais, que pode ser acentuada por algum fator predisponente sistêmico (PIRES, LAGES, 2003).

A etiopatogenia do CGID apresenta um componente multifatorial (AUAD, QUIRINO, 2000; SOUSA, NAVARRO, SPOSTO, 2011). As diferenças na resposta gengival do uso de drogas que causam crescimento ocorrem devido ao amplo número de variáveis inter e intra-pacientes, sendo a incidência e a severidade dependentes da interação de vários fatores (ROMITO et al., 2003; LISBÔA, 2004).

As variáveis demográficas que têm sido identificadas como fatores de risco para o CGID incluem: a idade e o gênero (PIRES, LAGES, 2003; OLIVEIRA et al., 2003; ROMITO et al., 2003; LISBÔA, 2004; MARAKOGLU et al., 2004; FONSECA et al., 2010; COTA et al., 2010; SOUSA, NAVARRO, SPOSTO, 2011). Os indivíduos jovens são mais susceptíveis ao crescimento gengival do que os adultos, pois as alterações do metabolismo andrógeno podem estar ligadas a essa predisposição. Dessa forma, crianças e adolescentes apresentam um aumento do metabolismo dos fibroblastos ou mudanças hormonais comuns nessa faixa etária, que explicariam a frequência maior de tal condição patológica (CONDÉ et al., 2011). Já a questão hormonal justifica o fator gênero, uma vez que, nas mulheres, os níveis de progesterona são maiores e tal hormônio causa um decréscimo na síntese de GAGs que, por sua vez, se encontram aumentados no crescimento gengival. Sendo assim, a progesterona reduz a severidade do crescimento, fazendo com que no homem essa condição seja mais acentuada (OLIVEIRA et al., 2003). Em modelos experimentais em ratos, foi sugerido também que machos são mais susceptíveis ao crescimento gengival devido, possivelmente, aos níveis de progesterona serem menores do que em fêmeas (CONDÉ et al., 2011). No estudo de Thomas et al. (2000), com pacientes transplantados renais, os quais fazem uso da ciclosporina, foi constatado que não houve uma correlação entre o sexo, a idade e o crescimento gengival.

Quanto às variáveis farmacológicas, pode-se citar: a dose, a duração da terapêutica; a concentração sérica, plasmática e salivar; os metabólitos da droga e a associação de medicações (AUAD, QUIRINO, 2000; DAS, PARKAR, OLSEN, 2001; PIRES, LAGES, 2003; OLIVEIRA et al., 2003; ROMITO et al., 2003; LISBÔA, 2004; MARAKOGLU et al., 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; COTA et al., 2010; FONSECA et al., 2010).

As concentrações elevadas da droga no tecido gengival podem iniciar ou potencializar as mudanças gengivais (LISBÔA, 2004). Além disso, a identificação da droga e a duração da dose vão determinar o grau de inflamação, a fibrose e a celularidade (BUDUNELI et al.,

2007). Há evidências de que as concentrações das drogas nos tecidos gengivais interagem com mediadores químicos inflamatórios, estimulando a atividade dos fibroblastos, levando assim a um desequilíbrio da homeostase local, que eventualmente resulta na observação clínica de crescimento gengival. Contudo, provavelmente, a severidade do crescimento gengival não tem sido adequadamente correlacionada às variáveis farmacológicas porque os eventos que determinam o crescimento gengival dependem mais dos fatores locais do que dos níveis de circulação plasmática da droga (SOUSA, NAVARRO, SPOSTO, 2011).

Com relação aos fatores locais, pode-se incluir como variável periodontal capaz de influenciar o crescimento gengival, o biofilme dental que pode ser considerado um reservatório para a droga, perpetuando assim o crescimento gengival como consequência do aumento da retenção desse biofilme em bolsas gengivais (PIRES, LAGES, 2003; OLIVEIRA et al., 2003; LISBÔA, 2004; TAMAMORI et al., 2005; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; FONSECA et al., 2010; CONDÉ et al., 2011; SOUSA, NAVARRO, SPOSTO, 2011; TAKEUCHI et al., 2011). Entretanto, como grande parte das evidências foi compilada de estudos cruzados, permanece a dúvida se o biofilme é um fator contribuinte ou uma consequência das alterações gengivais (SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009).

O acúmulo de biofilme é consequência de outro fator de risco, que é a má higiene bucal resultando na inflamação gengival, a qual, por sua vez, exacerba o aumento de volume da gengiva (PIRES, LAGES, 2003; MARAKOGLU et al., 2004; LISBÔA, 2004; PEREZ et al., 2004; TORREZAN et al., 2005; TAMAMORI et al., 2005; BUDUNELI et al., 2007; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; SOUSA, NAVARRO, SPOSTO, 2011; CONDÉ et al., 2011; TAKEUCHI et al., 2011).

A correlação entre o crescimento gengival e má higiene bucal é positiva e significativa. Na observação dos pacientes com excelente higiene bucal, o crescimento gengival encontra-se reduzido ou ausente e, por esse motivo, o crescimento gengival mais evidente ocorre nas regiões com má higiene bucal (AUAD, QUIRINO, 2000; PEREZ et al., 2004). A higiene bucal não só determina o grau de inflamação, como também a fibrose e a celularidade (BUDUNELI et al., 2007).

A atividade inflamatória local ainda pode agir como fator modificador da concentração tecidual do medicamento e, dessa forma, um maior comprometimento periodontal poderá ocorrer devido a uma maior concentração da droga resultante da hiperemia inflamatória na gengiva (TORREZAN et al., 2005).

Vale ressaltar também como variáveis periodontais, a habilidade do paciente para um controle adequado do biofilme, a presença de cálculo, a extensão da destruição periodontal e o

número de dentes presentes (AUAD, QUIRINO, 2000; OLIVEIRA et al., 2003; PIRES, LAGES, 2003; ROMITO et al., 2003; LISBÔA, 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; COTA et al., 2010). Entretanto, a influência individual de cada um desses fatores ainda é desconhecida e até hoje nenhuma associação foi estabelecida. Pode-se incluir ainda outras variáveis, tais como: condições sistêmicas, ativação das citocinas induzidas por drogas e fatores genéticos (ROMITO et al., 2003; PIRES, LAGES, 2003; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; FONSECA et al., 2010; SOUSA, NAVARRO, SPOSTO, 2011; CONDÉ et al., 2011).

Existem fortes evidências de que as citocinas e os fatores de crescimento estão envolvidos na patogênese do crescimento gengival (COTA et al., 2010). Algumas citocinas e fatores de crescimento foram encontrados em níveis elevados nos tecidos com crescimento gengival, incluindo especialmente a IL-6, assim como também a IL-1, o fator de crescimento derivado de plaquetas  $\beta$  (PDGF- $\beta$ ), o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), o fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) (CORRÊA et al., 2011).

A IL-6, uma citocina pró-inflamatória, é conhecida não apenas por mediar sinais importantes na inflamação gengival, como também por exercer um importante papel na patogênese do crescimento gengival (KIM et al., 2002). A IL-6 parece influenciar os eventos fibrogênicos do CGID, sendo os fibroblastos as células-alvo, estimulando tanto a proliferação fibroblástica como exercendo uma regulação positiva sobre o colágeno e a síntese de GAGs (COTA et al., 2010).

Os fatores de crescimento são polipeptídeos que podem agir local ou sistemicamente, regulando importantes eventos celulares como: diferenciação celular, quimiotaxia, proliferação e síntese de MEC. O PDGF está envolvido em inúmeros eventos biológicos, incluindo aumento da vascularização tissular, quimiotaxia, aumento do número de células produtoras de colágeno, estímulo da produção de tecido de granulação, entre outros (TOFFANI, MELLO, CURY, 2011).

Os fibroblastos podem ser ativados por uma ampla variedade de mediadores biológicos. Citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo o fator de necrose tumoral (TNF) e fatores de crescimento, a exemplo do PDGF, FGF, TGF e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) são liberados por células epiteliais, macrófagos, plaquetas, células endoteliais e fibroblastos, no periodonto inflamado. Os efeitos desses agentes têm sido largamente estudados e incluem o estímulo à proliferação e migração celulares e à síntese de proteínas da MEC. Esses mediadores biológicos induzem uma cascata de sinais intracelulares em

fibroblastos que podem alterar a atividade de síntese, o pH intracelular, o transporte de precursores biossintéticos e a expressão gênica (RAWAL, WALTERS, 2005).

As respostas adversas do tecido gengival ao uso de determinadas drogas, encontradas dentro de uma determinada população, também ocorre devido à predisposição genética, uma vez que há variações na susceptibilidade do crescimento gengival e diferenças nas respostas individuais (ROMITO et al., 2003; COTA et al., 2010). Essa susceptibilidade individual que deriva de fatores genéticos e influências ambientais determina o grau de inflamação, a fibrose, a celularidade e a presença de uma subpopulação, geneticamente determinada, de fibroblastos sensíveis à droga (PEREZ et al., 2004; BUDUNELI et al., 2007).

Através do polimorfismo genético, ocorre uma variação na produção de citocinas e receptores celulares, resultando em expressão alterada ou alterações funcionais das moléculas codificadas, que possivelmente aumentam a susceptibilidade individual à determinada doença ou até mesmo a severidade dessa doença (COTA et al., 2010).

Enquanto muitos estudos têm mostrado um certo grau de associação entre o crescimento gengival e diferentes variáveis, outros não conseguiram demonstrar associações significativas (COTA et al., 2010).

### **2.3.2 Características clínicas**

O crescimento gengival induzido por diferentes fármacos é virtualmente indistinguível (SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). A aparência clínica dos crescimentos gengivais é semelhante, mas exibe diferentes graus de inflamação e fibrose (SUME et al., 2010). A referida alteração representa um aumento macroscópico em volume e tamanho da gengiva, indolor, com aspecto lobular e irregular, sendo mais prevalente em crianças e adolescentes (MARAKOGLU et al., 2004; LISBÔA, 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009).

Para que as alterações do CGID iniciem ou se potencializem, é necessária uma concentração mínima do fármaco (SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). O aumento de volume tem início, em um paciente susceptível, entre um a três meses após o início da terapia com um padrão de desenvolvimento variado entre os indivíduos, mas alcança um “estado de equilíbrio” frequentemente após um ano de ingestão da medicação (RAMALHO et al., 2003; LISBÔA, 2004; PEREZ et al., 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; FONSECA et al., 2010; CONDÉ et al., 2011; CORRÊA et al., 2011).

O CGID afeta quase que exclusivamente indivíduos dentados, ressaltando o acometimento também ao redor de dentes decíduos e de implantes dentários, porém esse efeito colateral já foi relatado em pacientes edêntulos, mesmo tendo sido afirmado que áreas com ausência de dentes não são acometidas pelo crescimento gengival (LISBÔA, 2004; PEREZ et al., 2004; CONDÉ et al., 2011; CORRÊA et al., 2011).

Toda a arcada dentária pode ser afetada pelo crescimento gengival, mas o segmento anterior e a região mandibular parecem ser as áreas mais propensas ao desenvolvimento de tal condição (RAMALHO et al., 2003; LISBÔA, 2004; PEREZ et al., 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; FONSECA et al., 2010; CORRÊA et al., 2011). Todavia, a região superior também é citada como a mais acometida pelo crescimento gengival, sendo mais severa próxima aos caninos (PEREZ et al., 2004; CONDÉ et al., 2011).

O crescimento gengival é mais proeminente na superfície vestibular da gengiva do que na face lingual ou palatina, ficando restrito à largura da faixa de mucosa ceratinizada, sem se estender além da junção mucogengival, ou seja, sem envolver a mucosa alveolar (DAS, PARKAR, OLSEN, 2001; PIRES, LAGES, 2003; PEREZ et al., 2004; LISBÔA, 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; FONSECA et al., 2010).

O aumento gengival surge na papila interdentária, adquire uma aparência lobulada, aumenta de tamanho, ultrapassa os espaços interproximais e, finalmente, estende-se para a superfície dentária de forma localizada ou envolvendo toda a gengiva, nos estágios mais avançados, chegando, por vezes, a cobrir as coroas dos dentes. Dessa maneira, pode interferir na oclusão, na fonética, na mastigação, na estética e na higiene dental, resultando em um grande risco de infecção, que pode levar à septicemia e ao aumento do risco de cárie e de doença periodontal. Além disso, pode causar problemas psicológicos e induzir dificuldades nutricionais (DAS, PARKAR, OLSEN, 2001; RAMALHO et al., 2003; PEREZ et al., 2004; LISBÔA, 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; FONSECA et al., 2010; CONDÉ et al., 2011; CORRÊA et al., 2011).

A apresentação clínica do CGID varia de uma condição não-inflamatória, com consistência firme, aparência fibrosa e coloração rósea até uma condição de origem inflamatória, com aspecto amolecido, superfície brilhante e sem pontilhado, além de áreas edemaciadas, hiperêmicas ou cianóticas e com tendência ao sangramento espontâneo ou ao toque (DAS, PARKAR, OLSEN, 2001; RAMALHO et al., 2003; PIRES, LAGES, 2003; LISBÔA, 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; CONDÉ et al., 2011). Raramente há migração apical do epitélio juncional e, por isso, são criados pseudobolsas profundas quando o acúmulo de tecido continua. Tal crescimento dificulta a higiene bucal e,

dessa forma, o acúmulo do biofilme confere à hiperplasia gengival um aspecto hiperêmico, edematoso e hemorrágico (PEREZ et al., 2004). Sendo assim, é importante observar que a mudança no contorno gengival observada no CGID pode, pelo menos, ser exacerbada pela inflamação local, levando à formação de um tecido edematoso, que facilita o acúmulo de biofilme e perpetua o ciclo (SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009).

### **2.3.3 Características histopatológicas**

As características histopatológicas dos CGIDs não mostram diferenças em relação ao tipo de droga administrada (RAMALHO et al., 2003; PEREZ et al., 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). Essa alteração patológica constitui-se da presença de epitélio pavimentoso estratificado paraceratinizado, com um certo grau de hiperplasia, de espessura variável, resultado da excessiva proliferação epitelial (DAS, PARKAR, OLSEN, 2001; RAMALHO et al., 2003; PEREZ et al., 2004; BUDUNELI et al., 2007; TAKEUCHI et al., 2011). Além disso, são observados hiperplasia do epitélio juncional, hipertrofia do epitélio ceratinizado e cristas epiteliais alongadas, que penetram no tecido conjuntivo subepitelial, produzindo feixes irregulares de fibras colágenas (DAS, PARKAR, OLSEN, 2001; SHIMIZU et al., 2002; RAMALHO et al., 2003; PEREZ et al., 2004; BUDUNELI et al., 2007; SUME et al., 2010; CORRÊA et al., 2011; TAKEUCHI et al., 2011).

O grande aumento, em volume, do tecido gengival ocorre devido à grande expansão do compartimento de tecido conjuntivo, que apresenta como principal característica a fibroplasia e um acúmulo de componente colagenoso os quais apresentam características de síntese e secreção ativa de proteínas, com reduzida toxicidade ou mudanças degenerativas (PIRES, LAGES, 2003; PEREZ et al., 2004; TAKEUCHI et al., 2011). Todavia, ressalta-se que não há aumento na densidade relativa de fibroblastos e colágeno extracelular com relação à gengiva normal, sendo por isso considerado como um crescimento gengival (RAMALHO et al., 2003).

Ainda no tecido conjuntivo, podem ser encontradas as seguintes alterações: aumento numérico de fibroblastos especializados, chamados miofibroblastos, responsáveis pela produção elevada de colágeno, sendo esse colágeno bioquimicamente diferente daquele da gengiva normal, com duas vezes mais o tipo II e menos o tipo I; presença de densos feixes de fibras colágenas arranjadas irregularmente e entremeados por fibroblastos; presença abundante de substância fundamental amorfa; aumento significativo da MEC; e, por fim, fibrose da lâmina própria (SHIMIZU et al., 2002; RAMALHO et al., 2003; PIRES, LAGES,

2003; PEREZ et al., 2004; BUDUNELI et al., 2007; SOUZA, NAVARRO, SPOSTO, 2011; TAKEUCHI et al., 2011; CORRÊA et al., 2011).

Os fibroblastos gengivais constituem os principais tipos celulares encontrados no tecido conjuntivo, sendo responsáveis pela manutenção e reparo desse tecido e ainda desempenham um papel primordial no processo de crescimento da gengiva, por serem responsáveis pela produção e renovação da MEC (TAKEUCHI et al., 2011). Sabe-se que os fibroblastos, através da atividade de suas subpopulações, apresentam heterogeneidade funcional, tais como: maior potencial proliferativo, resposta aos fatores de crescimento, aumento dos níveis de colágeno e diminuição da colagenase ativa, síntese e secreção ativas de proteínas e respostas a vários agentes químicos (AUAD, QUIRINO, 2000; RAMALHO et al., 2003; CONDÉ et al., 2011).

A fibrose caracteriza-se pelo acúmulo de fibroblastos, colágeno e outros componentes da MEC e resulta dos processos de inflamação, remodelação e reparo dos tecidos simultaneamente (SUME et al., 2010). O reparo e a remodelação tecidual são regulados por citocinas e quimiocinas, tais como IL e prostaglandinas, produzidas por células inflamatórias como macrófagos e linfócitos e, em menor extensão, por fibroblastos (CORRÊA et al., 2011). Portanto, o crescimento gengival e a fibrose ocorrem como efeito colateral de medicações sistêmicas (SUME et al., 2010).

De acordo com Condé et al. (2011), o crescimento gengival induzido por diversos tipos de drogas é constituído, basicamente, por fibroplasia colágena associada à hiperplasia epitelial, sendo essa alteração, segundo Lisbôa et al. (2004), decorrente da ação dos metabólitos do medicamento sobre os componentes da MEC, aumentando a quantidade de colágeno, induzindo a proliferação dos fibroblastos e resultando no aumento gengival.

No CGID também são observadas manifestações secundárias da inflamação, como a elevada vascularização e a presença de um infiltrado inflamatório crônico (PIRES, LAGES, 2003; PEREZ et al., 2004; CONDÉ et al., 2011). Os fluidos e as proteínas exsudativas causam a tumefação dos tecidos, ocorrendo um influxo de células inflamatórias no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio juncional (DAS, PARKAR, OLSEN, 2001; PIRES, LAGES, 2003; RAMALHO et al., 2003). O infiltrado inflamatório é predominantemente mononuclear, representado por macrófagos, linfócitos e plasmócitos, sendo os leucócitos polimorfonucleares, especialmente os neutrófilos, observados em menor proporção (CONDÉ et al., 2011). Esse conjunto de alterações resulta em hiperemia e edema e o nível de infiltrado celular inflamatório varia significativamente (DAS, PARKAR, OLSEN, 2001; PIRES, LAGES, 2003; RAMALHO et al., 2003; CORRÊA et al., 2011).

### 2.3.4 Tratamento

A literatura apresenta condutas variadas para o tratamento do CGID (SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). Na anamnese, o paciente deve informar a ingestão diária de medicamentos, suas dosagens e o período de tempo que faz uso da medicação. O médico deve ser consultado para informar sobre a estabilidade da condição sistêmica do paciente, anterior a qualquer procedimento odontológico. Deve-se fornecer ao médico detalhes sobre o procedimento odontológico, com relação ao tempo de execução e à viabilidade da terapêutica (PEREZ et al., 2004).

O tratamento dentário deve ter como objetivo a eliminação dos fatores irritantes locais. As restaurações defeituosas devem ser substituídas, as cáries restauradas e as bandas ortodônticas removidas. Sempre que possível, as margens das restaurações devem ficar posicionadas na região supragengival, para favorecer a manutenção da saúde periodontal (PEREZ et al., 2004).

A primeira fase do tratamento começa com o controle efetivo do biofilme (AUAD, QUIRINO, 2000; PIRES, LAGES, 2003; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; CONDÉ et al., 2011). A instituição de um programa rígido de controle de biofilme, antes do início do tratamento com a droga, sempre que possível, pode resultar em diminuição tanto da incidência quanto da severidade do crescimento gengival (PEREZ et al., 2004). Essa conduta torna-se imprescindível, principalmente para os usuários de imunossuppressores, uma vez que se recomenda um programa de higiene bucal anterior às cirurgias de transplantes de órgãos (LISBÔA, 2004). Vale ressaltar ainda que os pacientes que fazem uso da droga anticonvulsivante nem sempre têm aptidões e interesse no controle do biofilme que, associado a fatores irritantes locais, agrava ainda mais a patologia gengival (PEREZ et al., 2004).

No caso do crescimento gengival já estar presente, o tratamento é necessário sempre que existir inflamação gengival, cárie dentária e interferência estética, fonética ou funcional (PIRES, LAGES, 2003; PEREZ et al., 2004). Portanto, o tratamento do crescimento gengival inclui a remoção de biofilme, a manutenção de uma higiene oral adequada e o monitoramento dos pacientes (PIRES, LAGES, 2003; PEREZ et al., 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; CONDÉ et al., 2011). Essas condutas têm o objetivo de eliminar o componente inflamatório e, embora não induzam a regressão nem previnam o crescimento gengival, diminuem a sua severidade e a incidência, evitando a sua recidiva e diminuindo a necessidade de remoção cirúrgica (PEREZ et al., 2004; LISBÔA, 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; CONDÉ et al., 2011).

Muitas vezes, cuidados como profilaxia profissional devem ser realizados frequentemente durante a administração da droga (SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). Além disso, a terapia periodontal conservadora pode incluir raspagem e alisamento radicular, seguidos sempre de instrução de higiene oral, reavaliando-se o caso após finalizar o controle do biofilme (AUAD, QUIRINO, 2000; PIRES, LAGES, 2003; PEREZ et al., 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009).

Podem ainda ser utilizados para o tratamento do CGID bochechos diários com clorexidina, que são particularmente importantes nos casos de pacientes que tomam fenitoína e que, muitas vezes, apresentam limitações físicas, mentais ou emocionais, não podendo assim realizar os meios convencionais de controle do biofilme de maneira eficaz (PEREZ et al., 2004).

Torna-se evidente que todo tratamento relacionado ao crescimento gengival deve estar também vinculado a um meticoloso controle de biofilme, que resulta em melhora nas condições de higiene oral, tendo como consequência a redução significativa do crescimento gengival, sem ser necessária excisão cirúrgica da gengiva marginal nem substituição da droga (SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). Porém, se a completa resolução do caso não for verificada mesmo com a motivação do paciente para o tratamento, deve-se contatar o médico do paciente a fim de substituir ou suspender os fármacos que apresentam o crescimento gengival como efeito colateral, tendo sido este apontado como o melhor e mais efetivo método para prevenir ou para tratar o CGID (LISBÔA, 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009).

A regressão do quadro e a melhora dos sinais clínicos ocorrem geralmente de forma espontânea em cerca de quatro semanas após cessar o uso da droga, associado a uma boa higiene bucal (MARAKOGLU et al., 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). Quando da substituição, a regressão espontânea do tecido em excesso pode ocorrer dentro de doze meses, se a higiene bucal do paciente for adequada (PEREZ et al., 2004).

A substituição do fármaco é uma alternativa para reduzir ou cessar o crescimento gengival, mas nem sempre é viável (LISBÔA, 2004). Quando possível, o tacrolimus e o sirolimus são os imunossupressores que podem substituir a ciclosporina, inclusive levando a uma rápida resolução do crescimento gengival, poucos meses após a substituição (PIRES, LAGES, 2003; LISBÔA, 2004; PEREZ et al., 2004; CONDÉ et al., 2011).

Com relação às drogas anticonvulsivantes, é particularmente difícil suspender a administração da fenitoína, devido à sua especificidade para o tratamento da epilepsia (TAMAMORI et al., 2005). No entanto, ela pode ser substituída, por exemplo, pela

carbamazepina ou pelo valproato de sódio, enquanto que uma alternativa para as drogas BCCs é a isradipina (PEREZ et al., 2004). A persistência do uso do medicamento levará frequentemente à recidiva (PIRES, LAGES, 2003).

Nos casos em que a substituição do medicamento não seja possível ou se mesmo após a mudança, o profissional observar somente regressão parcial, torna-se imprescindível o remodelamento gengival, por meio da intervenção cirúrgica corretiva (PIRES, LAGES, 2003; LISBÔA, 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). Essa conduta invasiva também é recomendada quando houver problemas de estética, fonação e função (LISBÔA, 2004).

A gengivectomia e a gengivoplastia são os primeiros procedimentos utilizados para a remoção do tecido gengival hiperplásico e são usualmente realizadas com bisturi e/ou gengivótomo (LISBÔA, 2004). A erradicação do excesso de tecido gengival também pode ser realizada por meio de eletrocirurgia ou *laser* de dióxido de carbono (PEREZ et al., 2004).

A gengivectomia nem sempre é viável, sendo indicado então o retalho periodontal, o qual é empregado quando o crescimento está associado a sítios com grandes profundidades de sondagem e perda de inserção. Nesses casos, o recontorno do tecido gengival é realizado durante a incisão (PEREZ et al., 2004). A gengivectomia também é contra-indicada para tratamentos de crescimentos gengivais graves pois, convencionalmente, essa técnica causa perda de tecido ceratinizado. Além disso, o pós-operatório ocorre com grande sangramento e a cicatrização por segunda intenção (PIRES, LAGES, 2003).

O resultado estético de qualquer procedimento cirúrgico pode ser frustrado pela ausência ou negligência de medidas de higiene e controle de biofilme no pós-operatório. Por esse motivo, manutenções periódicas são imperativas para o sucesso do procedimento cirúrgico. Os bochechos com clorexidina após a cirurgia podem ajudar a prevenir a recorrência da alteração (PEREZ et al., 2004).

As sucessivas recidivas são comuns nos casos de remoção cirúrgica do tecido hiperplasiado, podendo ser esperadas dentro de um a dois anos, principalmente em indivíduos com menos de 25 anos. A higiene bucal inadequada pode acelerar o quadro de recorrência (PEREZ et al., 2004; MARAKOGLU et al., 2004; CONDÉ et al., 2011).

Considerando que nos transplantados a função imunológica está comprometida, é obrigatório incluir profilaxia antibiótica na terapia periodontal desse grupo de pacientes. Os antibióticos de escolha são as penicilinas, incluindo a amoxicilina, as ampicilinas e as cefalosporinas. A profilaxia antibiótica com 2g de amoxicilina por via oral, uma hora antes do procedimento, é bastante utilizado (PEREZ et al., 2004).

Com relação à azitromicina, vários estudos demonstraram a eficácia desse antibiótico na regressão do crescimento gengival causado pela ciclosporina (LISBÔA, 2004; CONDÉ et al., 2011). A terapia com a azitromicina deve começar o mais precocemente possível, assim que surgirem os primeiros sinais do crescimento. O tratamento de cinco dias, com dose de 500 mg, é simples, barato, conservador e com rápida efetividade, evitando a cirurgia gengival, sugerindo que deva ser repetido a cada 8 a 12 meses a fim de evitar a recidiva. Condé et al. (2011) sugerem que os efeitos do antibiótico compreendem a ação bactericida, a redução da inflamação e da estimulação gengival e a supressão da síntese protéica pelos fibroblastos, inibindo a proliferação de colágeno.

Resultados significativos também foram obtidos com o uso de um dentifrício contendo azitromicina, duas vezes ao dia, durante quatro semanas, em pacientes transplantados que responderam, satisfatoriamente, ao uso tópico do antibiótico, mostrando-se uma alternativa terapêutica eficaz e segura, sem efeitos adversos para o paciente (CONDÉ et al., 2011).

Ainda foram citados na literatura outros antibióticos responsáveis pela regressão do aumento gengival, tais como: a roxitromicina, por cinco dias, e o metronidazol, 400 mg/dia durante sete dias, com regressão após três a quatro semanas (CONDÉ et al., 2011). A respeito de outras drogas, evidências clínicas sugerem uma terapêutica potencial de ácido fólico no crescimento gengival, ressaltando que o folato tópico inibe significativamente o aumento de volume, refletindo, dessa maneira, o efeito paliativo dessa droga em oposição ao papel preventivo que exerce (AYRA et al., 2011).

## 2.4 DROGAS INDUTORAS DE CRESCIMENTO GENGIVAL

### 2.4.1 Drogas imunossupressoras

O transplante é a transferência de células, tecidos ou órgãos vivos de um doador a um receptor a fim de manter a integridade funcional do material transplantado no receptor (GONDIM, 2009). Porém, uma vez que o principal obstáculo para a sua realização é a rejeição, que pode ser mediada por uma reação celular e/ou humoral, algumas drogas imunossupressoras foram introduzidas na terapêutica pós-transplante (COTA, 2009; GONDIM, 2009).

Os imunossupressores agem sobre alguns componentes importantes do sistema imune, causando inibição seletiva dos mecanismos de defesa, sem interferir nas outras ações do

sistema imunológico, tais como a defesa contra as infecções e a vigilância anti-câncer, mas promovendo a aceitação do enxerto (COTA, 2009; GONDIM, 2009).

O mecanismo de ação das drogas imunossupressoras consiste em inibir a produção e a liberação de linfocinas pelos linfócitos, particularmente a IL-2, que é a molécula-chave no desenvolvimento da resposta imune (OLIVEIRA et al., 2003). Ainda tem sido postulado que ela atua sobre os LPS, induzindo às atividades fibroblásticas, e que se liga a receptores endógenos intracelulares, como a ciclofilina, cujo complexo resultante atua sobre a fosfatase protéica e a calcineurina a fim de exercer o efeito imunossupressivo (AUAD, QUIRINO, 2000). Essas drogas agem seletivamente e de maneira reversível sobre os linfócitos T auxiliares e com pouca ou nenhuma ação sobre a resposta humoral mediada pelos linfócitos B, deixando o indivíduo parcialmente imunossuprimido (GARCIA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003).

Acredita-se que o mecanismo de ação das drogas imunossupressoras se baseia no bloqueio de canais de cálcio das células T auxiliares e sua efetividade ocorre devido à inibição específica e reversível de linfócitos imunocompetentes e à inibição da produção de anticorpos contra antígenos de células T-dependentes (PIRES, LAGES, 2003).

A busca por novos agentes imunossupressores e novas combinações de drogas mais ajustadas aos diferentes casos tornou-se um objetivo importante para a manutenção do transplante em longo prazo (COTA, 2009). Para tanto, os protocolos padrões vigentes do esquema imunossupressor de manutenção incluem três tipos de fármacos, cada um direcionado a uma localização na ativação dos linfócitos T ou na cascata de proliferação, que é fundamental no processo de rejeições, sendo eles: inibidores de calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus), uma droga anti-proliferativa (azatioprina, micofenolato mofetil ou sirolimus) e um corticosteróide (GONDIM, 2009).

Vale ressaltar que os imunossupressores também são utilizados no tratamento de diversas doenças auto-imunes, tais como o diabetes mellitus tipo I, a doença de Behcet, a psoríase, a esclerose múltipla, o líquen plano erosivo, o lúpus eritematoso sistêmico, o pênfigo bolhoso, a artrite reumatóide, a miastenia *gravis*, as uveítes e as diversas glomerulopatias, além da malária, da sarcoidose, do controle da síndrome da imunodeficiência adquirida e de várias outras doenças com uma base imunológica, assim como no tratamento de doenças inflamatórias crônicas (AUAD, QUIRINO, 2000; KIM et al., 2002; LISBÔA, 2004; PEREZ et al., 2004; SPOLIDORIO et al., 2005; GURKAN et al., 2009; CONDÉ et al., 2011).

Dentre os vários efeitos adversos provocados por esses medicamentos, pode-se citar: nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, hipertensão, hipertricose, tremores, hirsutismo, hiperestesia perioral transitória e fibrose de tecidos pulmonares, cardíacos e renais, além de distúrbios gastrointestinais, parestesia, convulsões, linfomas, sarcoma de kaposi, dor abdominal e náuseas (OLIVEIRA et al., 2003; PEREZ et al., 2004; LISBÔA, 2004; SPOLIDORIO et al., 2005; BULUT, OZDEMIR, 2007; CONDÉ et al., 2011).

Na cavidade oral, manifestam-se como efeitos colaterais das drogas imunossupressoras, especialmente da ciclosporina, as seguintes lesões bucais: linfomas, leucoplasias, carcinoma de células escamosas e candidose, sendo observada ainda predisposição para desenvolvimento de infecções bacterianas, fúngicas e virais, mucosites, herpes, úlceras, exacerbação aguda de doenças periodontais, além do crescimento gengival que é a condição patológica mais comum em pacientes transplantados que fazem uso crônico de medicação imunossupressora, especificamente da ciclosporina, tendo sido observado inicialmente por Rateitschak-Pluss et al. (1983), que tal condição patológica pode manifestar-se em várias intensidades, sempre na dependência de outros fatores, como o biofilme dental, que potencializa o efeito danoso dessa hiperplasia (AUAD, QUIRINO, 2000; KIM et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; LISBÔA, 2004; SPOLIDORIO et al., 2005; KATAOKA et al., 2005; COTA et al., 2010; CONDÉ et al., 2011).

O crescimento gengival está frequentemente presente em receptores de transplantes renais sob terapia de manutenção baseada na ciclosporina ou no tacrolimus, quando aplicados como o principal agente imunossupressivo. Entretanto, recentemente, esse indesejável efeito adverso foi também descrito em sujeitos transplantados sob regime baseado em sirolimus, estando nesse último caso dentro de um limiar clínico não significativo (COTA et al., 2010).

O tacrolimus ou FK 506 foi descoberto em 1984 e utilizado como opção terapêutica imunossupressora em 1987, sendo capaz de suprimir as respostas imunológicas humoral e celular, demonstrando eficácia comprovada como terapia primária e de resgate, representando ainda uma alternativa à ciclosporina, com ação mais potente e uso clínico crescente, sendo atualmente a droga base em mais de 80% dos transplantes hepáticos e 30% dos transplantes renais (COTA et al., 2010).

O aparecimento do CGID nesse grupo de receptores de transplante de órgãos sólidos representa um interesse dos profissionais de saúde bucal devido às complicações funcionais, estéticas e sistêmicas (COTA et al., 2010).

#### 2.4.1.1 *Ciclosporina A*

A CSA, droga inicialmente desenvolvida como um agente antifúngico, teve suas propriedades imunossupressoras descobertas por Borel et al., em 1977 (PEREZ et al., 2004). Seu primeiro estudo com a finalidade de evitar a rejeição de um transplante renal em humanos foi realizado em 1983 por Calne et al. e, nesse mesmo ano, Rateitschak-Plüss et al. relataram a ação dessa droga nos tecidos gengivais (AUAD, QUIRINO, 2000).

Ao observar que o uso da ciclosporina induzia um tipo de imunossupressão seletiva, expandindo sua indicação para tratamento de várias desordens imunológicas (LISBÔA, 2004), essa droga revolucionou o transplante de órgãos sólidos como tratamento de escolha (AUAD, QUIRINO, 2000; LISBÔA, 2004; SPOLIDORIO et al., 2005). Através de sua efetividade e ampla utilização, vem melhorando substancialmente a sobrevida de pacientes submetidos a transplantes cardíaco, renal, hepático, pancreático e pulmonar, reduzindo a morbidade e a mortalidade (LISBÔA, 2004; BULUT, ODZEMIR, 2007).

A dosagem de ciclosporina a ser administrada ao paciente requer ajustes individuais, sendo então necessário um monitoramento do seu nível sérico a fim de se obter o máximo de efeito imunossupressor com um mínimo de efeitos colaterais, ou seja, os efeitos colaterais apesar de frequentes, geralmente são dose-dependentes e respondem à sua redução (PEREZ et al., 2004).

A grande variação da prevalência do crescimento gengival induzido pela CSA nos resultados dos estudos se deve às diferentes técnicas e aos métodos empregados para mensurar o crescimento gengival. Contudo, a verdadeira incidência de crescimento gengival causado pela CSA é difícil de ser determinada porque os pacientes frequentemente recebem múltiplas terapias de drogas que podem contribuir para sua severidade (DAS, PARKAR, OLSEN, 2001).

A prevalência do crescimento gengival induzido pela ciclosporina é bastante ampla, variando de 8% a 85%, dependendo dos critérios usados no desenvolvimento do estudo (PIRES, LAGES, 2003; OLIVEIRA et al., 2003; PEREZ et al., 2004; LISBÔA, 2004; CONDÉ et al., 2009; CONDÉ et al., 2011). Porém, em estudos bem controlados, a prevalência pode variar de 20% a 40%, mantendo uma média de 30%, mas podendo chegar a 50% e 70%, sendo a prevalência em crianças e adolescente maior do que em adultos (PIRES, LAGES, 2003; ROMITO et al., 2003; LISBÔA, 2004; BUDUNELI et al., 2007; CONDÉ et al., 2009; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; CONDÉ et al., 2011).

A associação da CSA com outras drogas, como os BCCs, é frequente, uma vez que a CSA sintetiza uma enzima renina que interfere nos níveis da pressão arterial. Dessa forma, o efeito vasodilatador da nifedipina (importante BCC) previne a necrose do enxerto, uma vez que a CSA tem como efeito colateral a vasoconstrição (OLIVEIRA et al., 2003). Quando ocorre a associação de tais medicamentos, essa prevalência aumenta, assim como a sua severidade, potencializando o risco, chegando a uma incidência de 83% e, quando da sua associação com o diazepam, a 74% (PIRES, LAGES, 2003; CONDÉ et al., 2011).

A associação medicamentosa a fim de oferecer bem estar ao paciente, promove maior severidade do crescimento gengival, necessitando, portanto, de maiores cuidados, uma vez que há significativo comprometimento funcional e estético para os pacientes que utilizam dessa terapia combinada (OLIVEIRA et al., 2003).

Os mecanismos subjacentes de resposta do tecido gengival às medicações que induzem o crescimento gengival, a exemplo da CSA, ainda não são totalmente compreendidos (COTA et al., 2010; LISBÔA, 2004). Como apenas um subconjunto de indivíduos desenvolve essa condição, foi levantada a hipótese de que há um perfil de fibroblastos com uma susceptibilidade anormal (COTA et al., 2010).

Uma produção direta de GAGs pelos fibroblastos gengivais em resposta à CSA exerce uma atividade na patogênese do crescimento gengival. Além disso, existe uma larga variação da expressão genética e respostas diferentes para os sinais extra-celulares, resultando em uma variedade populacional de fibroblastos. Sabe-se que os fibroblastos não são todos produzidos igualmente e que, em momentos alternados, discretas subpopulações de fibroblastos podem emergir durante o desenvolvimento das lesões inflamatórias ou durante a reparação das feridas (AUAD, QUIRINO, 2000).

Têm sido investigados os efeitos diretos da CSA sobre o comportamento do fibroblasto e do colágeno, sugerindo-se que essa droga desempenha um papel modulador na atividade fibroblástica, aumentando a secreção de GAGs pelos fibroblastos, embora tal efeito seja dependente da densidade e da linhagem celular, visto que o crescimento ocorre em culturas de baixa densidade (CONDÉ et al., 2011). De acordo com Buduneli et al. (2007), os fibroblastos residentes na gengiva aumentada pela indução da CSA sugerem uma produção de colágeno e outras moléculas da MEC maior do que o normal.

A CSA inibe a fagocitose do colágeno bem como a síntese e a atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs) 1 e 3, podendo isso contribuir para o acúmulo de MEC no tecido gengival (KIM et al., 2002; LISBÔA, 2004).

Até o momento, ainda não está bem esclarecido se o aumento do tecido conjuntivo ocorre devido ao aumento no número de fibroblastos secretores de MEC, a um aumento da matriz produzida pelos fibroblastos, a uma redução na degradação da MEC ou, alternativamente, a uma combinação de todos os mecanismos (AUAD, QUIRINO, 2000).

Embora a patogênese do CGID seja incerta, tem sido postulado que a CSA altera a atividade dos fibroblastos através de efeitos sobre a produção de fatores de crescimento, tais como PDGF- $\beta$  e de citocinas, a exemplo da IL-6, visto que foram encontrados níveis aumentados de mRNA para ambos (PDGF- $\beta$  e IL-6) em indivíduos portadores de crescimento gengival (KIM et al., 2002). Um dos possíveis fatores de crescimento que podem estar relacionados ao aumento gengival induzido pela CSA é o fator de crescimento epidérmico, além do TGF- $\beta$ 1 (LISBÔA, 2004; SPOLIDORIO et al., 2005).

Um estudo, utilizando a técnica da imuno-histoquímica, demonstrou que todas as isoformas e os receptores do TGF- $\beta$  estavam expressos em muitas células dos tecidos gengivais humanos, revelando-se as marcações para o TGF- $\beta$ 1 e para o receptor I mais fortemente positivas em tecidos hiperplásicos induzidos pela ciclosporina do que no grupo controle (CONDÉ et al., 2011).

Buduneli et al. (2007) sugerem que a acantose epitelial observada na gengiva crescida pela indução da CSA pode ocorrer devido os efeitos anti-apoptóticos da IL-15 e os efeitos aditivos da CSA, entre outros fatores. Esses autores observaram, em seu estudo, que o número de células em apoptose foi significativamente menor no grupo tratado pela CSA do que no grupo da gengivite e da gengiva saudável. Entretanto, as células em apoptose não exibiram diferenças significativas entre os grupos de gengivite e de gengiva saudável, enquanto que o grupo de crescimento gengival induzido pela CSA mostrou um número significativamente menor de células em apoptose do que o grupo de gengivite.

Os fatores de risco mais citados para o desenvolvimento do crescimento gengival induzido pela CSA incluem: o gênero, a idade, a dose e a duração do tratamento, o tempo decorrido após o transplante, o uso concomitante de outras drogas, as concentrações plasmáticas, teciduais e seus metabólitos e as condições sistêmicas (AUAD, QUIRINO, 2000; PIRES, LAGES, 2003; OLIVEIRA et al., 2003; ROMITO et al., 2003; LISBÔA, 2004; COTA et al., 2010).

A correlação entre a dose e os níveis totais de CSA no sangue e a severidade do crescimento gengival tem revelado diferenças, sugerindo em alguns casos que os níveis sanguíneos do imunossupressor podem interferir na severidade da doença, enquanto outros

indicam que não há influência dos níveis sanguíneos do imunossupressor (CONDÉ et al., 2011).

Vale ressaltar ainda como variável, a presença de fatores locais predisponentes, como o biofilme e a habilidade do paciente para um controle adequado, considerando-se também que o grau de inflamação gengival e a extensão da destruição periodontal também estão inseridos nesse processo, havendo uma relação entre a quantidade de biofilme e a severidade do aumento gengival induzido pela CSA (AUAD, QUIRINO, 2000; OLIVEIRA et al., 2003; ROMITO et al., 2003; LISBÔA, 2004; COTA et al., 2010).

O biofilme pode ser considerado um reservatório para a CSA. Portanto, o efeito combinado, ou seja, a associação entre a inflamação induzida pelo acúmulo de biofilme e o crescimento gengival, constitui um fato comprovado na literatura, tendo em vista a dificuldade apresentada pelo portador em realizar uma higiene bucal eficiente (OLIVEIRA et al., 2003).

#### **2.4.2 Drogas bloqueadoras de canais de cálcio**

Os BCCs surgiram na década de 1950, embora seu emprego em larga escala só tenha se dado na década de 80 (LISBÔA, 2004; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). De acordo com os efeitos farmacológicos e clínicos, esses medicamentos classificam-se em: classe I (fenilalquilaminas - verapamil), classe II (di-hidropiridinas - nifedipina) e classe III (benzotiazinas - diltiazem) (SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009).

Os BCCs são medicamentos largamente utilizados para tratamento de distúrbios cardiovasculares, agudas e crônicas, tais como: substâncias utilizadas principalmente para o tratamento da hipertensão arterial, *angina pectoris*, arritmias ventriculares, espasmo da artéria coronária e doença vascular periférica (SHIMIZU et al., 2002; LISBÔA, 2004; PEREZ et al., 2004; CORRÊA et al., 2005; SATO et al., 2005; CASTRO, 2006; LI, SUN, JI, 2008; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009).

Essas drogas também são largamente empregadas em pacientes que se submetem a diálise e em pacientes transplantados para reduzir a nefrotoxicidade e a cardiotoxicidade provocadas pela ciclosporina, assim como também para controlar a hipertensão arterial (LISBÔA, 2004; PEREZ et al., 2004; FONSECA et al., 2010).

Os BCCs agem de forma a bloquear o influxo do íon cálcio através das membranas das células das musculaturas lisas vascular e cardíaca (PEREZ et al., 2004; CASTRO, 2006; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). Por sua vez, a diminuição do cálcio disponível

reduz a contratilidade das células do miocárdio e, conseqüentemente, o consumo de oxigênio. Na musculatura vascular lisa a redução do influxo de cálcio resulta em vasodilatação e diminuição do tônus muscular, auxiliando no controle da hipertensão (CORRÊA et al., 2005; CASTRO, 2006; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; SOUSA, NAVARRO, SPOSTO, 2011).

Embora sejam medicações extremamente úteis, podem gerar alguns efeitos colaterais indesejáveis. Os efeitos adversos mais importantes consistem em extensões diretas de sua ação terapêutica, uma vez que a inibição excessiva do cálcio pode causar hipotensão, depressão cardíaca grave, incluindo bradicardia, bloqueio atrioventricular, insuficiência cardíaca congestiva e parada cardíaca (CASTRO, 2006; FONSECA et al., 2010).

Outros efeitos incluem tontura, edema periférico, náusea, dor de cabeça, rubor facial, constipação intestinal, astenia, tremor, dermatite, urticária, prurido e rigidez articular (CASTRO, 2006; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009, FONSECA et al., 2010).

De especial interesse para a Odontologia é a ocorrência de crescimento gengival (LISBÔA, 2004; BUDUNELI et al., 2007; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). Entre as drogas que atuam como BBCs, as mais investigadas com relação ao aparecimento do aumento gengival são as di-hidropiridinas do tipo II, tais como: a nicardipina, a felodipina, a amlodipina e a nifedipina, assim como o diltiazem e o verapamil (LISBÔA, 2004; LU et al., 2010; TAKEUCHI et al., 2011). Contudo, a nifedipina é a substância mais relacionada ao crescimento gengival, em virtude de ser uma das mais utilizadas atualmente, isoladamente ou em associações medicamentosas (SHIMIZU et al., 2002; PEREZ et al., 2004; LISBÔA, 2004; SATO et al., 2005; BUDUNELI et al., 2007; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; TAKEUCHI et al., 2011).

#### 2.4.2.1 *Nifedipina*

A nifedipina foi introduzida no mercado em 1972, embora sua maior utilização tenha ocorrido na década seguinte. Na América do Norte, em 1984, foi associada ao aumento gengival (LISBÔA, 2004).

A prevalência do crescimento gengival induzido pela nifedipina varia muito entre os diferentes estudos e essa diferença percentual ampla pode estar relacionada com variações inerentes às condições próprias dos pacientes, bem como os seus hábitos de higiene bucal (SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). Essa alteração pode variar entre 4% a 83% ou

mesmo manter uma média de 20% e 30% dos indivíduos hipertensos acometidos (PIRES, LAGES, 2003; PEREZ et al., 2004; LISBÔA, 2004; BUDUNELI et al., 2007; LI, SUN, JI, 2008; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; FONSECA et al., 2010; SOUSA, NAVARRO, SPOSTO, 2011).

Em virtude do crescente uso de agentes anti-hipertensivos, mais especificamente dos BCCs, em especial da nifedipina, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de explicar sua possível relação com o crescimento gengival. Esse interesse se deve à importância que vem sendo dada às relações existentes entre a doença periodontal e os demais fatores sistêmicos que podem modificar o curso ou a expressão das gengivites e/ou periodontites, bem como ao impacto dessas doenças no contexto da saúde geral (SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009). Além disso, tal crescimento gengival é capaz de produzir uma modificação no microambiente gengival, visto que as dimensões gengivais aumentadas podem gerar sítios de intensa anaerobiose. Por conseguinte, essa alteração no nível da tensão de oxigênio favorece a proliferação de bastonetes anaeróbios gram-negativos, que podem iniciar ou agravar a doença periodontal destrutiva (CASTRO, 2006).

As mudanças inflamatórias e os mediadores influenciam toda a sequência de eventos que resultam no crescimento gengival, favorecendo o aumento da interação entre a nifedipina e/ou o seu metabólito e os fibroblastos gengivais. Além disso, tal interação é cálcio-dependente e, dessa forma, drogas que afetam o metabolismo intracelular de cálcio ou o seu transporte podem estimular os fibroblastos gengivais. Portanto, esses fatores parecem ser um determinante significativo para o sequestro de nifedipina no fluido crevicular (SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; CONDÉ et al., 2011).

As citocinas e os fatores de crescimento, incluindo a IL-1 e a IL-6, também se encontram elevados no crescimento gengival induzido pela nifedipina. A IL-1 $\beta$ , por sua vez, induz uma maior expressão gênica do receptor de andrógeno em fibroblastos gengivais e, dessa forma, favorece a conversão metabólica de substratos androgênicos em fibroblastos gengivais. Portanto, a regulação do receptor de andrógeno no crescimento gengival induzido pela di-hidropiridina pode ser aumentado pela inflamação (LU et al., 2010).

A combinação da nifedipina e da IL-1 $\alpha$  reforça a proliferação celular e a síntese de fibroblastos gengivais, particularmente no caso dos fibroblastos que respondem a nifedipina. Esses achados sugerem que os mediadores inflamatórios, tais como a IL-1 e determinados fatores de crescimento, podem ter um importante papel no crescimento gengival induzido pela nifedipina (SATO et al., 2005).

Takeuchi et al. (2011) relataram que em comparação com os fibroblastos gengivais derivados de pacientes que não responderam à nifedipina, os que responderam apresentaram um aumento das taxas de proliferação celular, de DNA e na síntese de colágeno na presença de nifedipina além de uma transição significativa da fase G1 para a fase S no ciclo celular na presença do FGF.

Acredita-se que os fibroblastos gengivais derivados de pacientes reativos à nifedipina são responsáveis pelo crescimento gengival induzido pela nifedipina. Por outro lado, devido os fibroblastos gengivais representarem um tipo de célula não-excitante, não possuem os canais de cálcio tipo L, que são inibidos pela nifedipina. Assim, o crescimento gengival induzido pela nifedipina tem sido causado por um outro mecanismo que não seja o bloqueio dos canais de cálcio tipo L na membrana plasmática (TAKEUCHI et al., 2011).

O estudo de Shimizu et al. (2002) revelou que a diminuição da degradação do colágeno devido à baixa fagocitose está intimamente associada com o aumento do acúmulo de colágeno Tipo I em gengiva de ratos tratados com nifedipina e também sugeriu que a hiperplasia epitelial induzida pela nifedipina no crescimento gengival ocorre não pelo aumento da proliferação de ceratinócitos, mas sim pelo prolongamento da vida da célula, através da redução da apoptose.

### **2.4.3 Drogas anticonvulsivantes**

A epilepsia é um distúrbio neurológico crônico bastante comum em humanos, resultado de aberrações do cérebro que começam na infância (MARAKOGLU et al., 2004; TAMAMORI et al., 2005; CORRÊA et al., 2011). Caracteriza-se por eventos clínicos ou crises convulsivas que ocorrem na ausência de doenças metabólico-tóxicas ou febre (MARAKOGLU et al., 2004).

Os dados epidemiológicos mostram uma incidência de epilepsia no mundo de 11 a 131/100.000 indivíduos por ano e parece ser mais prevalente em crianças e adolescentes, apresentando, no entanto, um aumento do número de casos em pacientes idosos, porém sem diferença na incidência em relação ao sexo e aos grupos étnicos (CORRÊA et al., 2011).

Dessa forma, as drogas anticonvulsivantes são utilizadas para prevenir crises convulsivas causadas por epilepsia, sendo as drogas mais comumente indicadas para essa finalidade: a carbamazepina (benzodiazepínicos), a fenitoína, os barbitúricos (fenobarbital), o ácido valpróico, a primidona, a lamotrigina e os benzodiazepínicos (PEREZ et al., 2004; TAMAMORI et al., 2005).

Essas drogas são administradas ao paciente por um longo período de tempo, especialmente na epilepsia intratável e, por esse motivo, requer em muitos casos até mais de 10 anos para o tratamento (TAMAMORI et al., 2005). O mecanismo de ação das drogas anti-epilépticas disponíveis no momento é por depressão da atividade neuronal no foco de origem ou por bloqueio dos mecanismos de propagação (MARAKOGLU et al., 2004)

O tratamento da epilepsia baseia-se em terapias com drogas que visam ajudar os pacientes a diminuir ou eliminar as crises convulsivas, sem efeitos adversos. No entanto, em vários casos, a ineficácia do tratamento com a droga de primeira escolha ocorre devido à falta de eficácia ou à falha do paciente em tolerar os efeitos adversos da medicação, tais como vertigens, náuseas, vômitos, lentificação psicomotora, parestesias e déficits de memória (CORRÊA et al., 2011).

A fenitoína é a única entre as drogas epiléticas que afeta diretamente os tecidos periodontais, visto que, em pacientes que tomam outras drogas anticonvulsivantes, como o valproato de sódio, a carbamazepina e os barbitúricos, o aparecimento do crescimento gengival é bastante raro (PEREZ et al., 2004). Porém, também tem sido relatado o crescimento gengival associado com o fenobarbital, o ácido valpróico e a vigabatrina (MARAKOGLU et al., 2004; AYRA et al., 2011).

#### 2.4.3.1 *Fenitoína*

A fenitoína (5-diphenilphenytoin) foi introduzida como uma droga anti-epilética em 1938, por Merritt e Putnam (MARAKOGLU et al., 2004; FONSECA et al., 2010; AYRA et al., 2011). Esse agente permanece sendo uma das medicações mais comumente prescritas para o tratamento da epilepsia, podendo também ser usado para os casos de neuralgias e arritmias cardíacas (MARAKOGLU et al., 2004; AYRA et al., 2011; CORRÊA et al., 2011).

A fenitoína exerce suas propriedades anticonvulsivantes, provocando uma depressão funcional do córtex motor do sistema nervoso central sem afetar, de modo significativo, as regiões sensoriais que comprometeriam as atividades normais do paciente. Ela tende a estabilizar o limiar de excitabilidade, evitando a hiperexcitabilidade provocada pela excessiva estimulação ou alterações ambientais, apresentando também ação imunossupressora. Entretanto, apresenta diversos efeitos colaterais, tais como: distúrbios do sistema nervoso, dos tecidos hematopoiéticos, da pele, do fígado, das glândulas endócrinas e do sistema imunológico; aumentos gengivais; hipersensibilidade, incluindo erupções cutâneas; e

ocasionalmente reações cutâneas mais graves; doença hepática; e reações hematológicas, incluindo a neutropenia e a leucopenia (PEREZ et al., 2004; TAMAMORI et al., 2005).

O crescimento gengival é um dos mais comuns efeitos adversos associados à administração da fenitoína, tendo sido esta associação primeiramente descrita em 1939, por Kimball (MARAKOGLU et al., 2004; PEREZ et al., 2004; FONSECA et al., 2010; AYRA et al., 2011; CORRÊA et al., 2011).

A prevalência do crescimento gengival tem ampla variação, mas estudos controlados têm demonstrado uma porcentagem de 30% a 65% dos indivíduos acometidos (PEREZ et al., 2004; TAMAMORI et al., 2005; BUDUNELI et al., 2007; SOUZA, CHIAPINOTTO, MARTOS, 2009; FONSECA et al., 2010; CORRÊA et al., 2011). A prevalência do crescimento gengival induzido pela fenitoína, em comunidades de pacientes institucionalizados, tem mostrado uma variação de 13% a 50% e em estudos baseados em hospitais, a incidência tem sido de 50% a 60% (MARAKOGLU et al., 2004; FONSECA et al., 2010). A baixa prevalência do crescimento gengival em alguns estudos pode ser explicada em virtude da interação da fenitoína com o fenobarbital e/ou a carbamazepina, porém, essa relação é controversa (MARAKOGLU et al., 2004).

Nos países em desenvolvimento, o crescimento gengival induzido pela fenitoína constitui um problema significativo devido aos seguintes motivos: aumento da preocupação com a estética e a auto-imagem, em virtude do crescimento gengival que pode acarretar; baixo custo e familiaridade com a droga, sendo por isso usada como primeira escolha, mesmo em situações em que poderia ser substituída; e higiene bucal inadequada da população atendida pelos hospitais públicos que fazem uso desse medicamento (AYRA et al., 2011).

Os mecanismos que desencadeiam o CGID não foram completamente compreendidos e, embora os dados da literatura sejam extensos, eles são bastante contraditórios (CORRÊA et al., 2011). Embora muitas hipóteses tenham sido propostas a respeito da ação do crescimento gengival induzido pela fenitoína, não tem sido estabelecida uma teoria definitiva (TAMAMORI et al., 2005).

De um modo geral, as três classes de drogas relacionadas ao crescimento gengival afetam o metabolismo do cálcio, induzindo uma diminuição do influxo celular de cálcio, levando a uma redução na absorção de ácido fólico, limitando assim a produção de collagenase ativa. Quanto à via intracelular de degradação do colágeno, a fenitoína diminui significativamente a endocitose de colágeno, o que está relacionado a uma menor expressão da integrina  $\alpha 2\beta 1$ . Esta, por sua vez, atua na fase inicial da fagocitose do colágeno, proporcionando uma interação entre o fibroblasto e o colágeno. Além disso, a apoptose de

fibroblastos é diminuída no crescimento gengival e esta diminuição pode contribuir para a fibrose. Assim, um aumento no número de fibroblastos e uma acumulação de MEC parece ser devido, em parte, a uma diminuição da morte dos fibroblastos nesses tecidos. Enfim, a patogênese do crescimento gengival associado à fenitoína envolve uma diminuição na degradação do colágeno que está relacionada a alterações no metabolismo do cálcio, nos níveis de MMPs e inibidores teciduais de MMPs (TIMPs), na expressão de integrinas e na apoptose de fibroblastos. Sendo assim, o processo que leva ao crescimento gengival induzido pela fenitoína envolve uma fina regulação de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias (CORRÊA et al., 2011).

A relação entre a dose da fenitoína, a incidência e a severidade do crescimento gengival é incerta. Entretanto, parece haver uma relação significativa entre os níveis de fenitoína no plasma e a severidade da lesão (PEREZ et al., 2004). Além disso, o efeito do crescimento gengival torna-se perpetuado como consequência do aumento da retenção de biofilme em bolsas gengivais. O acúmulo de biofilme exacerba a inflamação e o crescimento na gengiva (TAMAMORI et al., 2005).

## 2.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR

O ciclo celular, também conhecido como ciclo de duplicação e divisão celular é compreendido entre duas divisões celulares sucessivas e é tradicionalmente dividido em duas fases: interfase e mitose. A interfase é o período em que a célula se organiza para entrar em divisão e a mitose ou fase M é a divisão celular propriamente dita. A interfase se subdivide em três partes: a fase S, período no qual ocorre a síntese de DNA; a fase G1, antecedente da síntese; e a fase G2, período após a síntese de DNA e imediatamente anterior à mitose. Há ainda a fase G0 que acontece quando as células abandonam o ciclo e param de se dividir temporária ou definitivamente (CASTRO, 2006).

Os processos essenciais envolvidos na duplicação e na divisão do conteúdo celular são coordenados e induzidos por um grande número de moléculas presentes, tanto no meio extracelular, quanto no meio intracelular (CASTRO, 2006).

A proliferação celular trata-se de um processo biológico de vital importância para o organismo, sendo definida como o aumento do número de células que completaram seu ciclo celular (SOARES, 2005). Em organismos multicelulares, o número de células é determinado pelo equilíbrio regulado entre a proliferação e a morte celulares. A manutenção desse equilíbrio é um pré-requisito para o desenvolvimento e o crescimento, assim como para a

homeostase de tecidos adultos (BUDUNELI et al., 2003; BULUT, OZDEMIR, 2007; BUDUNELI et al., 2007). O equilíbrio da população de fibroblastos no tecido é mantido por uma regulação do ciclo celular que leva à proliferação e divisão ou à apoptose. A proliferação das células fibroblásticas tem sido maior nos tecidos gengivais com crescimento induzido pela ciclosporina, nifedipina e fenitoína (TAKEUCHI et al., 2011).

### **2.5.1 Marcador de proliferação celular: proteína Ki-67**

Dentre os marcadores de proliferação celular mais comumente estudados, destacam-se as figuras de mitose e a expressão de moléculas que atuam em uma ou mais fases do ciclo celular, a exemplo da proteína Ki-67, que é considerada como um bom marcador para estimar o estado de crescimento do tecido (BUDUNELI et al., 2007).

O anticorpo monoclonal Ki-67 foi obtido por Gerdes et al., em 1983, quando se observou que tal anticorpo só reagia com um antígeno nuclear de células em proliferação (SOARES, 2005).

O Ki-67 é uma proteína nuclear e nucleolar, não-histônica, com peso molecular aparente de 345 a 348 quilodaltons. A expressão do antígeno Ki-67 tem sido observada em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), apesar de existirem oscilações no seu nível devido a variações quantitativas da sua síntese. Sua expressão começa a ser detectada na fase S do ciclo celular, aumenta na fase G2, atingindo seu maior pico na fase M. Após a divisão, a célula retorna a G1 e os níveis de Ki-67 diminuem progressivamente. Dessa forma, o antígeno Ki-67 é um marcador para detectar a fração de uma determinada população celular que está em proliferação, estando, portanto, ausente nas células em repouso, na fase G0 (SOARES, 2005; CASTRO, 2006; BUDUNELI et al., 2007).

### **2.5.2 Estudos envolvendo a proteína Ki-67 e o CGID**

O estudo de Saito et al. (1999) descobriu que as taxas médias de células Ki-67 positivas em crescimentos gengivais induzidos pela nifedipina e pela fenitoína são significativamente maiores do que em tecidos saudáveis.

Saito et al. (2000), ao utilizarem a técnica da imuno-histoquímica com o anticorpo anti-Ki-67, para avaliação da proliferação do epitélio no crescimento gengival induzido pela nifedipina, relataram que o aumento da espessura epitelial observada nessa condição

patológica, em humanos, está associado com o aumento da atividade mitótica dos ceratinócitos.

Nurmenniemi et al. (2001) verificaram um aumento significativo do número de células mitóticas, através da marcação pelo anticorpo anti-Ki-67, em pacientes com crescimento gengival induzido pela ciclosporina, em comparação com o grupo saudável.

A análise imuno-histoquímica do estudo de Bulut et al. (2004) demonstrou níveis semelhantes da expressão do Ki-67 no epitélio gengival de receptores de transplante tratados com CSA e controles saudáveis, indicando que houve atividade proliferativa semelhante nas células basais do epitélio de ambos os grupos. Dessa forma, os autores concluíram que a taxa de proliferação epitelial pode manter-se inalterada em pacientes transplantados renais com crescimento gengival induzido pela CSA.

A CSA pode inibir o crescimento dos ceratinócitos direta e indiretamente e um estudo *in vitro* tem demonstrado o efeito anti-proliferativo dessa droga nos ceratinócitos (BULUT et al., 2004). Em contrapartida, a CSA também estimula moléculas bioativas como TGF- $\beta$ 1 e PDGF que poderiam promover o crescimento dos fibroblastos e a produção de matriz (BULUT et al., 2002).

Mesa et al. (2004) encontraram um aumento significativo da expressão do Ki-67 em seis casos de crescimento gengival induzido pela vigabatrina, um agente antiepiléptico, com ação semelhante à fenitoína.

No experimento de Buduneli et al. (2007) os resultados indicam um aumento no número de células Ki-67 positivas e na razão de células em divisão e células que não estão em divisão no grupo tratado pela CSA, quando comparados com os grupos de gengivite e gengiva saudável, embora as diferenças não tenham atingido um nível de significância estatística. Os casos de crescimento gengival induzidos pela fenitoína e pela nifedipina revelaram uma expressão muito acentuada do antígeno Ki-67 pelos ceratinócitos, leucócitos e fibroblastos, juntamente com um aumento na razão das células em divisão.

## 2.6 APOPTOSE CELULAR

O fenômeno da apoptose foi observado por Glucksman, em 1951, como um padrão de morte celular presente no desenvolvimento normal de vertebrados (SOARES, 2005). Porém, foi só em 1972 que Kerr et al. introduziram o termo apoptose ou morte celular programada, definindo como um processo genética e fisiologicamente controlado, atuando em conjunto com a mitose para preservar a homeostase celular e facilitar a remodelação do tecido durante

o desenvolvimento (BUDUNELI et al., 2007; TAKEUCHI et al., 2011). Representa um processo crítico e irreversível que determina um importante papel na diferenciação e na proliferação celulares (BUDUNELI et al., 2003).

O mecanismo da apoptose ocorre espontaneamente a partir de um estímulo fisiológico ou é ativado por estímulos patológicos, como a radiação, a hipóxia e os danos ao DNA celular (SOARES, 2005). A sua ativação pode ocorrer através de duas vias principais: a via extrínseca, mediada pela ativação de receptores de morte celular localizados na membrana citoplasmática, sendo o Fas e o TNF os mais conhecidos; e a via intrínseca, dependente da participação da mitocôndria, onde ocorre a liberação de fatores apoptogênicos, como o citocromo c, o fator indutor da apoptose (AIF), a ATP e as proteínas de choque térmico. Como resultado final de ambas as vias, ocorre a ativação das caspases, proteases que quebram proteínas celulares específicas e estão associadas à degradação do DNA (SOARES, 2005).

As alterações celulares observadas durante a apoptose são: a redução do volume das células isoladas, decorrente do aumento da concentração de cálcio no citoplasma e da perda de líquidos para o meio extracelular; a perda de estruturas especializadas de superfície, como as microvilosidades e regiões de contato, tornando-se lisa e separada das células vizinhas; as alterações nucleares, como a condensação da cromatina próximo à membrana nuclear e a fragmentação do DNA resultante da ação da endonuclease; a formação de corpos apoptóticos, contendo no seu interior algumas organelas geralmente intactas e, às vezes, fragmentos de núcleo; o reconhecimento imediato; e a fagocitose dos corpos apoptóticos por macrófagos ou células fagocitárias adjacentes que, aliada à integridade das organelas, não induz ao desenvolvimento de resposta inflamatória local (SHIMIZU et al., 2002; SOARES, 2005).

A apoptose está implicada em uma ampla variedade de fenômenos biológicos, incluindo as respostas inflamatórias e a eliminação de células específicas, sem distúrbios na estrutura e na função dos tecidos. Porém, as características das células que sofrem de morte celular apoptótica anormal podem estar envolvidas parcialmente na patogênese de uma larga variedade de doenças humanas, incluindo o câncer, as doenças auto-imunes, as infecções virais, a AIDS, a doença de Alzheimer, as doenças periodontais e o diabetes mellitus (BUDUNELI et al., 2003; BUDUNELI et al., 2007; TAKEUCHI et al., 2011).

A supressão da apoptose pode conduzir a um aumento na razão de crescimento do tecido gengival em virtude da inibição da apoptose em fibroblastos gengivais (SHIMIZU et al., 2002; TAKEUCHI et al., 2011). O epitélio consiste de ceratinócitos que emergem do compartimento de proliferação da camada de células basais e se move para cima, progressivamente, através de várias camadas do epitélio escamoso estratificado, passando por

diferenciação e finalmente por morte celular. Para manter a arquitetura normal do epitélio gengival, a série de eventos de crescimento, diferenciação e morte são estritamente modulados. Este equilíbrio homeostático, sem dúvida, envolve a integração da diferenciação epitelial e a apoptose (SHIMIZU et al., 2002).

A apoptose pode ser modulada por mediadores da inflamação (TAKEUCHI et al., 2011). Os sinais de cálcio também são importantes para o desencadeamento da apoptose, uma vez que uma elevação sustentada de cálcio pode ativar as enzimas degradativas, tais como as proteases dependentes de cálcio e as endonucleases responsáveis pela fragmentação do DNA (SHIMIZU et al., 2002). Diversos genes estão envolvidos no controle da apoptose, alguns desempenham funções anti-apoptóticas e outros pró-apoptóticos (SOARES, 2005).

### **2.6.1 Marcador apoptótico: proteína Bcl-2**

O gene Bcl-2 foi primeiramente observado translocado entre os cromossomos 14 e 18 em grandes proporções de linfomas foliculares de células B humanas. Essa translocação do Bcl-2 da posição 18q21 para 14q32 resulta na superexpressão de suas proteínas (SOARES, 2005). Ele representa um proto-oncogene responsável pela expressão de uma proteína integral de membrana (26-KDa), exclusivamente citoplasmática por encontrar-se usualmente localizada no lado externo da membrana mitocondrial, no envelope nuclear e no retículo endoplasmático das células (BUDUNELI et al., 2003; SOARES, 2005). A sua localização nuclear está relacionada, provavelmente, à sua função na proteção do DNA contra a ação das endonucleases, inibindo a apoptose (SOARES, 2005). A proteína Bcl-2 é conhecida por prevenir ou marcadamente reduzir a indução da morte celular em virtude de uma larga variedade de fatores de perturbação das células, incluindo a retirada do fator de crescimento, a quimioterapia, a irradiação e a infecção viral (BULUT et al., 2005; TAKEUCHI et al., 2011).

Vários tecidos, além da linhagem hematopoiética, expressam a proteína Bcl-2, tendo sido encontrada sua expressão tanto em tecidos humanos normais como em cânceres orais (BUDUNELI et al., 2003).

Em adição à regulação da apoptose, a família do Bcl-2 influencia o ciclo celular, especificamente a transição entre a quiescência e a proliferação. Em condições de crescimento um pouco abaixo do ideal, o Bcl-2 promove a saída de células em quiescência e retarda a sua reentrada no ciclo (TAKEUCHI et al., 2011). Níveis anormais de Bcl-2 podem afetar a homeostase dos tecidos por conferir um fenótipo resistente à apoptose nas células em vez de

facilitar a ação de proliferação celular (BUDUNELI et al., 2003). A inibição da apoptose pode ocorrer em qualquer fase do ciclo celular, mas o mecanismo não é totalmente entendido.

As alterações citoplasmáticas da apoptose são controladas diretamente pela proteína Bcl-2, que regula a concentração de cálcio livre no citosol, inibindo a liberação deste pelo retículo endoplasmático e então, a apoptose. Possivelmente, a Bcl-2 atua na inibição da liberação do citocromo c pela mitocôndria e também de outras formas, no intuito de prevenir a indução da apoptose. Na presença de superexpressão da proteína Bcl-2, a habilidade de remover danos celulares por apoptose está limitada (SOARES, 2005).

### **2.6.2 Estudos envolvendo a proteína Bcl-2 e o CGID**

O trabalho de Handajani et al. (2003) mostrou que o tratamento com nifedipina em ratos resultou no aumento da expressão da proteína Bcl-2 em uma moda dose e duração dependentes.

Saito et al. (2000) observaram uma superexpressão da oncoproteína Bcl-2 no epitélio gengival de humanos com crescimento gengival induzido por fenitoína e nifedipina. Os resultados do crescimento gengival induzido pela nifedipina, em modelos de ratos, sugerem que a nifedipina pode induzir a expressão de Bcl-2 em tecido gengival de rato com dose e duração moda-dependentes, e que esta proteína proto-oncogene pode desempenhar um importante papel no crescimento gengival induzido pela nifedipina.

No estudo de Bulut et al. (2005), verificou-se inibição da apoptose nas células epiteliais da gengiva em pacientes tratados com ciclosporina, mas não foram encontradas diferenças significantes entre o grupo da ciclosporina e o grupo controle no que diz respeito à imunolocalização da Bcl-2. Segundo relatos desses autores, a proteína Bcl-2 tem demonstrado exercer um papel regulatório fundamental na apoptose, podendo prevenir ou marcadamente reduzir a morte celular por uma larga variedade de estímulos no crescimento gengival induzido pela nifedipina. Sob condições fisiológicas, a expressão dessa proteína parece estar associada a um pool de células menos diferenciadas e células submetidas à diferenciação terminal. A conclusão desse estudo indica que a patogênese do crescimento gengival induzido pela CSA pode envolver a inibição da apoptose e a superexpressão do Bcl-2 na presença de elevados níveis séricos de ciclosporina.

Um aumento da expressão de Bcl-2 no epitélio da gengiva humana exibindo crescimento gengival induzido pela nifedipina tem sido relatado no experimento de Shimizu et al. (2002). Para esses autores, a hiperplasia epitelial gengival pode ser induzida pela

nifedipina através de um aumento da expressão de Bcl-2 pelos ceratinócitos. Nesse estudo, ressalta-se que a apoptose dos ceratinócitos foi severamente suprimida antes que a hiperplasia epitelial fosse detectada. Possivelmente, então, a inibição da apoptose no epitélio conduziu ao acúmulo de células, resultando na hiperplasia epitelial do crescimento gengival.

***OBJETIVOS***

---

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a expressão imuno-histoquímica das proteínas Ki-67 e Bcl-2 e a sua relação com as características histomorfológicas em espécimes de CGID, HGI e GS.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

a) Investigar as características histomorfológicas, tais como a espessura epitelial, o grau de colagenização, o grau de vascularização e a intensidade e distribuição do infiltrado inflamatório dos espécimes de CGID, HGI e GS;

b) Analisar quantitativamente a imunomarcagem das proteínas Ki-67 e Bcl-2 tanto no epitélio quanto no tecido conjuntivo dos espécimes de CGID, HGI e GS;

c) Avaliar a existência de possíveis correlações entre as imunomarcagens das proteínas Ki-67 e Bcl-2 nos espécimes de CGID, HGI e GS.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O estudo foi submetido à Plataforma Brasil e o projeto encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (CEP-UEPB), sendo aprovado sob o parecer de número 0076.0.133.000-12 (ANEXO 1). Esta pesquisa obedeceu a todos os princípios éticos e legais, mantendo a integridade física e moral dos pacientes.

### **4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO**

O estudo em questão é do tipo descritivo-analítico, transversal, observacional, qualitativo e quantitativo.

### **4.3 POPULAÇÃO**

A população do estudo foi composta por todos os casos de CGID, diagnosticados, registrados e arquivados nos Serviços de Anatomia Patológica dos Departamentos de Odontologia da UEPB, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e da Universidade de Brasília (UnB). Para os casos de HGI e GS, foram selecionados apenas os espécimes diagnosticados, registrados e arquivados na UEPB e na UFRN.

### **4.4 AMOSTRA**

A amostra foi do tipo não-probabilística e intencional, uma vez que foram selecionados somente os casos diagnosticados como CGID (UEPB, UFRN, UNIFOR e UnB), HGI e GS (UEPB e UFRN), cujos materiais disponíveis nos blocos de parafina existentes exibiam quantidade e qualidade de tecido satisfatórias para os estudos histomorfológico e imuno-histoquímico.

Com base nos critérios anteriormente descritos, foram selecionados inicialmente 20 casos de CGID. Dessa forma, para os grupos comparativos de HGI e GS, optou-se por utilizar a mesma quantidade, totalizando assim 60 casos.

#### 4.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo os espécimes com diagnósticos histopatológicos de CGID, HGI e GS que, além de apresentarem material biológico suficiente para a confecção das lâminas e análises histomorfológica e imuno-histoquímica, revelaram em suas fichas laboratoriais as seguintes informações:

Seleção da amostra:

- Relato da presença clínica de hiperplasia gengival e de uso de algum medicamento que apresenta associação com o crescimento gengival, nos casos de CGID;
- Relato da presença clínica de hiperplasia gengival e ausência de relato de uso de medicação associada ao crescimento gengival, nos casos de HGI;
- Relato da ausência de hiperplasia e de sinais clínicos de inflamação, além da descrição do procedimento cirúrgico utilizado para a obtenção do espécime tecidual, nos casos de GS.

#### 4.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os espécimes de CGID, HGI e GS que não apresentaram quantidade de material suficiente nos blocos de parafina e cujas fichas laboratoriais não continham as informações necessárias para a sua caracterização como CGID, HGI ou GS.

### 4.5 ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO

Esta análise foi realizada em cortes histológicos de 5µm de espessura, dispostos em lâminas de vidro e corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE), correspondentes aos espécimes de CGID, HGI e GS selecionados para esta pesquisa. Cada caso foi avaliado sob microscopia de luz (*MD500*, LEICA Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, *DE*) nos aumentos de 40×, 100× e 400× por dois examinadores capacitados, para descrição dos achados histomorfológicos representantes da amostra. A classificação final foi definida por consenso entre os examinadores.

No revestimento epitelial, os espécimes foram avaliados e classificados de acordo com a presença ou ausência das seguintes características histomorfológicas: espongiose, exocitose, degeneração hidrópica, acantose, hiperplasia e projeções epiteliais alongadas. No tecido conjuntivo, de acordo com o grau de colagenização, vascularização e intensidade do infiltrado

inflamatório, os casos foram classificados como: discreto, moderado ou intenso. Além disso, com base na distribuição do infiltrado inflamatório, os casos foram categorizados em: focal ou difuso.

A técnica utilizada para coloração em HE seguiu o protocolo descrito abaixo:

- ✓ Desparafinização:
  - Xilol I (15 minutos);
  - Xilol II (15 minutos);
- ✓ Hidratação em cadeia descendente de etanóis:
  - Álcool etílico absoluto (5 minutos);
  - Álcool etílico 90° GL (5 minutos);
  - Álcool etílico 80° GL (5 minutos);
  - Álcool etílico 70° GL (5 minutos);
  - Álcool etílico 60° GL (5 minutos);
- ✓ Lavagem em água corrente (5 minutos);
- ✓ Hematoxilina (2 minutos);
- ✓ Lavagem em água corrente (5 minutos);
- ✓ Eosina (1 minuto);
- ✓ Lavagem em água corrente (5 minutos);
- ✓ Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
  - Álcool etílico 60° GL (5 minutos);
  - Álcool etílico 70° GL (5 minutos);
  - Álcool etílico 80° GL (5 minutos);
  - Álcool etílico 90° GL (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto (5 minutos);
- ✓ Diafanização
  - Xilol I (15 minutos);
  - Xilol II (15 minutos).
- ✓ Montagem em resina *PermOUNT*<sup>®</sup> para observação à microscopia de luz.

## 4.6 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

### 4.6.1 Método imuno-histoquímico

Todos os espécimes gengivais fixados em formol a 10% e emblocados em parafina, referentes aos casos selecionados para este estudo, foram submetidos a cortes histológicos de 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro, previamente limpas e devidamente preparadas com adesivo à base de organosilano (3aminopropiltriétoxissilano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica da estreptoavidina-biotina (*LSAB + System HRP*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), utilizando os anticorpos primários anti-Ki-67 e anti-Bcl-2 (QUADRO 1). Como controle positivo para os anticorpos anti-Ki-67 e anti-Bcl-2 foram utilizados cortes de carcinoma epidermóide oral e de linfonodos, respectivamente.

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Tempo de Incubação
Ki-67	SP-6	Diagnostic Biosystems	1:200	Citrato pH 6,0 Pascal, 121°C, 3 min	60 min
Bcl-2	124	Dako	1:50	Citrato pH 6,0 Pascal, 121°C, 3 min	<i>Overnight</i>

QUADRO 1. Anticorpo, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

A técnica utilizada seguiu o protocolo descrito abaixo:

- ✓ Desparafinização em temperatura ambiente:
  - Xilol I (10 minutos);
  - Xilol II (10 minutos)
- ✓ Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis, sob temperatura ambiente:
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
  - Álcool etílico 95° GL (5 minutos);
  - Álcool etílico 80° GL (5 minutos);

- ✓ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95%, à temperatura ambiente (10 minutos);
- ✓ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ✓ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);
- ✓ Recuperação antigênica (QUADRO 1);
- ✓ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ✓ Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10 volumes (2 trocas com 10 minutos cada);
- ✓ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ✓ Duas passagens rápidas em água destilada (5 minutos cada);
- ✓ Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- ✓ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ✓ Duas passagens rápidas em água destilada (5 minutos cada);
- ✓ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ✓ Incubação dos cortes com anticorpos primários em solução diluente (*Antibody diluent with background reducing components*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA);
- ✓ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ✓ Incubação com anticorpo secundário (*Biotinylated link universal*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- ✓ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ✓ Incubação com complexo estreptoavidina-HRP (*Streptavidin-HRP*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- ✓ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCL pH 7,4 (5 minutos cada);
- ✓ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB + Substrate*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (7 minutos);
- ✓ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ✓ Duas passagens rápidas em água destilada (5 minutos);
- ✓ Contra-coloração com hematoxilina de Mayer à temperatura ambiente (5 minutos);
- ✓ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ✓ Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
  - Álcool etílico 80° GL (2 minutos);
  - Álcool etílico 95° GL (2 minutos);
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);

- Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ✓ Diafanização:
- Xilol I (2 minutos);
  - Xilol II (2 minutos);
  - Xilol III (2 minutos);
- ✓ Montagem em resina *Permount*® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA), para observação à microscopia de luz.

#### 4.6.2 Análise imuno-histoquímica

Após o processamento imuno-histoquímico, foram avaliados, por intermédio da microscopia de luz (*MD500*, LEICA Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) todos os espécimes de crescimento gengival induzido por drogas, hiperplasia gengival inflamatória e gengiva saudável. Para esta análise, foram considerados os seguintes parâmetros: positividade da marcação (positivo ou negativo), localização da marcação (epitélio e conjuntivo) e o número total de células marcadas para os referidos anticorpos, por campo, no epitélio e no tecido conjuntivo.

Os espécimes foram analisados por um único examinador previamente calibrado. Sob o aumento de 400×, foram selecionados 5 (cinco) campos de maior imunorreatividade aos anticorpos anti-Ki-67 e anti-Bcl-2. Cada um desses campos foi fotomicrografado (*MD500*, LEICA Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador. Com o auxílio do programa *Imaging Processing and Analysis in Java* (*Image J*®, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), foi realizada a contagem das células imunopositivas e das células negativas, até alcançar um total de 1.000 células contabilizadas no epitélio e de 500 células no tecido conjuntivo. Em seguida, para cada caso, foram calculados os índices de positividade (IPs) para os anticorpos anti-Ki-67 e anti-Bcl-2, tanto no epitélio quanto no tecido conjuntivo.

Foram consideradas como imunomarcadas as células que exibiam coloração marrom/acastanhada com padrão finamente granular, decorrente da reação do corante DAB no citoplasma e nas membranas, independentemente da intensidade de marcação.

Para o estudo imuno-histoquímico e também para a análise morfológica, todos os casos do estudo foram identificados de forma que o examinador não tivesse acesso à

informação sobre o tipo de lesão que estava sendo avaliada, caracterizando assim um estudo do tipo cego.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a realização de toda a metodologia anteriormente descrita e a conclusão das análises histomorfológica e imuno-histoquímica, os resultados obtidos foram organizados em um banco de dados informatizado, com o auxílio do programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, IL, USA), na versão 17.0.

A partir dos dados obtidos com a análise morfológica foram estabelecidos valores percentuais e, em seguida, possíveis associações dos achados histopatológicos com a condição (CGID, HGI, GS) foram avaliadas pelo teste Qui-quadrado.

Os dados obtidos com a quantificação das células imunomarcadas para o Ki-67 e para o Bcl-2 foram submetidos ao teste de *Kolmogorov-Smirnov* para a avaliação da distribuição dos dados, onde se constatou distribuição normal para o Ki-67 e para o Bcl-2 no epitélio. Dessa forma, as comparações das médias dos IPs com relação à condição e à intensidade do infiltrado inflamatório foram realizadas pelo teste paramétrico *Anova One-Way*. A comparação das médias dos IPs de acordo com a distribuição do infiltrado e à vascularização foram realizadas pelo teste paramétrico *t-student*. Possíveis correlações entre os IPs para o Ki-67 e para o Bcl-2 foram avaliadas pelo teste de correlação de Pearson.

Por sua vez, com relação aos IPs para o Ki-67 e Bcl-2 no conjuntivo, o teste de *Kolmogorov-Smirnov* revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, as comparações das medianas dos IPs para o Ki-67 e para o Bcl-2 entre o CGID, a HGI e a GS foram realizadas pelo teste não-paramétrico de *Kruskall-Wallis*. As comparações das medianas dos IPs para o Ki-67 e para o Bcl-2, com relação às características histomorfológicas foram realizadas por meio do teste não-paramétrico de *Mann Whitney*. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

***RESULTADOS***

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1 RESULTADOS HISTOMORFOLÓGICOS

A análise morfológica do revestimento epitelial dos espécimes de GS revelou áreas focais de hiperplasia, bem como de degeneração hidrópica e exocitose. Por sua vez, o epitélio de revestimento das HGIs e dos CGIDs exibiram hiperplasia, acantose, degeneração hidrópica, espongirose e exocitose, em extensão e graus variados. Especificamente para os CGIDs, cristas epiteliais exibindo longas extensões em direção ao tecido conjuntivo subjacente foram identificadas em 11 (55,0%) dos 20 casos analisados, não sendo estas observadas em nenhum dos casos de HGI e GS (FIGURA 1).

Com relação às características do tecido conjuntivo, a análise do grau de colagenização revelou maior frequência de casos com intensa deposição de fibras colágenas nos CGIDs (90,0%), seguidos pelos espécimes de GS (60,0%). Nas HGIs essa deposição colagênica intensa esteve presente em apenas 45,0% dos espécimes avaliados, apresentando maior porcentagem no grau moderado (55,0%), em comparação com a GS (40,0%) e o CGID (10%). O grau de vascularização discreto não foi visualizado em nenhum caso dos três grupos. O teste do Qui-quadrado revelou associação estatisticamente significativa dos CGIDs com a intensa colagenização do tecido conjuntivo ( $p = 0,010$ ) (TABELA 1).

Ao se avaliar o grau de vascularização, constatou-se que a maior frequência da vascularização intensa foi observada no grupo da GS (70,0%), seguida pelo grupo de HGI (65,0%) e CGID (55,0%). Quanto ao grau de vascularização moderado, observou-se o inverso, ou seja, foi maior no CGID (45,0%), seguido pelos grupos de HGI (35,0%) e GS (30,0%). O grau de vascularização discreto não foi visualizado em nenhum caso dos três grupos. Por meio do teste do Qui-quadrado, não foi constatada associação estatisticamente significativa do grau de vascularização com qualquer um dos grupos avaliados ( $p = 0,605$ ) (TABELA 1).

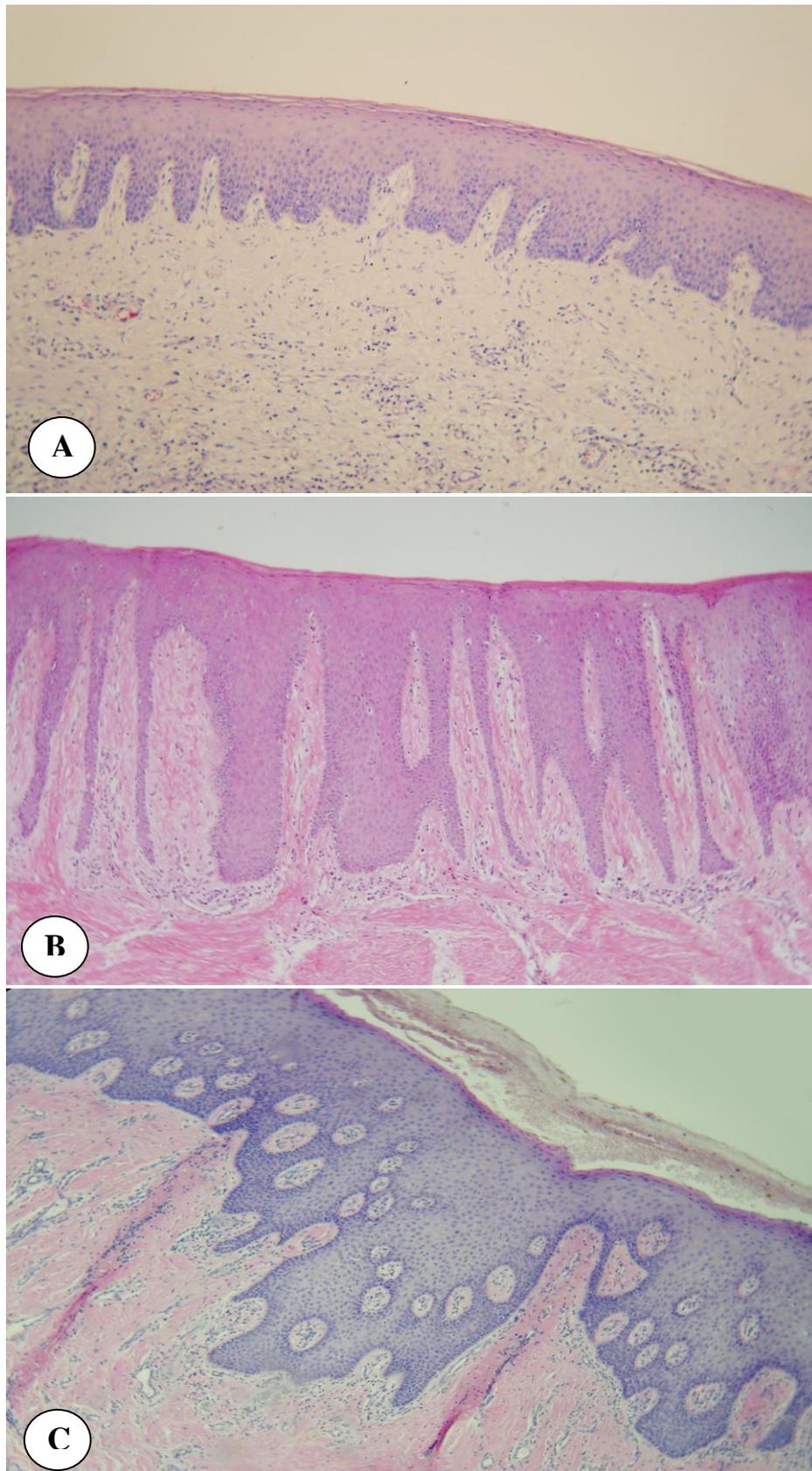


FIGURA 1. Fotomicrografias representativas das características histopatológicas observadas em GSs (A), CGIDs (B) e HGIIs (C) (HE, 100×).

TABELA 1. Distribuições absoluta e relativa e significância estatística dos graus de colagenização e vascularização do tecido conjuntivo com relação aos grupos avaliados. Campina Grande – PB, 2012.

Parâmetros	Grupos			$\chi^2$	<i>p</i>
	GS	HGI	CGID		
	n (%)	n (%)	n (%)		
<b>Colagenização</b>					
<b>Moderada</b>	8 (40,0)	11 (55,0)	2 (10,0)	9,231	<b>0,010</b>
<b>Intensa</b>	12 (60,0)	9 (45,0)	18 (90,0)		
<b>Total</b>	20 (100,0)	20 (100,0)	20 (100,0)		
<b>Vascularização</b>					
<b>Moderada</b>	6 (30,0)	7 (35,0)	9 (45,0)	1,005	0,605
<b>Intensa</b>	14 (70,0)	13 (65,0)	11 (55,0)		
<b>Total</b>	20 (100,0)	20 (100,0)	20 (100,0)		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia / UEPB.

Ainda no tecido conjuntivo, com relação ao infiltrado inflamatório, foram avaliadas a intensidade e a distribuição. No grupo da GS, verificou-se uma distribuição similar entre os casos com infiltrado inflamatório discreto (35,0%), moderado (30,0%) e intenso (35,0%). Por sua vez, os casos com infiltrado inflamatório intenso foram mais frequentes nos CGIDs (65,0%) e nas HGIs (60,0%). O teste do Qui-quadrado revelou ausência de associação estatisticamente significativa da intensidade do infiltrado inflamatório com qualquer um dos grupos avaliados ( $p = 0,365$ ) (TABELA 2).

A distribuição do infiltrado inflamatório demonstrou uma predominância do tipo focal em todos os grupos, com frequências idênticas na GS (80,0%) e na HGI (80,0%), seguidas dos CGIDs (75,0%). O teste do Qui-quadrado revelou ausência de associação estatisticamente significativa da distribuição do infiltrado inflamatório com qualquer um dos grupos avaliados ( $p = 0,906$ ) (TABELA 2).

TABELA 2. Distribuições absoluta e relativa e significância estatística da intensidade e da distribuição do infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo com relação aos grupos avaliados. Campina Grande – PB, 2012.

Parâmetros	Grupos			$\chi^2$	<i>p</i>
	GS	HGI	CGID		
	n (%)	n (%)	n (%)		
<b>Intensidade</b>					
<b>Discreto</b>	7 (35,0)	5 (25,0)	4 (20,0)	4,331	0,365
<b>Moderado</b>	6 (30,0)	3 (15,0)	3 (15,0)		
<b>Intenso</b>	7 (35,0)	12 (60,0)	13 (65,0)		
<b>Total</b>	20 (100,0)	20 (100,0)	20 (100,0)		
<b>Distribuição</b>					
<b>Focal</b>	16 (80,0)	16 (80,0)	15 (75,0)	0,196	0,906
<b>Difusa</b>	4 (20,0)	4 (20,0)	5 (25,0)		
<b>Total</b>	20 (100,0)	20 (100,0)	20 (100,0)		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia / UEPB.

## 5.2 RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

### 5.2.1 Análise da expressão da proteína Ki-67

A análise realizada nos revestimentos epiteliais dos espécimes imunomarcados com o anticorpo anti-Ki-67 revelou imunoexpressão desse antígeno em todos os casos de CGID, HGI e GS. A imunorreatividade foi observada, em todos os grupos, no núcleo das células da camada basal e, ocasionalmente, em células da camada suprabasal (FIGURA 2).

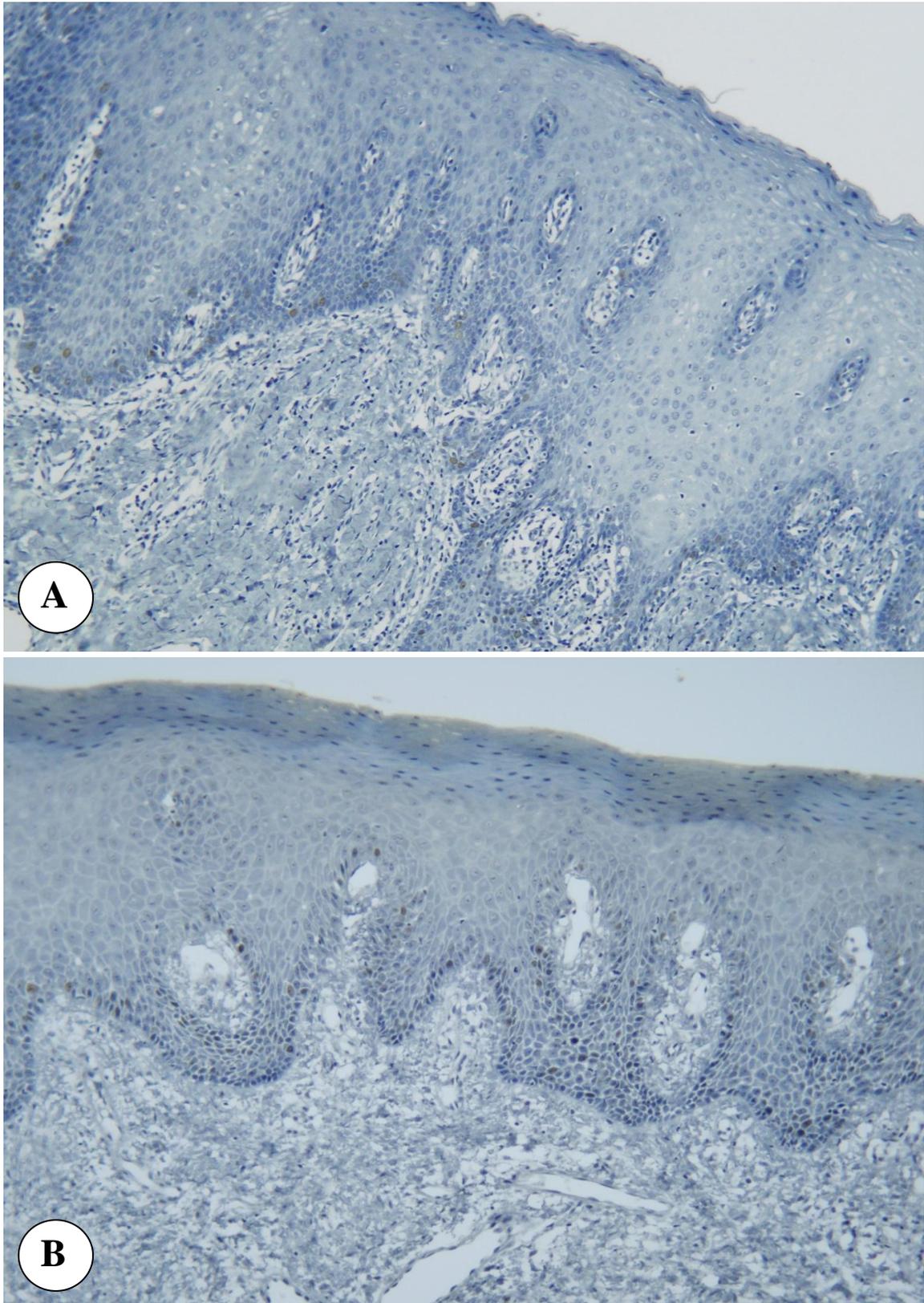


FIGURA 2. Positividade para o Ki-67 em células das camadas basal e parabasal do epitélio de revestimento de HGI (A) e GS (B) (LSAB, 100×).

A avaliação dos IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial, revelou, para as HGI, percentuais que variaram de 0,90% a 41,70%, com um IP médio de 17,19%. Nos CGIDs, esses percentuais variaram de 0,40% a 36,60%, com um IP médio de 17,20%. Por sua vez, nos espécimes de GS, os IPs para o anticorpo anti-Ki-67 variaram de 8,00% a 37,60%, com uma média de 21,71% (GRÁFICO 1). O teste paramétrico de *ANOVA One-Way* revelou ausência de diferença estatisticamente significativa entre as médias dos IPs para o Ki-67 nos revestimentos epiteliais dos espécimes de CGID, HGI e GS ( $p = 0,246$ ) (TABELA 3).

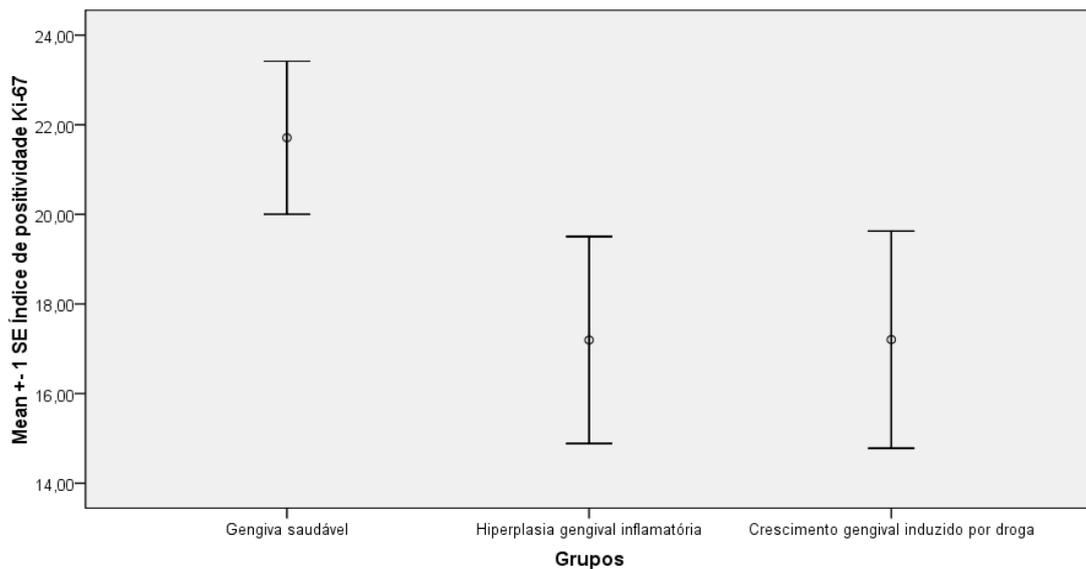


GRÁFICO 1. Barra de erros da média +/- desvio padrão dos IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de CGID, HGI e GS. Campina Grande, PB – 2012.

TABELA 3. Tamanho da amostra, média±desvio-padrão, estatística *F* e significância estatística (*p*) para os IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de CGID, HGI e GS. Campina Grande, PB – 2012.

Grupo	n	Média±desvio-padrão	<i>F</i>	<i>p</i>
CGID	20	17,20±10,83	1,439	0,246
HGI	20	17,19±10,33		
GS	20	21,71±7,64		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia / UEPB.

Com relação à intensidade do infiltrado inflamatório, os casos com infiltrado inflamatório discreto ( $n = 16$ ) exibiram IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial que

variaram de 7,20% a 23,90%, com uma média de 14,83%. Nos casos com infiltrado inflamatório moderado ( $n = 12$ ), esses percentuais variaram de 8,00% a 37,60%, com um IP médio de 20,95%. Por sua vez, os casos com infiltrado inflamatório intenso ( $n = 32$ ) revelaram IPs que variaram de 0,40% a 41,70%, com uma média de 19,79% (GRÁFICO 2). O teste paramétrico de *ANOVA One-Way* revelou ausência de diferença estatisticamente significativa entre as médias dos IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial com relação à intensidade do infiltrado inflamatório ( $p = 0,171$ ) (TABELA 4).

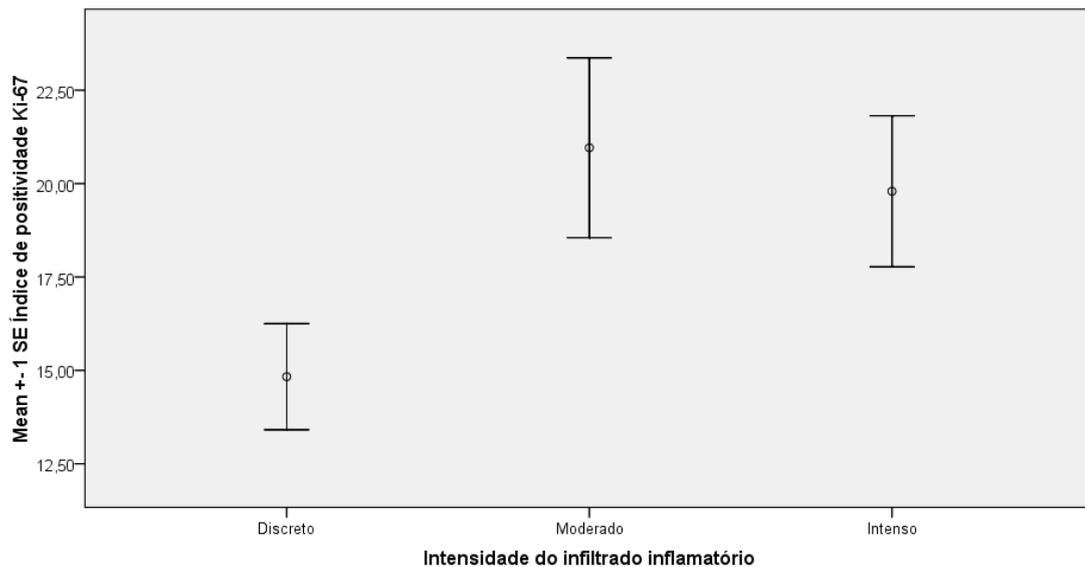


GRÁFICO 2. Barra de erros da média +/- desvio padrão dos IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Campina Grande, PB – 2012.

TABELA 4. Tamanho da amostra, média±desvio-padrão, estatística *F* e significância estatística (*p*) para os IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Campina Grande, PB – 2012.

<b>Intensidade do infiltrado</b>	<b>n</b>	<b>Média±desvio-padrão</b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>p</i></b>
<b>Discreto</b>	16	14,83±5,67	1,822	0,171
<b>Moderado</b>	12	20,95±8,33		
<b>Intenso</b>	32	19,79±11,43		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia / UEPB.

A análise dos IPs para o Ki-67 em relação à distribuição do infiltrado inflamatório revelou, para os casos com distribuição focal ( $n = 47$ ), percentuais de positividade no

revestimento epitelial que variaram de 0,90% a 41,70%, com uma média de 19,60%. Nos casos com infiltrado inflamatório difuso ( $n = 13$ ), esses percentuais variaram de 0,40% a 29,10%, com um IP médio de 15,43% (GRÁFICO 3). O teste paramétrico “t” de *Student* revelou ausência de diferença estatisticamente significativa entre as médias dos IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial com relação à distribuição do infiltrado inflamatório ( $p = 0,175$ ) (TABELA 5).

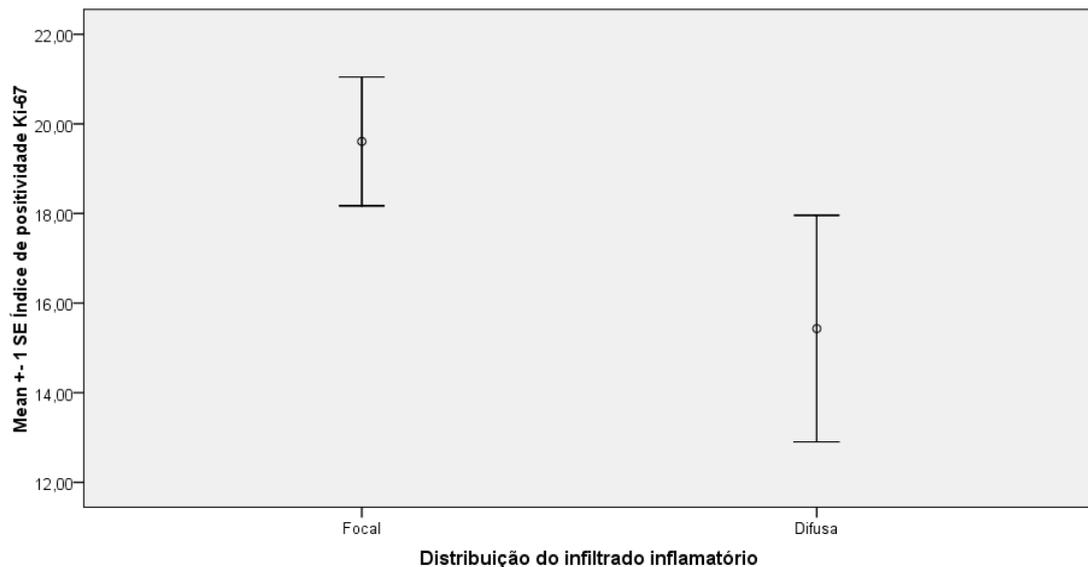


GRAFICO 3. Barra de erros da média +/- desvio padrão dos IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. Campina Grande, PB – 2012.

TABELA 5. Tamanho da amostra, média±desvio-padrão, estatística *t*, significância estatística (*p*) e intervalo de confiança (95%) para os IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. Campina Grande, PB – 2012.

Distribuição do infiltrado	n	Média±desvio-padrão	<i>t</i>	<i>p</i>	Intervalo de confiança (95%)	
					Mínimo	Máximo
Focal	47	19,60±9,85	1,374	0,175	- 1,910	10,265
Difuso	13	15,43±9,12				

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia / UEPB.

A análise dos IPs para o Ki-67 com relação à vascularização do tecido conjuntivo revelou, para os casos com moderada vascularização ( $n = 22$ ), percentuais de positividade no revestimento epitelial que variaram de 1,60% a 41,70%, com uma média de 17,79%. Nos casos com intensa vascularização ( $n = 38$ ), esses percentuais variaram de 0,40% a 37,60%, com um IP médio de 19,23% (GRÁFICO 4). O teste paramétrico “t” de *Student* revelou ausência de diferença estatisticamente significativa entre as médias dos IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial com relação ao grau de vascularização do tecido conjuntivo ( $p = 0,587$ ) (TABELA 6).

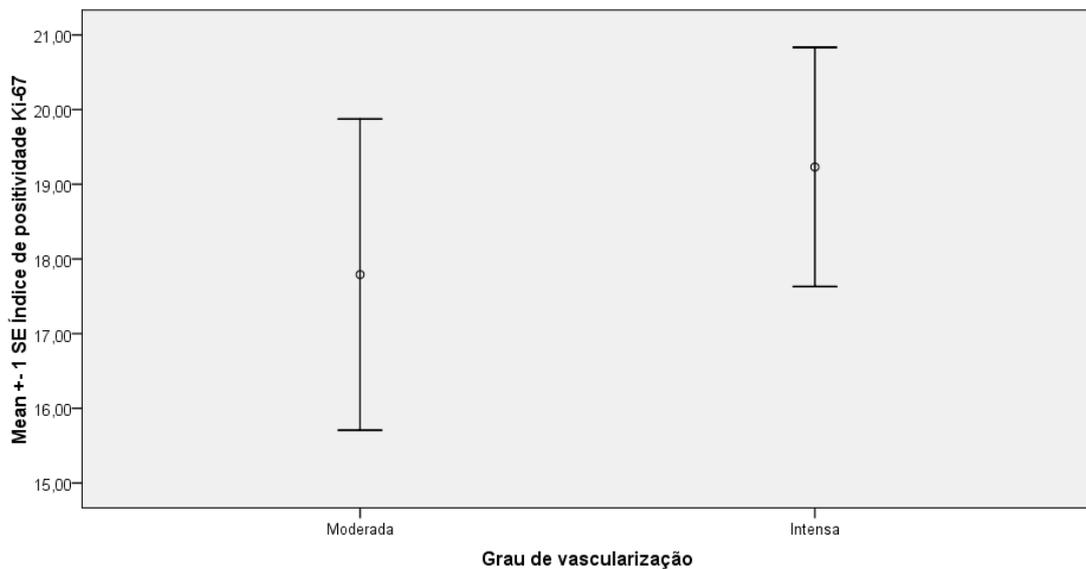


GRÁFICO 4. Barra de erros da média +/- desvio padrão dos IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de acordo com o grau de vascularização do tecido conjuntivo. Campina Grande, PB – 2012.

TABELA 6. Tamanho da amostra, média±desvio-padrão, estatística *t*, significância estatística (*p*) e intervalo de confiança (95%) para os IPs para o Ki-67 no revestimento epitelial de acordo com o grau de vascularização do tecido conjuntivo. Campina Grande, PB – 2012.

Vascularização	n	Média±desvio-padrão	<i>t</i>	<i>p</i>	Intervalo de confiança (95%)	
					Mínimo	Máximo
<b>Moderada</b>	47	17,79±9,77	-0,547	0,587	- 6,715	3,834
<b>Intensa</b>	13	19,23±9,87				

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia / UEPB.

No tecido conjuntivo, a análise dos espécimes imunomarcados com o anticorpo anti-Ki-67 revelou imunexpressão desse antígeno em células endoteliais e, ocasionalmente, em células mononucleadas fusiformes e ovóides, dispersas em meio à MEC, morfológicamente compatíveis com fibroblastos (FIGURA 3). A avaliação específica desse último tipo celular revelou positividade para o Ki-67 em 40,0% (n = 8) dos casos de CGID, 35,0% (n = 7) dos casos de HGI e 35,0% (n = 7) dos espécimes de GS.

A análise dos IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo revelou, para as HGIs, valores percentuais que variaram de 0,00% a 1,60%, com um IP médio de 0,25%. Nos CGIDs, esses percentuais variaram de 0,00% a 1,20%, com um IP médio de 0,22%. Por sua vez, nos casos de GS, os IPs para o anticorpo anti-Ki-67 variaram de 0,00% a 1,00%, com uma média de 0,15% (GRÁFICO 5). O teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* revelou ausência de diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de CGIDs, HGIs e espécimes de GS ( $p = 0,874$ ) (TABELA 7).

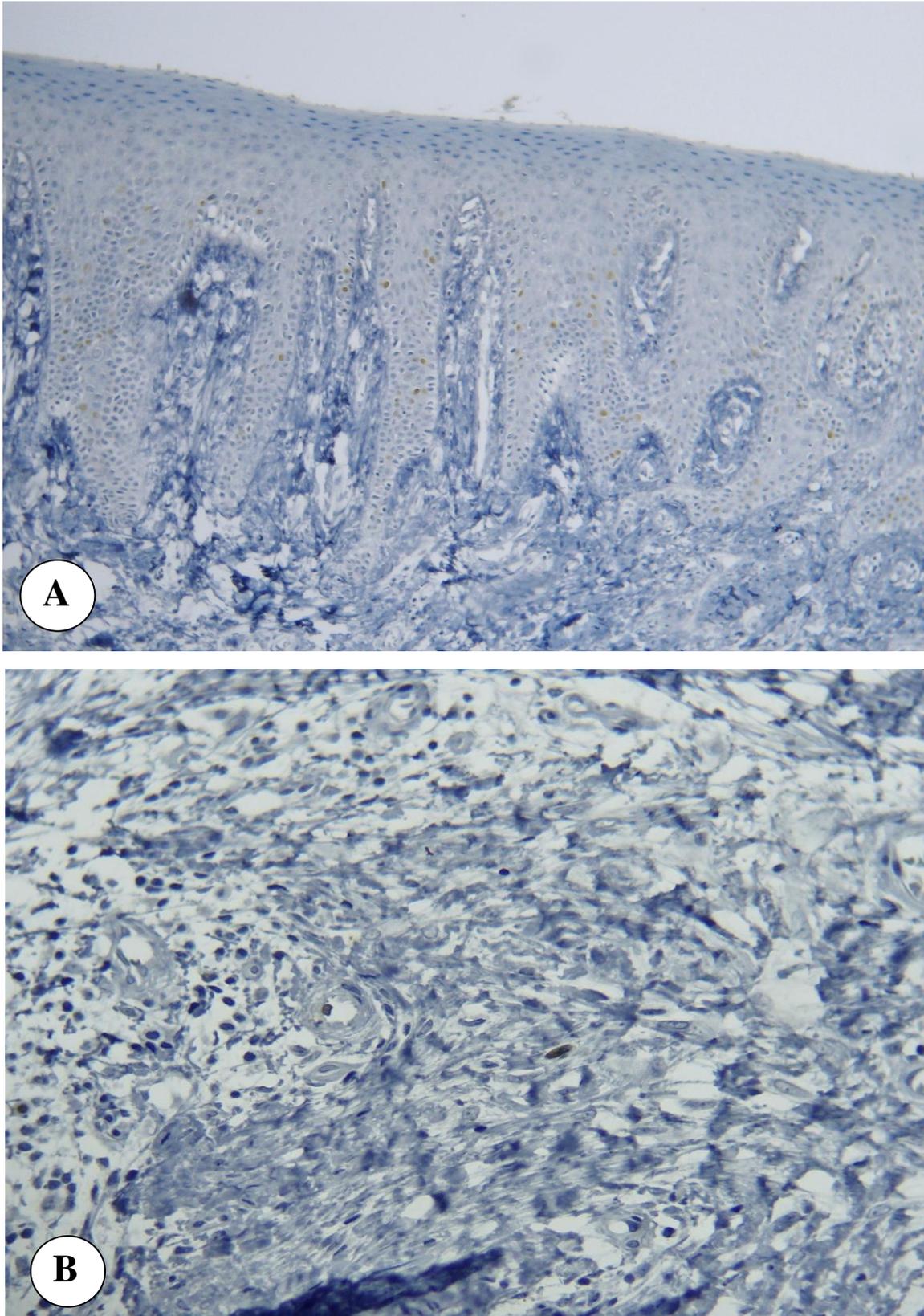


FIGURA 3. Positividade para o Ki-67 em células das camadas basal e parabasal do epitélio de revestimento de CGID (A) (LSAB, 100 $\times$ ) e em célula mononucleada fusiforme (seta), dispersa em meio à MEC (B) (LSAB, 400 $\times$ ).

TABELA 7. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística KW e significância estatística ( $p$ ) para os IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de CGID, HGI e GS. Campina Grande, PB – 2012.

Grupo	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	KW	$p$
CGID	20	0,00	0,00-0,35	31,45	0,270	0,874
HGI	20	0,00	0,00-0,40	30,95		
GS	20	0,00	0,00-0,20	29,10		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia / UEPB.

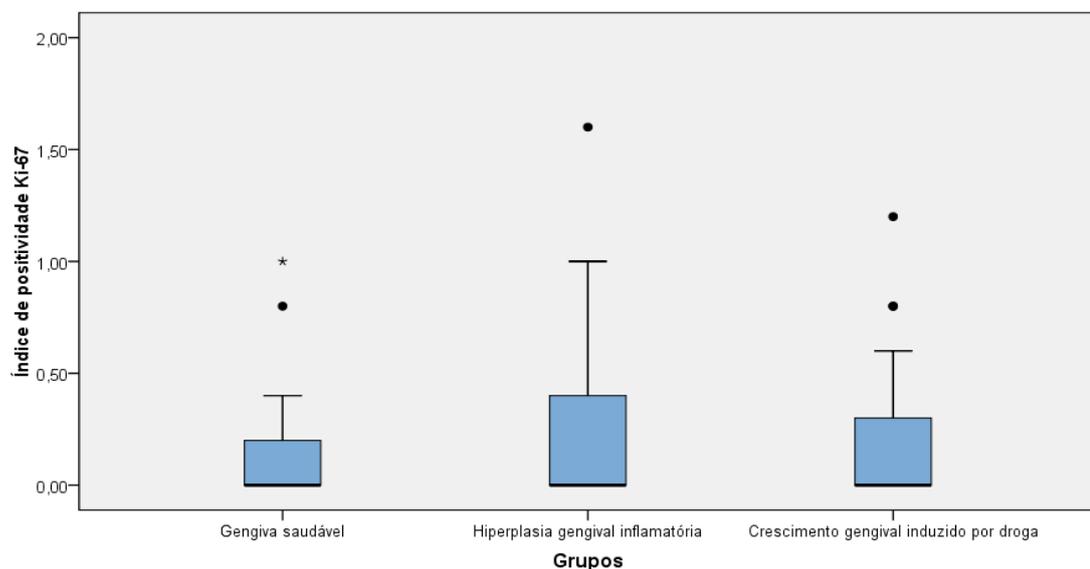


GRÁFICO 5. Box-plot relativo aos IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de CGID, HGI e GS. Campina Grande, PB – 2012.

No que diz respeito à intensidade do infiltrado inflamatório, os casos com infiltrado inflamatório discreto ( $n = 16$ ) exibiram IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo que variaram de 0,00% a 0,60%, com uma média de 0,06%. Nos casos com infiltrado inflamatório moderado ( $n = 12$ ), estes percentuais variaram de 0,00% a 1,60%, com um IP médio de 0,16%. Já os casos com infiltrado inflamatório intenso ( $n = 32$ ) revelaram IPs que variaram de 0,00% a 1,20%, com uma média de 0,29%. O pequeno número de casos positivos para o Ki-67 nos espécimes com infiltrado inflamatório discreto e moderado impossibilitou a realização de análises estatísticas

para avaliar possíveis diferenças na proliferação de células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo com relação à intensidade do infiltrado inflamatório.

A análise dos IPs para o Ki-67 com relação à distribuição do infiltrado inflamatório revelou, para os casos com distribuição focal ( $n = 47$ ), percentuais de positividade em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo que variaram de 0,00% a 1,60%, com uma média de 0,22%. Nos casos com infiltrado inflamatório difuso ( $n = 13$ ), esses percentuais variaram de 0,00% a 0,60%, com um IP médio de 0,15% (GRÁFICO 6). O teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* revelou não existir diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos IPs para o Ki-67 no tecido conjuntivo com relação à distribuição do infiltrado inflamatório ( $p = 0,771$ ) (TABELA 8).

TABELA 8. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para os IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. Campina Grande, PB – 2012.

<b>Distribuição do infiltrado</b>	<b>n</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub></b>	<b>Média dos postos</b>	<b>U</b>	<b>p</b>
<b>Focal</b>	47	0,00	0,00-0,40	30,20	291,50	0,771
<b>Difusa</b>	13	0,00	0,00-0,30	31,58		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia / UEPB.

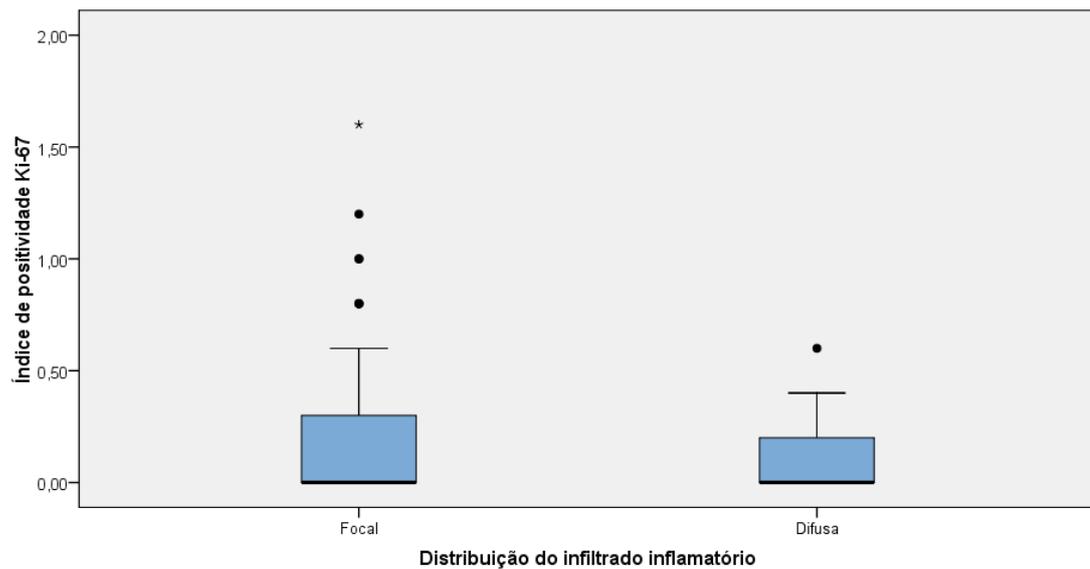


GRÁFICO 6. Box-plot relativo aos IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. Campina Grande, PB – 2012.

A análise dos IPs para o Ki-67 com relação ao grau de vascularização do tecido conjuntivo revelou, para os casos com moderada vascularização ( $n = 22$ ), percentuais de positividade em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo que variaram de 0,00% a 1,60%, com uma média de 0,20%. Nos casos com intensa vascularização ( $n = 38$ ), esses percentuais variaram de 0,00% a 0,10%, com um IP médio de 0,21% (GRÁFICO 7). O teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* revelou não existir diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos IPs para o Ki-67 no tecido conjuntivo com relação ao grau de vascularização ( $p = 0,355$ ) (TABELA 9).

TABELA 9. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para os IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de acordo com o grau de vascularização. Campina Grande, PB – 2012.

Vascularização	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	U	$p$
Moderada	22	0,00	0,00-0,20	28,14	366,00	0,355
Intensa	38	0,00	0,00-0,40	31,87		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia / UEPB.

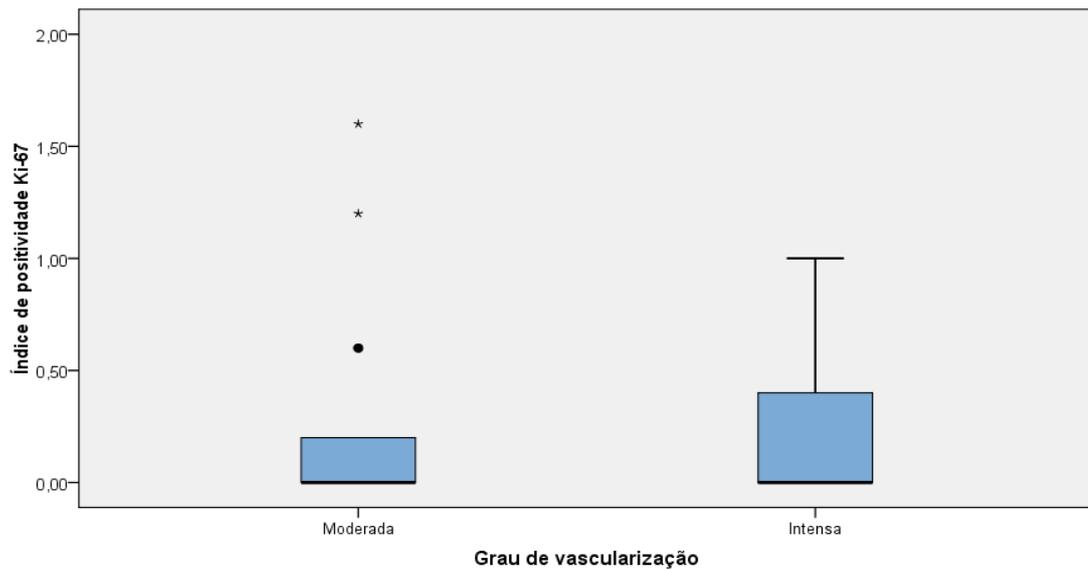


GRÁFICO 7. Box-plot relativo aos IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de acordo com o grau de vascularização. Campina Grande, PB – 2012

A análise dos IPs para o Ki-67 com relação ao grau de colagenização do tecido conjuntivo revelou, para os casos com moderada deposição de fibras colágenas ( $n = 21$ ), percentuais de positividade em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo que variaram de 0,00% a 1,60%, com uma média de 0,25%. Nos casos com intensa colagenização ( $n = 39$ ), estes percentuais variaram de 0,00% a 1,20%, com um IP médio de 0,17% (GRÁFICO 8). O teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* revelou não existir diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos IPs para o Ki-67 no tecido conjuntivo em relação ao grau de colagenização ( $p = 0,653$ ) (TABELA 10).

TABELA 10. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para os IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de acordo com o grau de colagenização. Campina Grande, PB – 2012.

Colagenização	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	U	$p$
Moderada	21	0,00	0,00-0,50	31,69	384,50	0,653
Intensa	39	0,00	0,00-0,20	29,86		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia / UEPB.

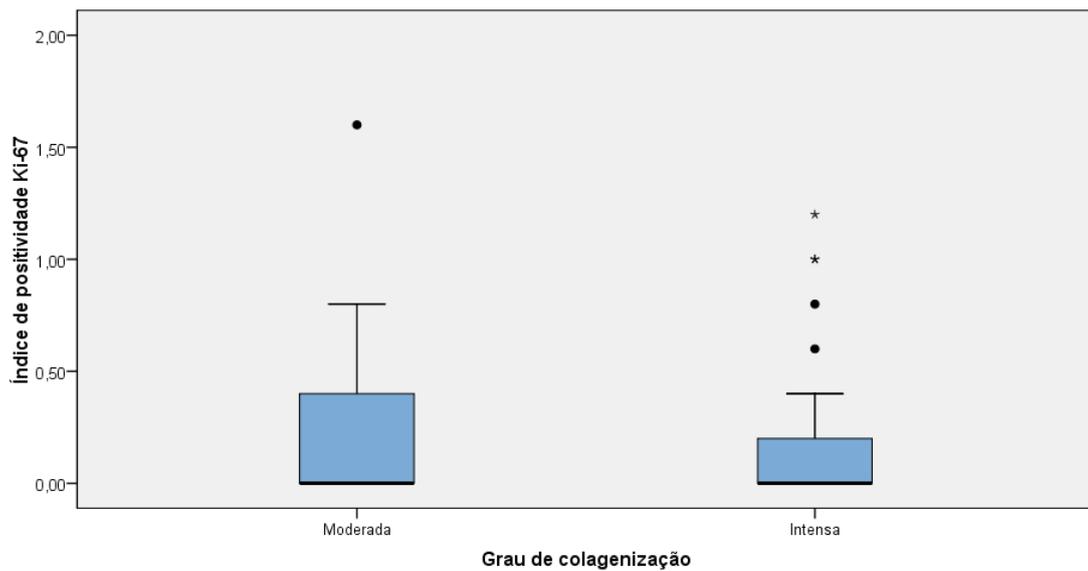


GRÁFICO 8. Box-plot relativo aos IPs para o Ki-67 em células mononucleadas fusiformes e ovóides presentes no tecido conjuntivo de acordo com o grau de colagenização. Campina Grande, PB – 2012.

### 5.2.2 Análise da expressão da proteína Bcl-2

A análise dos IPs para o Bcl-2 nos revestimentos epiteliais revelou, para as HGIs, IPs que variaram de 1,40% a 26,10%, com uma média de 11,23%. Nos CGIDs, esses percentuais variaram de 2,40% a 27,10%, com um IP médio de 14,67%. Por sua vez, nos espécimes de GS, os IPs para o anticorpo anti-Bcl-2 variaram de 0,80% a 19,30%, com uma média de 10,24% (GRÁFICO 9). O teste paramétrico de ANOVA *One-Way* revelou ausência de diferença estatisticamente significativa entre as médias dos IPs para o Bcl-2 no revestimento epitelial de CGIDs, HGIs e espécimes de GS ( $p = 0,061$ ) (TABELA 11) (FIGURA 4 e 5).

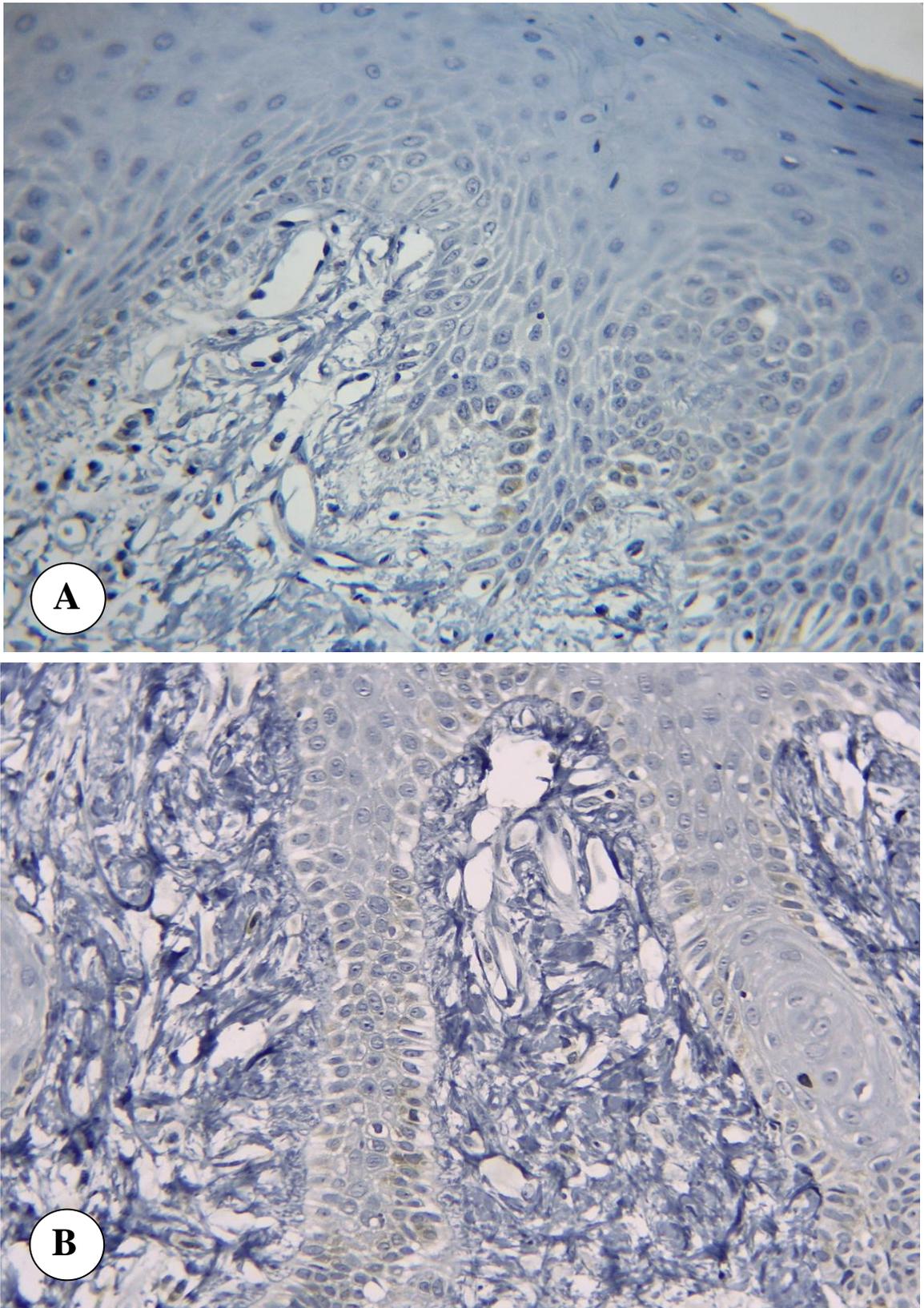


FIGURA 4. Positividade para o Bcl-2 em células da camada basal do epitélio de revestimento de HGI (A) e CGID (B) (LSAB, 400×).