

MARIA AUXILIADORA GOMES SANDIM ABDO

**IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS EM PROCESSOS
PATOLÓGICOS DA CAVIDADE BUCAL**

**CAMPO GRANDE - MS
2013**

MARIA AUXILIADORA GOMES SANDIM ABDO

**IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS EM PROCESSOS
PATOLÓGICOS DA CAVIDADE BUCAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Inês Aparecida Tozetti

**CAMPO GRANDE - MS
2013**

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIA AUXILIADORA GOMES SANDIM ABDO

**IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS EM PROCESSOS
PATOLÓGICOS DA CAVIDADE BUCAL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Rodrigues Gorisch / Centro de Prevenção ao Câncer

Profa. Dra. Rosana Mara Giordano de Barros / UFMS

Profa. Dra. Luciane Candeloro Portugal / UFMS

Profa. Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira / UFMS

Profa. Dra. Inês Aparecida Tozetti / UFMS

À Deus por ter me concedido esta oportunidade.

Aos meus pais (*in memoriam*) por toda orientação de vida.

Ao Décio por todo amor e compreensão.

Aos meus irmãos por todo amor, carinho e incentivos que
pautam a minha existência.

AGRADECIMENTOS

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste estudo.

Profa. Dra. Inês minha amiga e orientadora, você me fez sonhar um sonho esquecido; com profissionalismo ultrapassou as barreiras da dedicação. Com desvelo, me sustentou nos momentos difíceis e sorrindo desfez minhas incertezas. Minha Amiga muito obrigada. *Amiga é coisa prá se guardar...*

Profa. Dra. Rosana, amiga certa das horas incertas, que em muitos momentos difíceis da minha vida me acalmou. Seu coração repleto de bondade abarca o mundo, me aceitou co-orientar fazendo suas, muitas das minhas tardes. A você minha amiga de longa caminhada, muito obrigada.

A Profa. Anamaria de Mello Miranda Paniago, por todo incentivo desde as primeiras conversas sobre minha intenção de fazer o doutorado. Pequenos gestos dizem muito.

A todos os pacientes, sujeitos anônimos desta pesquisa, que colaboraram para a ampliação dos conhecimentos sobre as lesões bucais.

Aos alunos, Camila Mareti Bonin, Fernanda Cassandri, Flávia Gatto de Almeida, Leandro Sobrinho Ávila, Thiago Theodoro Martins Prata (meu dedicado coleitor das lâminas) que de todas as maneiras, sorrindo e cantando, colaboraram para a execução deste trabalho.

Ao meu colega Carlos, Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes, que muito me ajudou (com algumas risadas pelos meus deslizes) desde o projeto de tese. Obrigada Gaúcho por todo tempo carinhosamente dedicado para a avaliação dos resultados deste trabalho. À Karine, colega certa de horas incertas. Obrigada por muitas vezes ter me ouvido e incentivado. Os amigos fazem a diferença!

Aos competentes técnicos Cláudio Gonçalves Oliveira, Mirian, Silvia que não mediram esforços para que a perfeita execução desta pesquisa. Vocês tornam possível o impossível!

Alessandra Regina Borgo, competente bibliotecária; tanto me ajudou com muito carinho e dedicação. Seu sorriso me acalmou muitas vezes. Que no mundo existam mais pessoas como você!

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos e às secretárias Véra Nascimento da Silva e Áurea Soares Gobi que com seus sorrisos, com ou sem batom vermelho, tornaram alguns momentos inesquecíveis. Valeu!

À FUNDECT pelo apoio financeiro que proporcionou a execução deste trabalho.

À minha família, onde incluo a Tia Mari, que colore minha vida de cores vibrantes, por todo carinho, incentivo e amor no decorrer deste estudo e da dessa existência. Família é isso!

À Deus por ter me concedido a chance de nesta passagem galgar mais um degrau em direção ao conhecimento, visando de forma singela, o bem estar da humanidade. Obrigada Senhor!

Agradeço a todos que com sorrisos contagiantes e olhares carinhosos colaboraram infinitamente para o desenvolvimento desta pesquisa. E, como todo fim indica um começo...

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

A saúde bucal é essencial a saúde do organismo. A integridade orgânica resulta da interdependência entre as saúdes bucal e sistêmica. Neste contexto, o diagnóstico precoce de lesões que afetam a cavidade bucal pode minimizar ou evitar o agravamento de diversos processos patológicos. As lesões reacionais, hiperplasia fibrosa inflamatória e lesão periférica de células gigantes carecem de estudos imonohistoquímicos que caracterizem as células do infiltrado inflamatório enquanto, para as lesões por paracoccidiodomicoses e os carcinomas espinocelulares bucais esses estudos são escassos. O objetivo desta pesquisa foi identificar por imunohistoquímica as células presentes no infiltrado inflamatório das quatro alterações patológicas relevantes da cavidade bucal: hiperplasia fibrosa inflamatória, lesão periférica de células gigantes, paracoccidiodomicose e carcinoma espinocelular. O material estudado foi obtido do arquivo do Laboratório de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e analisado quanto à presença dos marcadores: CD4 para detecção de Linfócitos T *helper*, CD8 para detecção Linfócitos T citotóxicos, CD68 para marcação de macrófagos, e CD57 para marcação de Células *Natural Killer* (NK). Houve variação na distribuição dos marcadores imunohistoquímicos das lesões pesquisadas. Nas Hiperplasias Fibrosas Inflamatórias predominou CD8 (75%) e CD68 (62,5%), seguidos de CD57 (12,5%) e nenhuma marcação para CD4; nas lesões periféricas de células gigantes registrou-se maior marcação para CD68 (100%) seguida de CD8 (42,9%) e nenhuma marcação para CD4 e CD57; no carcinoma espinocelular houve predomínio de CD68 (100%) acompanhado de CD8 (41,7%) e CD57 (8,3%) com nenhuma marcação também para CD4; na paracoccidiodomicose observou-se paridade entre CD68 e CD8, (42,6% em ambos), seguido de CD4 (28,6%) e nenhuma marcação para CD57. O estudo demonstrou que as reações inflamatórias na hiperplasia fibrosa inflamatória e lesão periférica de células gigantes são características de traumas contínuos e infecções secundárias; que no carcinoma espinocelular e paracoccidiodomicose as variações de imunomarcação expressam a dinâmica da resposta imunológica de cada indivíduo e que, os macrófagos presentes podem ter reduzida a capacidade de apresentação de antígenos.

Palavras-chave: hiperplasia fibrosa inflamatória, lesão periférica de células gigantes, carcinoma espinocelular, paracoccidiodomicose, células inflamatórias, imunohistoquímica

ABSTRACT

Oral health is essential to the health of the organism. The organic integrity results of the interdependence of both oral and systemic health. In this context, the early diagnosis of lesions affecting the oral cavity can minimize or avoid the aggravation of many pathological processes. Reaction lesions, fibrous inflammatory hyperplasia and peripheral giant cell lesion lack immunohistochemical studies that characterize the inflammatory cells. Studies are also scarce on lesions for paracoccidioidomycosis and oral squamous cell carcinomas. The objective of this research was to perform immunohistochemical analysis of the cells present in the inflammatory infiltrate of the four relevant pathological changes in the oral cavity: inflammatory fibrous hyperplasia, peripheral giant cell lesion, paracoccidioidomycosis and squamous cell carcinoma. Specimens were obtained from the files of the Laboratory of Pathology, School of Dentistry, Federal University of Mato Grosso do Sul and analyzed for the presence of labels: detection of CD4 T helper lymphocytes, CD8 for detection of cytotoxic T lymphocytes, CD68 for labeling macrophages, and CD57 for labeling natural killer cells (NK). There was variation in the distribution of immunohistochemical labels of the studied lesions. In fibrous hyperplasia inflammatory, CD8 (75%) and CD68 (62.5%) predominated, followed by CD57 (12.5%) and no labeling for CD4; the peripheral giant cell lesions reported the highest label on CD68 (100%), followed by CD8 (42.9%) and no labeling for CD4 or CD57. As for squamous cell carcinoma, CD68 (100%) predominated, followed by CD8 (41.7 %) and CD57 (8.3%), and no marking was reported for CD4. Regarding paracoccidioidomycosis, parity between CD68 and CD8 (both 42.6%) was seen, followed by CD4 (28.6%) and no labeling for CD57. The study demonstrated that inflammatory reactions in fibrous inflammatory hyperplasia and peripheral giant cell lesion are characteristics of continuous trauma and secondary infections; that in squamous cell carcinoma and paracoccidioidomycosis the variations in immunolabeling express the dynamics of the immune response of each individual; and that the macrophages present may have the ability of antigen presentation reduced.

Keywords: fibrous inflammatory hyperplasia, peripheral giant cell lesion, squamous cell carcinoma, paracoccidioidomycosis, inflammatory cells, immunohistochemical analysis.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Distribuição de marcadores imunohistoquímicos nas amostras classificadas das como HFI no Laboratório de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia da UFMS em Campo Grande, MS – julho de 2011- julho de 2012 (n=8)..... | 31 |
| Tabela 2 – Distribuição de marcadores imunohistoquímicos nas amostras classificadas como LPCG no Laboratório de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia (Faodo) da Universidade Federal de Mato Grosso Sul (UFMS) em Campo Grande, MS – julho de 2011- julho de 2012 (n=7)..... | 33 |
| Tabela 3 – Distribuição de marcadores imunohistoquímicos nas amostras classificadas como CEC no Laboratório de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia da UFMS em Campo Grande, MS – julho de 2011- julho de 2012 (n=12)..... | 35 |
| Tabela 4 – Distribuição de marcadores imunohistoquímicos nas amostras classificadas como lesões bucal por PCM no Laboratório de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia da UFMS em Campo Grande, MS – julho de 2011- julho de 2012..... | 37 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Distribuição das amostras de lesão bucal obtidas no Laboratório de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia (Faodo) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) em Campo Grande, MS – julho de 2011- julho de 2012 (n=34)..... 30
- Figura 2 – Lesão de cavidade bucal classificada como HFI. (a) Tonsila humana controle positivo para CD57 40X. (b) Tonsila humana controle negativo para CD57 40X. (c) HE 40X e (d) Células imunomarcadas para CD57 40X..... 32
- Figura 3 – Lesão de cavidade bucal classificada como LPCG. (a) Tonsila humana controle positivo para CD8 40X. (b) Tonsila humana controle negativo para CD8 40X. (c) HE 40X e (d) Células imunomarcadas para CD8 40X..... 34
- Figura 4 – Lesão de cavidade bucal classificada como CEC. (a) Tonsila humana controle positivo para CD68 40X. (b) Tonsila humana controle negativo para CD68 40X. (c) HE 40X e (d) Células imunomarcadas para CD68 40X..... 36
- Figura 5 – Lesão de cavidade bucal resultante da PMC. (a) Tonsila humana controle positivo para CD4 40X. (b) Tonsila humana controle negativo para CD4 40X. (c) células imunomarcadas para CD4 40X e (d) HE 40X..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|--|
| HFI | Hiperplasia fibrosa inflamatória |
| LPCG | Lesão periférica de células gigantes |
| CEC | Carcinoma espinocelular |
| PCM | Paracoccidiodomicose |
| CD | Cluster of Differentiation |
| Th1 | Linfócito T helper tipo 1 |
| Th2 | Linfócito T helper tipo 2 |
| HPV | Human Papiloma Virus |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer |
| TAM | Macrófago associado ao tumor |
| M1 | Macrófago do tipo 1 |
| M2 | Macrófago do tipo 2 |
| FAODO | Faculdade de Odontologia |
| UFMS | Universidade Federal de Mato Grosso Do Sul |
| EUA | Estados Unidos da América |
| ABC | Avidin-biotin peroxidase complex |
| DAB | Diaminobenzidina |
| HE | Hematoxilina-Eosina |
| NK | <i>Natural killer</i> |
| INF- γ | Interferon gamma |
| INF- α | Interferon alfa |
| IL | Interleucina |
| TGF- α | Fator de necrose tumoral alfa |

| | |
|------|---|
| MHC | molécula de histocompatibilidade |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| FGF | <i>Fibroblast growth factor</i> |
| NO | Óxido nítrico |
| PDGF | <i>Platelet-derived growth factor</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 16 |
| 2.1 Lesões Bucais..... | 16 |
| 2.1.1 Hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI)..... | 18 |
| 2.1.2 Lesão periférica de células gigantes (LPCG)..... | 19 |
| 2.1.3 Carcinoma espinocelular (CEC)..... | 21 |
| 2.1.4 Paracoccidiodomicose (PCM)..... | 22 |
| 2.1.5 Inflamação..... | 24 |
| 3 OBJETIVOS..... | 27 |
| 3.1 Geral..... | 26 |
| 3.2 Específicos..... | 26 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 27 |
| 4.1 Caracterização do estudo..... | 27 |
| 4.2 Amostras, coleta, seleção, critério de inclusão e análise histopatológica..... | 27 |
| 4.3 Imunohistoquímica..... | 28 |
| 4.4 Análise das lâminas imunomarcadas..... | 29 |
| 4.5 Aspectos éticos..... | 29 |
| 5. RESULTADOS..... | 29 |
| 5.1 Classificação histopatológica das amostras..... | 29 |
| 5.2 Análise das amostras classificadas como Hiperplasia Fibrosa Inflamatória..... | 30 |
| 5.3 Análise das amostras classificadas como Lesão Periférica de Células Gigantes (LPCG)..... | 33 |
| 5.4 Análise das amostras classificadas por Carcinoma Espinocelular (CEC)..... | 35 |
| 5.5 Análise das amostras classificadas por Paracoccidiodomicose (PCM)..... | 37 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 39 |

| | |
|------------------------------------|-----------|
| 7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO..... | 43 |
| 8 CONCLUSÃO..... | 44 |
| REFERÊNCIAS..... | 45 |
| ANEXO I..... | 59 |
| ANEXO II..... | 60 |

1 INTRODUÇÃO

A saúde bucal é parte essencial da saúde do organismo humano e do bem estar social, diretamente relacionada com a melhora da auto-estima. Neste contexto, entende-se que a integridade orgânica resulta da interdependência da saúde bucal e sistêmica; as lesões bucais colaboram sobremaneira no diagnóstico e acompanhamento de doenças próprias da cavidade bucal e das sistêmicas, nela manifestadas (ALMEIDA; CORRÊA, 2003; GALLARRETA et al., 2008; AMARAL; MIRANDA; PIRES, 2009).

As populações menos assistidas na área da saúde, em especial a bucal, podem sofrer perdas parciais ou totais dos dentes (edentulismo). As pessoas afetadas por estes acontecimentos necessitam do uso de próteses, sendo o desgaste das próteses e a higienização inadequada os fatores que propiciam a proliferação de placas bacterianas. Assim, tais fatores são considerados os dois principais fatores etiológicos da HFI (Hiperplasia Fibrosa Inflamatória) (GOIATO et al., 2005; FALCÃO et al., 2009).

Diversos fatores influenciam a saúde bucal como, condição sócio-econômica, idade, estado nutricional, regionalismo, medicamentos, higiene e doenças sistêmicas. A cavidade bucal responde às agressões e torna-se campo fértil para o desenvolvimento de alterações patológicas de gravidade variada (AMARAL; MIRANDA; PIRES, 2009; UMBELINO JÚNIOR, 2010; FERREIRA et al., 2012).

As lesões prevalentes da cavidade bucal são representadas por processos reacionais, com destaque para as Hiperplasias Fibrosas Inflamatórias (HFI) e Lesão Periférica de Células Gigantes (LPCG). Embora esses processos se restrinjam ao ambiente bucal e não evoluam para a fatalidade, podem resultar em modificações estruturais que afligem em demasia a vida do paciente (BOMFIM et al., 2008).

A Paracoccidiodomicose (PCM) e o Carcinoma Espinocelular (CEC) representam as outras alterações patológicas prevalentes no ambiente bucal. Ambas constituem enfermidades graves; tem em comum a agressividade que somada à debilidade orgânica por elas podem resultar no óbito. Os pacientes que sobrevivem a esses processos, após terapias contínuas, e por longo período levam por toda a vida as cicatrizes físicas e psicológicas (PANIAGO et al., 2003; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; MARQUES et al., 2007).

A PCM é causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Endêmica na América Latina e de distribuição heterogênea. Acomete a população rural ou correlata na fase mais produtiva da vida. E embora não exista tratamento curativo para esta infecção, o diagnóstico precoce e o tratamento podem prevenir a disseminação do fungo. Ressalta-se que, a grande maioria desse diagnóstico é obtida por lesões bucais. A infecção crônica predomina nos adultos e as formas aguda e subaguda nas crianças ou adolescentes. (PANIAGO et al., 2003; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006;).

A ciência tem avançado no combate ao câncer por meio de diagnóstico precoce e terapias orientadas na tentativa de minimizar o sofrimento e alcançar a cura para esta moléstia de grande letalidade. O CEC representa a neoplasia mais prevalente na cavidade bucal, tem como causas principais o tabaco e o álcool. Embora sua letalidade seja considerada alta, diagnóstico e tratamento no início do processo pode melhorar a qualidade de vida, a sobrevida ou mesmo alcançar a cura (BITTAR et al., 2010; BRENER et al., 2007).

Nas lesões reacionais a literatura carece de pesquisas que esclareçam os tipos de células leucocitárias presentes. A literatura científica ainda é escassa em relação à identificação das células que constituem o infiltrado inflamatório nas lesões por CEC e PCM

Faltam estudos imunohistoquímicos que identifiquem as células que compõem o infiltrado inflamatório das lesões patológicas da cavidade bucal, permitindo desta forma inferir a condição imunológica do paciente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lesões bucais

A estomatologia é a especialidade da odontologia que tem por objetivo o estudo das lesões bucais e órgãos anexos além das repercussões bucais das doenças sistêmicas. Tal especialidade avalia a saúde da cavidade bucal através de

sinais e sintomas clínicos e de modificações morfofisiológicas visando o diagnóstico e tratamento dos diversos processos patológicos (MARCUCCI, 2005).

A expectativa de vida no Brasil e no mundo tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas e com ela, as alterações morfofisiológicas, que comprometem o organismo como um todo. A cavidade bucal como parte integrante e indissociável do organismo reflete em suas estruturas constitutivas os reveses patológicos sistêmicos e alterações secundárias devido ao uso de medicamentos (AMARAL; MIRANDA; PIRES, 2009; NEVILLE, et al., 2009; UMBELINO JÚNIOR, 2010).

A evolução desses processos patológicos pode determinar lesões debilitantes, como deformidades físicas e comprometimento fisiológico, além de distúrbios emocionais e comportamentais podendo chegar a sequelas anatômica, funcionais, invalidez e até óbito (FALCÃO et al., 2010; FERREIRA et al., 2012).

A identificação das lesões bucais causadas por doenças sistêmicas possibilita o diagnóstico precoce, melhor prognóstico e melhora na qualidade de vida ou de sobrevivência do paciente. A incidência de 60% de lesões na mucosa bucal oriundas de doenças sistêmicas direciona para a necessidade de se incluir as estruturas bucais no exame físico dos pacientes com afecções imunodermatológicas (COSTA, SOARES, KOMATSU, ALBUQUERQUE, 2009; RIBEIRO et al., 2012)

As transformações estruturais sistêmicas que ocorrem com o evoluir dos anos são acompanhadas de modificações no ambiente bucal, demonstradas por mucosas atróficas e frágeis mais sensíveis às injúrias. Desta forma, modificam-se as frequências dos processos patológicos relacionados com idade e o gênero, também por influências genéticas, regionais, comportamentais e sócio-econômicas (COELHO; ZUCOLOTO; LOPES, 2000; TAMARIT-BORRÀS et al., 2005; LOPES, 2000; RAMOS et al., 2008; AMADEI et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2009).

Outro dado a se considerar correlaciona as prevalências das alterações patológicas que acometem a cavidade bucal com as variações devido à heterogeneidade dos serviços em diagnósticos, (BERTOJA et al., 2007; BUCHNER; SHNAIDERMAN-SHAPIRO; VERED, 2010; HIPÓLITO; MARTINS, 2010)

De forma geral, as lesões mais comuns da cavidade oral descritas na literatura são HFI e LPCG), PCM e CEC (MENEZES FILHO, 1991; PANIAGO et al., 2003; BARRETO et al., 2006; FERNANDES; BRANDÃO; LIMA, 2008; CHEN et al.,

2010 CARVALHO; SOARES; FERREIRA et al., 2012; FIGUEIREDO, 2012; PEREIRA et al., 2013).

2.1.1 Hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI)

As HFI são processos proliferativos benignos de origem inflamatória, induzidos por traumas crônicos em geral, pelo uso de próteses. Estas lesões recebem a denominação de epúlide fissurada, terminologia aplicada a qualquer tumor de gengiva ou de mucosa alveolar. Seu desenvolvimento caracteriza resposta tecidual a estímulos mecânicos e crônicos. Na tentativa de se adaptar à nova situação imposta, o tecido conjuntivo em contato com a borda da prótese reage com a formação de hiperplasia (COELHO; ZUCOLOTO; LOPES, 2000; NEVILLE, et al., 2009).

Este crescimento reacional afeta na maioria das vezes indivíduos do gênero feminino portadores de próteses, na faixa etária dos 41 a 70 anos (FIROOZMAND; ALMEIDA; CABRAL, 2005; TAMARIT-BORRÀS et al., 2005; AMADEI et al., 2009; PEREIRA et al., 2013).

De acordo com Birman et al. (1981), as regiões mais comprometidas correspondem a gengiva do maxilar e a da mandíbula na região anterior e posterior.

A investigação de lesões da mucosa bucal de usuários de álcool e de outra droga, em Londres, Inglaterra, demonstrou que a HFI representou 8,8% do total de casos registrados (HARRIS, 2004).

Outro estudo avaliando 300 idosos, onde 100 eram portadores de prótese total, 42% dos examinados apresentavam algum comprometimento patológico. Houve a prevalência de lesões traumáticas, entre as quais 12% corresponderam à HFI (papilomatosa), por câmara de sucção (FRANÇA; SOUZA, 2003).

O crescimento da população mundial traz consigo o aumento da população idosa e os altos índices de edentulismo, que se soma às condições precárias de saúde bucal, na população brasileira desassistida. Estas associações, desfavoráveis para o indivíduo e seu ambiente bucal colaboram para o incremento das lesões reacionais, como a HFI, entre outras, devido ao uso de próteses mal adaptadas (BOMFIM et al., 2008; ROSA et al., 2008).

Levantamentos epidemiológicos de lesões da cavidade bucal em diversos estados do Brasil, tais como Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco demonstraram a prevalência das HFI entre as lesões da cavidade bucal. Estes achados foram corroborados por estudos semelhantes em outros países, tais como Índia e Espanha (MORESCO; NORA FILHO; BALBINOT, 2003; FREITAS, 2004; TAMARIT-BORRÀS et al., 2005; MARIN et al., 2007; PRADO; TREVISAN; PASSARELLI, 2010; MARTINELLI et al., 2011; RAMU, 2012; RODRIGUES, 2012; PEREIRA et al., 2013)

Em geral a HFI afeta a face vestibular da mucosa alveolar, mas pode se desenvolver na face palatina ou lingual. É formada por massa tumoral de tecido conjuntivo fibroso, causada por traumatismo de borda de prótese total ou prótese parcial removível com adaptação inadequada. A massa tecidual é firme e fibrosa e às vezes eritematosas e ulceradas com dimensões variadas que podem atingir todo o rebordo (NEVILLE et al., 2009).

O aspecto microscópico mais marcante é a hiperplasia de tecido conjuntivo fibroso com feixes conjuntivos densos, usualmente recobertos por epitélio hiper e paraqueratótico, com hiperplasia irregular das papilas. Áreas focais de ulceração são comuns, especialmente entre as pregas; presença de infiltrado inflamatório crônico de intensidade variável, constituído de linfócitos, plasmócitos e às vezes neutrófilos pode ser observada (NEVILLE et al., 2009).

2.1.2 Lesão periférica de células gigantes (LPCG)

A lesão periférica de células gigantes (LPCG) é uma lesão reacional, a agentes irritantes ou traumas; exoftica, de base séssil ou pediculada. Acomete exclusivamente a mucosa gengival e rebordo alveolar. Na literatura não existem relatos de casos de localizações extragengivais (CAVEZZI JUNIOR; SARTORI; AGUIAR, 2008; NEVILLE et al., 2009).

Inicialmente este processo foi denominado granuloma reparador de células gigantes embora, com pouca evidência de resposta reparativa; devido ao predomínio de lesão destrutiva, atualmente é descrito como LPCG. Algumas lesões,

à semelhança das neoplasias, apresentam comportamento agressivo e tendem à recidiva (ADORNATO; PATICOFF, 2001; MARCUCCI, 2005; NEVILLE et al., 2009).

De ocorrência incomum, mas não rara, afeta a mandíbula e a maxila e representa a contraparte dos tecidos moles da lesão central do osso devido à similaridade das suas alterações microscópicas (KATSIKERIS; KAKARANTZA-ANGELOPOULOU; ANGELO-POULOUS, 1988; CAVEZZI JUNIOR; SARTORI; AGUIAR, 2008).

Apesar de a maioria dos autores considerarem o comportamento da LCGP benigno, há relatos de diferentes graus de agressividade, detectada por exames clínicos e radiográficos, relacionados com atividade celular proliferativa, comprovada por meio de técnicas histoquímicas e ou imunohistoquímicas (DE CARLI et al., 2008).

Em alguns países estudos histopatológicos de lesões reativas hiperplásicas da boca demonstraram prevalências diversas para a LPCG: 18,7% em Israel no Irã 64% e na Índia a 9% (ZAREI; CHAMANI; AMANPOOR, 2007; BUCHNER; SHNAIDERMAN-SHAPIRO; VERED, 2010; RAMU, 2012; RODRIGUES, 2012).

No Brasil, a LPCG figurou entre as dez lesões bucais mais prevalentes de crianças e adolescentes; estudo retrospectivo de processos proliferativos não neoplásicos na cavidade bucal a constatarem entre as quatro lesões mais prevalentes (CAVALCANTE et al., 1999; AMADEI et al., 2009).

Na LPCG a lâmina própria apresenta infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos, macrófagos, células ovaladas (miofibroblastos), fibroblastos, células gigantes multinucleadas que, por vezes, podem apresentar distribuição uniforme em meio a um estroma colagenoso rico em vasos. Podem estar presentes calcificações distróficas ou ossificações metaplásicas principalmente na periferia da lesão (CAPELOZZA; TAVEIRA; PAGIN, 2007; MATOS et al., 2010).

Filioreanu et al., 2009 descreveram que os miofibroblastos e fibroblastos ativados são as células mais importantes na lesão e, que os miofibroblastos estão dispostos na região perivascular e se estendem até o endotélio.

Estudos imunohistoquímicos de LPCG indicam que as células gigantes multinucleadas exibem atividade osteoclástica e macrofágica,. Tem origem provável da fusão de células mononucleares, embora esta hipótese ainda não tenha sido elucidada (TIFFE; AUFDEMORTE, 1997; TIAN; LI; YU, 2003; FRANÇA et al., 2010).

2.1.3 Carcinoma espinocelular (CEC)

O carcinoma espinocelular representa 90% a 95% de todas as neoplasias malignas que afetam a cavidade bucal (NEVILLE et al., 2009; GASSEN; SILVA; MORAES, 2005).

A estimativa deste câncer para 2012, válidas para 2013, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) foi de 14.170 novos casos, sendo 9.990 em homens e 4.180 em mulheres. Estes dados representam um risco estimado de 10 casos novos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres. Os estados das regiões centro-sul apresentaram os índices mais elevados da doença. Os principais fatores de risco para o câncer de boca podem ser físicos, químicos e biológicos; dentre estes se destacam como agentes etiológicos do câncer na mucosa bucal, tabaco, álcool, radiação solar e vírus do Papiloma Humano (HPV) (SANTOS et al., 2009; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2012).

No mundo são diagnosticados mais de trezentos mil casos de câncer bucal por ano. Estes dados juntamente com a taxa de mortalidade mundial por esta doença, 3 a 10%, fazem do câncer bucal um dos grandes problemas de saúde pública (BITTAR et al., 2010).

No microambiente inflamatório e tumoral os macrófagos são as células de defesa mais importantes; atuam na dependência da complexa rede de sinalização na qual estão inseridos. Os macrófagos associados ao tumor (TAM) agem de forma contraditória, ora combativa, por meio de macrófagos do tipo 1 (M1), ora supressora da resposta imune, na presença de macrófagos tipo 2 (M2) favorecendo o crescimento do tumor (LIN; KARIN, 2007).

Atualmente, têm-se discutido sobre o importante papel desenvolvido pelos macrófagos no microambiente tumoral, demonstrando que estes fagócitos podem apresentar diferentes fenótipos de acordo com sua localidade, como é o caso dos macrófagos associados a tumores (TAM's) que apresentam o fenótipo M2. Este tipo de macrófago é capaz de produzir citocinas inibitórias, além de metaloproteinases e fatores de crescimento tumoral e vasoendotelial (HAMMES et al., 2007).

No CEC as células epiteliais neoplásicas proliferam em forma de ninhos e de cordões, degradam a membrana basal e invadem o tecido conjuntivo. Apresentam

diferentes graus de semelhança com o tecido de origem, pleomorfismo celular e nuclear, mitoses atípicas e presença ou não de pérolas córneas. Estas características relacionadas com a diferenciação celular permitem graduar a neoplasia. As neoplasias indiferenciadas são de difícil diagnóstico e requerem a técnica de imunohistoquímica para a sua comprovação (MASHBERG; SAMIT, 1995; NEVILLE et al., 2009).

A prevalência desta neoplasia varia de 21% a 47% e, em geral, prevalece mais em homens com idade acima dos 60 anos. E, neles a manifestação da doença se dá com menos idade que nas mulheres (MENEZES FILHO, 1991; DEDIVITIS et al., 2004; BRITO et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009; BATISTA et al., 2010; MOREIRA et al., 2011)

As frequências são mais altas na língua e no assoalho da boca (DEDIVITIS et al., 2004; SANTOS et al., 2009; ÁLVAREZ MARTÍNEZ et al., 2010).

Estudos imunohistoquímicos sobre a constituição do infiltrado inflamatório em CEC de língua e lábio inferior demonstraram o predomínio de linfócitos T CD8 sobre T CD4 além de, descreverem que o aumento de CD4 foi acompanhado do aumento do infiltrado inflamatório (SILVEIRA, 2007).

A análise imunohistoquímicas do infiltrado inflamatório da região peritumoral, constituído na sua maioria por células mononucleares, demonstrou o predomínio de linfócito T citotóxico (CD8) em relação aos linfócitos T helper (CD4). O segundo tipo de células leucocitárias observadas foi representado pelos linfócitos B (CD20) acompanhados por macrófagos (CD68) e neutrófilos (CD15) (VIEIRA, 2009).

2.1.4 Paracoccidioidomicose (PCM)

A PCM é uma micose sistêmica causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, cuja lesão depende da capacidade de induzir no hospedeiro, resposta inflamatória crônica granulomatosa. A infecção é descrita principalmente na América do Sul, com destaque para o Brasil, Colômbia, Venezuela, Uruguai, Argentina e América Central. No Brasil a prevalência é maior nos estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul, com taxa de endemia heterogênea, mas, com graves efeitos incapacitantes e morte prematura o que a

torna problema de saúde pública (PANIAGO et al., 2003; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; NEVILLE, et al., 2009).

No Brasil foi descrita como a micose sistêmica com a mais alta taxa de mortalidade; nesta constatação, a Região Centro-Oeste respondeu pelo segundo lugar. Foi considerada a doença mais prevalente em indivíduos do gênero masculino que desenvolvem atividades agrícolas e correlatas com idade entre 30 e 60 anos (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; BISINELLI et al., 2001; COUTINHO et al., 2002; PANIAGO et al., 2003).

O *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico, termo dependente, que no meio ambiente apresenta a forma filamentosa, com propágulos infectantes, os conídios. A infecção primária ocorre por meio da inalação de conídios, que nos pulmões se diferenciam em leveduras, forma infectante. Após a infecção se dissemina através das correntes sanguínea e linfática atingindo diversos órgãos. No entanto são as manifestações bucais que permitem com maior frequência o diagnóstico da doença. (PALMEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; RASSI et al., 2009; FORTES et al., 2011;).

O controle da infecção, por parte do organismo hospedeiro, se efetiva por meio do desenvolvimento de granulomas densos que requerem resposta imune celular efetiva, padrão Th1 (Linfócito T *helper* tipo 1), caracterizada por liberação de citocinas ativadoras de linfócitos TCD4 e TCD8.

A virulência do fungo está associada à glicoproteína de superfície de parede, a gp43, entre outras, também envolvida no favorecimento da sua fuga dos mecanismos de defesa do hospedeiro, além de facilitar sua capacidade de fixação no tecido (KAMINAGAKURA et al., 2007; FORTES et al., 2011;).

As manifestações bucais da paracoccidiodomicose são mais prevalentes nos lábios, gengivas, palato e língua). Demonstradas por ulcerações com granulações, denominadas moriformes, focais ou multifocais que comprometem mais comumente as mucosas alveolar, gengival e palatina e os lábios (BISINELLI et al., 2001; SILVA, 2007; NEVILLE et al., 2009).

A mucosa bucal exhibe hiperplasia pseudoepiteliomatosa e microabcessos permeados por infiltrado inflamatório crônico. As formas fúngicas estão livres ou no interior de células gigantes multinucleadas. Os granulomas são bem estruturados ou frouxamente arranjados, formados por células epitelióides, macrófagos, linfócitos,

plasmócitos e células gigantes multinucleadas (NEVILLE et al., 2009; PAGLIARI et al., 2010).

Estudos de Kaminagakura et al. (2007) identificaram através da imunohistoquímica as células da resposta inflamatória induzidas pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Os marcadores para a presença de macrófagos (CD68), população global de linfócitos (CD45), linfócitos T (CD4 e CD8), linfócito B (CD20), granulócitos (CD15), *Natural killer* (CD57) e células de Langerhans (S100) foram localizados na resposta tecidual caracterizada por microabscessos, reação não granulomatosa e granulomas densos. Os granulomas densos mostraram no centro células CD68 e CD4; na periferia predomínio de linfócito CD45, com ênfase para os CD4, células CD8 e S100 em menor número e, poucas CD20. Entretanto, nas reações não granulomatosas houve equilíbrio entre os linfócitos CD4 e CD8 mescladas por células CD68; menor número de células gigantes multinucleadas e estruturas fúngicas mais abundantes. Nos microabscessos houve predomínio quase exclusivo de células CD15.

Pagliari et al. (2010) associaram a densidade dos granulomas ao tipo de resposta imune: granulomas compactos foram associados à resposta imune Th1; granulomas frouxos à resposta Th2 e, um terceiro padrão de resposta, formado pelos dois tipos de granuloma e citocinas de respostas Th1 e Th2. Para os autores, embora os linfócitos T CD4 sejam as principais células da resposta imune celular na PCM, as células T CD8 e as *NK* são pouco abordadas, entretanto agem através da liberação de granzima e perforina.

Poucos estudos caracterizam a resposta imune nas lesões bucais induzidas pelo *Paracoccidioides brasiliensis* (KAMINAGAKURA et al., 2007; PAGLIARI et al., 2010).

2.1.5 Inflamação

A Inflamação é a capacidade de o organismo responder às agressões visando a destruição do agente etiológico e a reparação da área lesada por cicatrização ou regeneração. Este processo possui células capazes de fagocitar e destruir micro-organismos e células malignas por meio espécies reativas de oxigênio e enzimas.

Estas células compõem o infiltrado inflamatório constituído por leucócitos como neutrófilos, linfócitos, macrófagos, entre outros (CONSOLARO, 2009).

Os linfócitos podem ser divididos em três grandes grupos, os linfócitos T, B e as células *Natural Killer (NK)*. Os linfócitos T, por sua vez, são representados pelos subtipos: T CD4 (*helper*) e T CD8 (citotóxico). As células T CD4 ativadas liberam citocinas que modulam a resposta de macrófagos, linfócitos T CD8, linfócitos B e outras células. Já as células *NK* atuam em consonância com os linfócitos TCD8, eliminando células infectadas ou neoplásicas (CONSOLARO, 2009).

Com a função de destruir partículas maiores temos os macrófagos, que após fagocitose de micro-organismos ou de células cancerosas promovem a apresentação de peptídeos no contexto de moléculas de MHC de classe II, ativando linfócitos T CD4 específicos, aptos na síntese de citocinas que incrementarão a sua eficiência fagocítica e a expansão de linfócitos T CD8 específicos ao reconhecimento de antígenos tumorais e de micro-organismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008b).

Os macrófagos associados ao tumor, denominados de (TAM), podem apresentar os fenótipos M1 e M2 dependendo dos sinais do microambiente. Quando ativados de forma clássica, caracterizada por produção de INF- γ (Interferon gamma), TGF- α (Fator de necrose tumoral alfa), direcionam-se para o tipo M1 que apresentam alta capacidade de fagocitose e de geração de espécies reativas de oxigênio, capazes de destruir células neoplásicas e fungos. Se de forma alternativa, por meio de citocinas supressoras, com a síntese de IL4, IL10 e IL-13, orienta-os para o tipo M2, relacionados ao recrutamento, sobrevivência e multiplicação do câncer, maior secreção de citocinas antiinflamatórias e fatores de crescimento, que inibem a resposta do organismo às agressões, favorecem a proliferação neoplásica e as metástases através da liberação de fatores de crescimento e formação de novos vasos. A polarização para M1 ou M2 demonstra alternância dinâmica no conjunto de ativação dessas células. (CONDEELIS; POLLARDS, 2006; SICA; MONTOVANI, 2006; HAMMES, 2007).

As alterações patológicas da boca desempenham papel de destaque no planejamento em saúde, participando diretamente na prevenção de diversas doenças demonstradas por lesões primárias ou secundárias, oriundas de distúrbios sistêmicos. O conhecimento destes processos favorece o diagnóstico precoce e tratamento adequados. Desta forma pode minimizar os danos causados ou mesmo

obter a cura; na sua impossibilidade, melhorar a qualidade de vida (NEVILLE et al., 2009).

Considerando que a literatura é escassa em estudos relacionados à detecção, através de imunomarcção, das células que compõem o infiltrado inflamatório nas lesões causadas por CEC e PCM e, ausente para HFI e LPCG, este trabalho representa um importante estudo, sendo pioneiro em nossa região e contribuirá com a literatura básica sobre esse tema, para a elucidação de aspectos ligados a prognóstico e tratamento destes processos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Identificação por imunohistoquímica das células do infiltrado inflamatório das lesões bucais: por anticorpos anti-CD8, anti-CD4, anti-CD57 e anti-CD68.

3.2 Específico

- Identificar por IHQ as células do infiltrado inflamatório de pacientes com:
 - Hiperplasia Fibrosa Inflamatória;
 - Lesão Periférica de Células Gigantes;
 - Carcinoma Espinocelular e
 - Paracoccidiodomicose.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização do estudo

Este estudo caracteriza-se como uma pesquisa qualitativa descritiva seccional, de dados secundários, baseada na caracterização das células do infiltrado inflamatório de lesões bucais de pacientes com Hiperplasia Fibrosa Inflamatória, Lesão Periférica De Células Gigantes, Carcinoma Espinocelular e Paracoccidioidomicose imunomarcadas pelos anticorpos anti-CD8, anti-CD4, anti-CD57 e anti-CD68.

4.2 Amostras, coleta, seleção, critério de inclusão e análise histopatológica

Foram utilizados neste estudo material emblocado em parafina, obtidos do arquivo do Laboratório de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia (Faodo) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Este material foi proveniente de biópsias de lesões de cavidade bucal, realizadas por profissional odontólogo, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Rosana Mara Giordano de Barros (anexo I).

Cada amostra foi colhida por biópsia excisional e incisional utilizando anestesia infiltrativa com octopressin 3%, material cirúrgico como cabo de bisturi tipo Baden-Parker e lâmina de bisturi 15c, curetas de periodontia, tesouras de pontas rombas, porta agulha, agulha e fio de sutura de *nylon* 0,4, gerando o mínimo de desconforto possível ao paciente. Após o procedimento o paciente foi medicado com analgésico.

Os fragmentos obtidos foram fixados em formol a 10%, emblocados em parafina e encaminhados para análise histopatológica com a técnica clássica de Hematoxilina e Eosina. As lâminas foram observadas em microscópio óptico nos aumentos de 40, 100 e 400 vezes por patologista bucal.

Foram selecionadas para análise imunohistoquímica, amostras das quatro lesões prevalentes, previamente diagnosticadas por histopatologia, provenientes do serviço de anatomopatologia da Faodo – UFMS, independente de etnia, gênero, idade e condição social, entre julho de 2011 e julho de 2012. A partir dos casos selecionados foram obtidos novos cortes histológicos para a avaliação imunohistoquímica.

4.3 Imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica (SANTOS et al., 1999) de marcação simples foi realizada em cortes histológicos medindo cerca de 3µm de espessura, estes foram estendidos em lâminas de vidro limpas previamente tratadas com 3-aminopropyltriethoxi-silano (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA). As lâminas com os cortes foram levadas à estufa a 60°C e lá deixadas por 24 horas para melhor adesão do tecido.

Os referidos cortes foram submetidos à recuperação antigênica em calor úmido com tampão citrato pH 6,0 10 mM, com exceção do marcador CD4 cujo tampão utilizado foi EDTA pH 8,0 0,05M. Posteriormente ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 10 vols, foram aplicados sobre os cortes os anticorpos primários anti-CD4 (Invitrogen®, clone: 1F6) para detecção de Linfócitos T *helper*, anti-CD8 (Spring Bioscience®, clone: SP16) para detecção Linfócitos T citotóxicos, anti-CD68 (Dako®, clone: KP1) para marcação de macrófagos e anti-CD57 (Invitrogen®, clone: NK-1) para marcação de Células *Natural Killer* (NK), todos previamente diluídos em tampão PBS com albumina a 1%, de acordo com padronização prévia. As lâminas foram então levadas à incubação a 37°C por 30 minutos e overnight a 4°C.

A detecção dos anticorpos primários ocorreu pelo método da estreptavidina-biotina (ABC), utilizando o sistema de detecção LSAB+ Sys HRP (Dako código K0690) e o cromógeno Diaminobenzidina (DAB) 60mg%. Posteriormente as lâminas foram e contracoradas com hematoxilina.

4.4 Análise das lâminas imunomarcadas

As lâminas foram observadas em microscópio óptico com objetiva de 10X e 40X, por dois observadores independentes ($Kappa = 0,71$). Os casos de leitura discordante foram analisados concomitantemente pelos observadores, a fim de se produzir um consenso.

A quantificação das células imunomarcadas foi realizada de forma subjetiva, avaliando-se 10 campos aleatórios e classificando-os em zero, um e dois, de acordo com a quantidade de células coradas, correspondentes a: ausência, pequena e grande quantidade de células imunomarcadas, respectivamente (PADOVANI, 2013).

A captura foi feita através do Sistema de Captura e Análise de Imagem e de Morfometria, o que permitiu maior resolução e identificação correta para a documentação. Foram consideradas células imunomarcadas as que exibiam características microscópicas de linfócitos e macrófagos, tais como núcleo central maciço preenchendo a maior parte do citoplasma; outras, núcleos grandes, arredondados ou alongados e citoplasma abundante.

4.5 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de ética para pesquisa em seres humanos sob o protocolo nº 2018 (Anexo II) de 10 de junho de 2011.

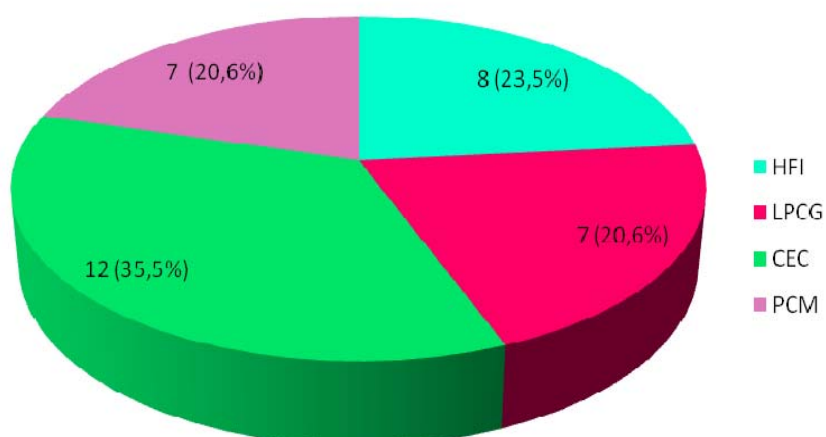
5. RESULTADOS

5.1 Classificação histopatológica das amostras

Após observação microscópica e análise dos laudos emitidos pelo Laboratório de Anatomopatologia da FAODO da UFMS, as amostras analisadas foram

classificadas segundo as alterações histopatológicas e a distribuição destas pode ser observada na figura 1, com predomínio para o carcinoma de células escamosas representando 12 casos do total analisado (35,5%).

Figura -1 Distribuição das amostras de lesão bucal obtidas no Laboratório de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia (Faodo) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) em Campo Grande, MS – julho de 2011 - julho 2012 (n=34)



Nota: HFI= hiperplasia fibrosa inflamatória; LPCG=lesão periférica de células gigantes; CEC= carcinoma espinocelular e PCM= paracoccidiodomicose

5.2 Análise das amostras classificadas como Hiperplasia Fibrosa Inflamatória (HFI)

As amostras classificadas como HFI, foram confirmadas por apresentarem alterações microscópicas identificadas como epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado, acantótico e hiperplásico, sustentado por lâmina própria com intensa proliferação fibroblástica, deposição de fibras colágenas, vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório mononuclear de intensidade variável, constituído por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Os linfócitos se dispõem infiltrando o epitélio, em áreas focais ou na lâmina própria imediatamente abaixo do epitélio (Figura. 2).

A distribuição dos imunomarcadores, observada na tabela 1, relativos à HFI demonstra predomínio de grande quantidade de linfócitos T citotóxicos(CD8)

imunomarcados, seguido de macrófagos (CD68) também em grande quantidade e menor quantidade de células *NK* (CD57).

Tabela 1 – Distribuição de marcadores imunohistoquímicos nas amostras classificadas como HFI no Laboratório de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia da UFMS em Campo Grande, MS – julho de 2011 - julho 2012 (n=8)

| Marcadores | Escore | | | Total |
|------------|------------|------------|------------|----------|
| | 0 n (%) | 1 n (%) | 2 n (%) | |
| CD4 | 7 (87,5%) | 1 (12,5%) | - | 8 (100%) |
| CD8 | - | 2 (25%) | 6 (75%) | 8 (100%) |
| CD68 | 3 (37,5%) | - | 5 (62,5%) | 8 (100%) |
| CD57 | 2 (25%) | 5 (62,5%) | 1 (12,5%) | 8 (100%) |

Nota: escore 0= ausência de marcação; escore 1= pequena quantidade de células imunomarcadas e escore 2= grande quantidade de células imunomarcadas. HFI= hiperplasia fibrosa inflamatória

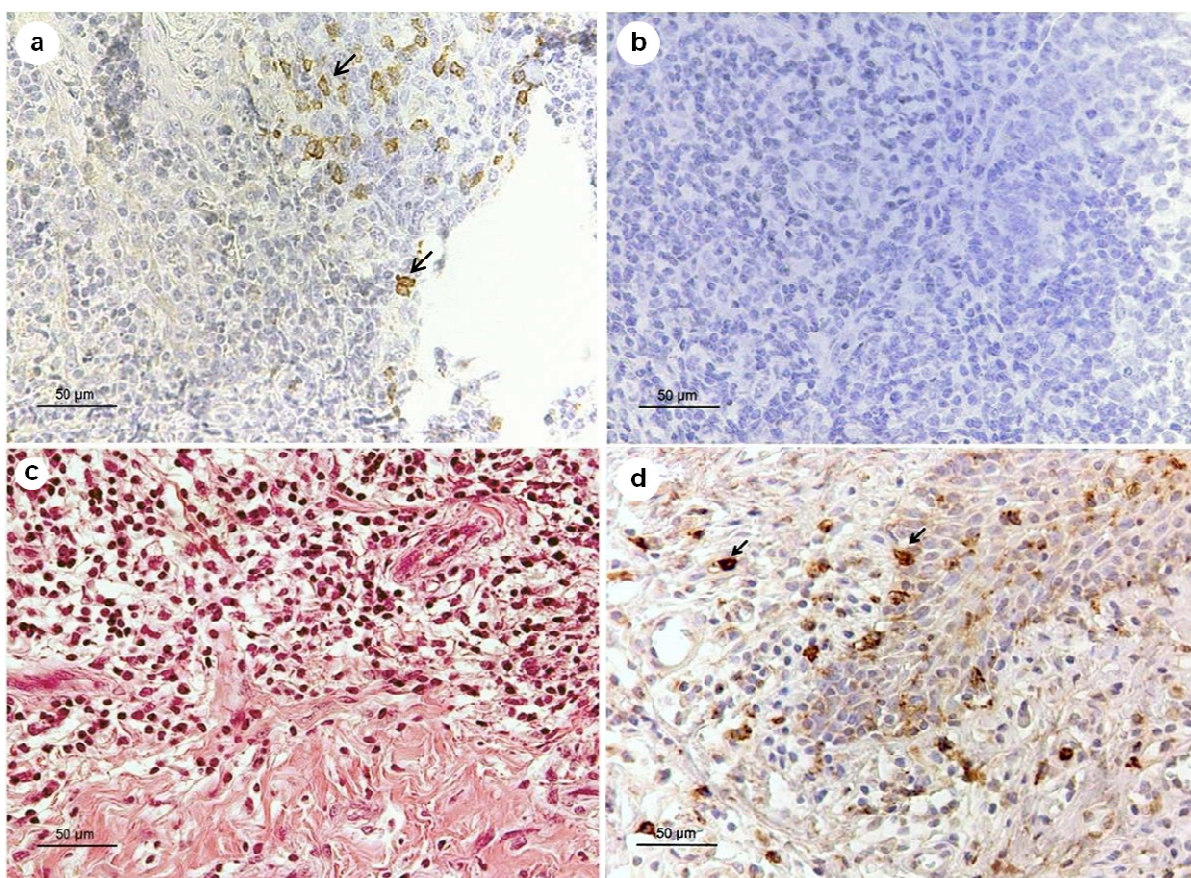


Figura 2 – Lesão de cavidade bucal classificada como HFI. (a) Tonsila humana controle positivo para CD57 40X. (b) Tonsila humana controle negativo para CD57 40X. (c) HE 40X e (d) Células imunomarcadas para CD57 40X (setas)

5.3 Análise das amostras classificadas como Lesão Periférica de Células Gigantes (LPCG)

As amostras consideradas como Lesão Periférica de Células Gigantes (LPCG) foram confirmadas por apresentarem as seguintes características microscópicas: massa tumoral sólida circunscrita com concentrações variáveis de células gigantes multinucleadas permeadas por tecido conjuntivo fibroso com ou sem trabéculas ósseas, vasos sanguíneos congestionados e infiltrado inflamatório constituído por linfócitos, células epitelióides (ovaladas) e células gigantes multinucleadas. (figura 3).

A imunomarcagem para LPCG, evidenciada na tabela 2, demonstra o predomínio de células CD68 positivas em grande quantidade, caracterizadas como macrófagos, seguido da presença em pequena quantidade de linfócitos T citotóxicos (CD8) e células NK (CD57).

Tabela 2 – Distribuição de marcadores imunohistoquímicos nas amostras classificadas como LPCG no Laboratório de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia (Faodo) da Universidade Federal de Mato Grosso Sul (UFMS) em Campo Grande, MS – julho de 2011 - julho 2012 (n=7)

| Marcadores | Escore | | | Total |
|------------|------------|------------|------------|----------|
| | 0 n (%) | 1 n (%) | 2 n (%) | |
| CD4 | 6 (85,7%) | 1 (14,3%) | - | 7 (100%) |
| CD8 | 1 (14,3%) | 3 (42,9%) | 3 (42,9%) | 7 (100%) |
| CD68 | - | - | 7 (100%) | 7 (100%) |
| CD57 | 4 (57,2%) | 3 (42,9%) | - | 7 (100%) |

Nota: escore 0= ausência de marcação; escore 1= pequena quantidade de células imunomarcadas e escore 2= grande quantidade de células imunomarcadas. LPCG=lesão periférica de células gigantes

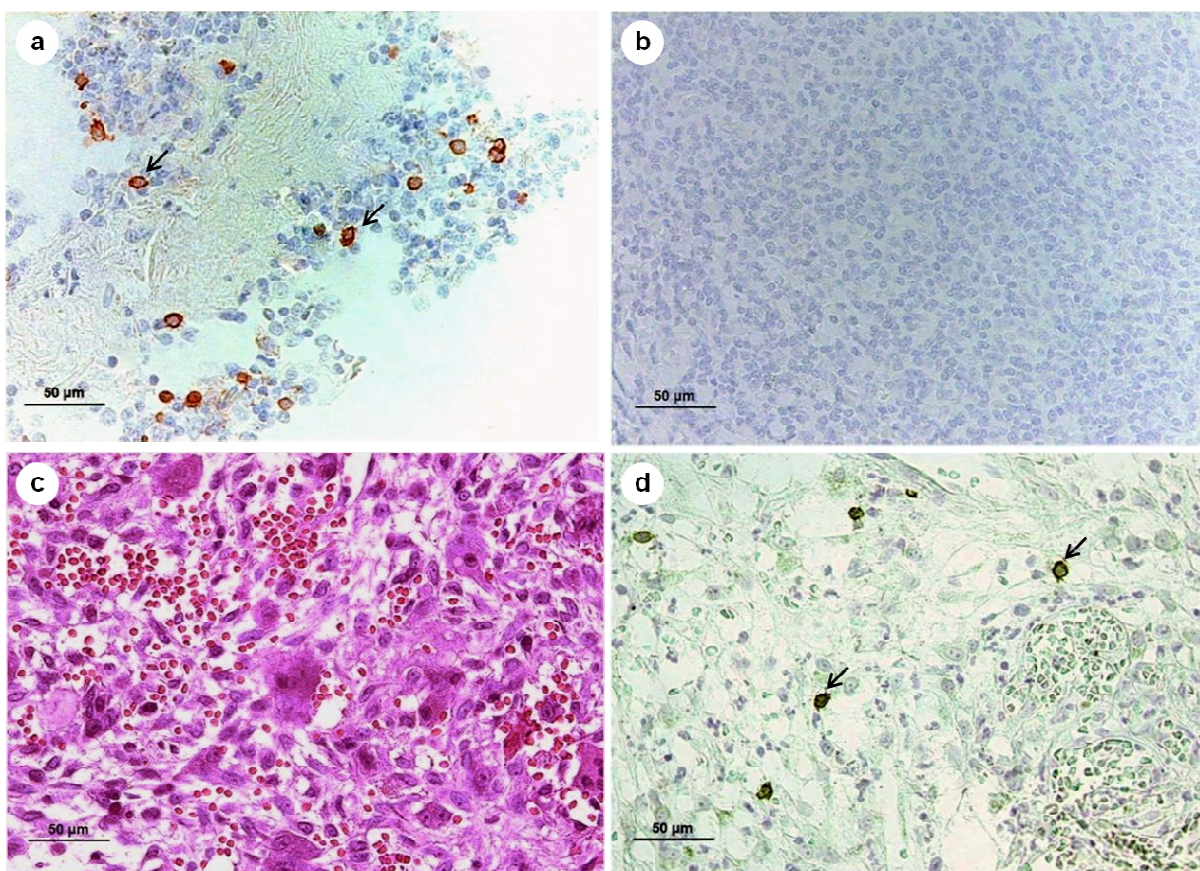


Figura 3 – Lesão de cavidade bucal classificada como LPCG. (a) Tonsila humana controle positivo para CD8 40X. (b) Tonsila humana controle negativo para CD8 40X. (c) HE 40X e (d) Células imunomarcadas para CD8 40X

5.4 Análise das amostras classificadas por Carcinoma Espinocelular (CEC)

As amostras identificadas como CEC, foram comprovadas por exibirem à microscopia células epiteliais neoplásicas permeadas por infiltrado inflamatório mononuclear constituído por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. As células neoplásicas, com diferentes graus de diferenciação possuíam aumento da relação núcleo citoplasmática, mitoses atípicas, figuras bizarras e pérolas córneas de dimensões variáveis sustentadas por escasso tecido conjuntivo (figura 4).

A imunomarcação para CEC, demonstrada na tabela 3, apresenta presença de macrófagos (CD68) em grande quantidade, em todas as amostras observadas, acompanhado da presença em pequena quantidade de células *Natural killer* (CD57).

Tabela 3 – Distribuição de marcadores imunohistoquímicos nas amostras classificadas como CEC no Laboratório de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia da UFMS em Campo Grande, MS – julho de 2011 - julho 2012 (n=12)

| Marcadores | Escores | | | Total |
|------------|------------|------------|------------|-----------|
| | 0 n (%) | 1 n (%) | 2 n (%) | |
| CD4 | 9 (75%) | 3 (25%) | - | 12 (100%) |
| CD8 | 2 (16,7%) | 5 (41,7%) | 5 (41,7%) | 12 (100%) |
| CD68 | - | - | 12 (100%) | 12 (100%) |
| CD57 | 2 (16,7%) | 9 (75%) | 1 (8,3%) | 12 (100%) |

Nota: escore 0= ausência de marcação; escore 1= pequena quantidade de células imuno-marcadas e escore 2= grande quantidade de células imunomarcadas. CEC= carcinoma espinocelular

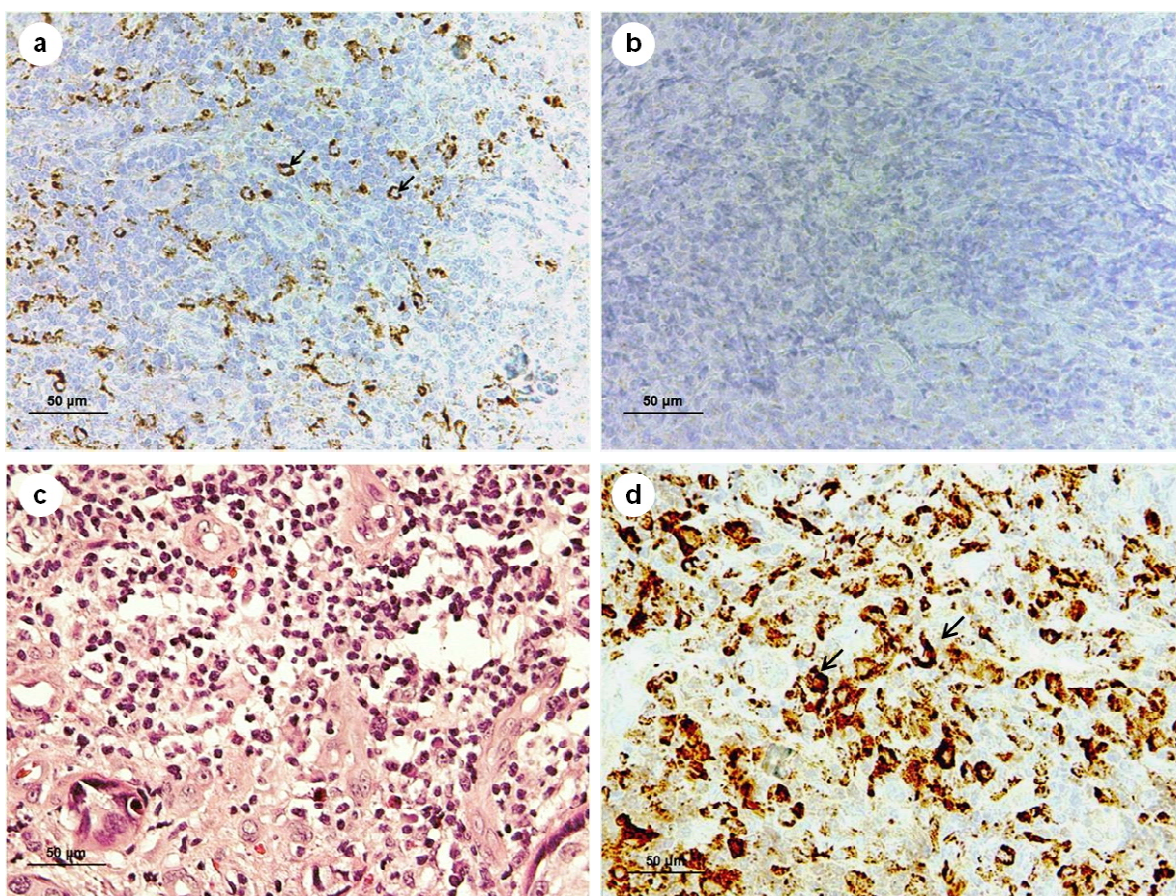


Figura 4 – Lesão de cavidade bucal classificada como CEC. (a) Tonsila humana controle positivo para CD68 40X (b) Tonsila humana controle negativo para CD68 40X. (c) HE 40X e (d) Células imunomarcadas para CD68 40X

5.5 Análise das amostras classificadas por Paracoccidioidomicose (PCM)

As amostras classificadas como lesões bucais resultantes da paracoccidioidomicose, foram caracterizadas por mostrarem reação inflamatória granulomatosa com granulomas bem estruturados ou não e micro-abscessos. Estruturas leveduriforme foram vistas no interior de células epiteliais, no centro dos abscessos, dispersas pela matriz extracelular ou no interior de células gigantes, no centro dos granulomas. O infiltrado inflamatório foi constituído por macrófagos, linfócitos, plasmócitos, células epitelíoides, células gigantes, neutrófilos e poucos eosinófilos (figura 5).

A análise imunohistoquímica demonstrou paridade entre a presença em grande quantidade e pequena quantidade de linfócitos T citotóxicos (CD8) e macrófagos (CD68), predomínio de células *NK* (CD57) em pequena quantidade e poucas amostras (28,6%) com linfócitos T *helper* (CD4).

Tabela 4 – Distribuição de marcadores imunohistoquímicos nas amostras classificadas como lesões bucais por PCM no Laboratório de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia da UFMS em Campo Grande, MS – julho de 2011 - julho 2012 (n=7)

| Marcadores | Escores | | | Total |
|------------|------------|------------|------------|----------|
| | 0 n (%) | 1 n (%) | 2 n (%) | |
| CD4 | 4 (57,2%) | 1 (14,3%) | 2 (28,6%) | 7 (100%) |
| CD8 | - | 4 (57,2%) | 3 (42,9%) | 7 (100%) |
| CD68 | - | 4 (57,2%) | 3 (42,9%) | 7 (100%) |
| CD57 | 1 (14,3%) | 6 (85,7%) | - | 7 (100%) |

Nota: escore 0= ausência de marcação; escore 1= pequena quantidade de células imunomarcadas e escore 2= grande quantidade de células imunomarcadas. PCM= paracoccidioidomicose

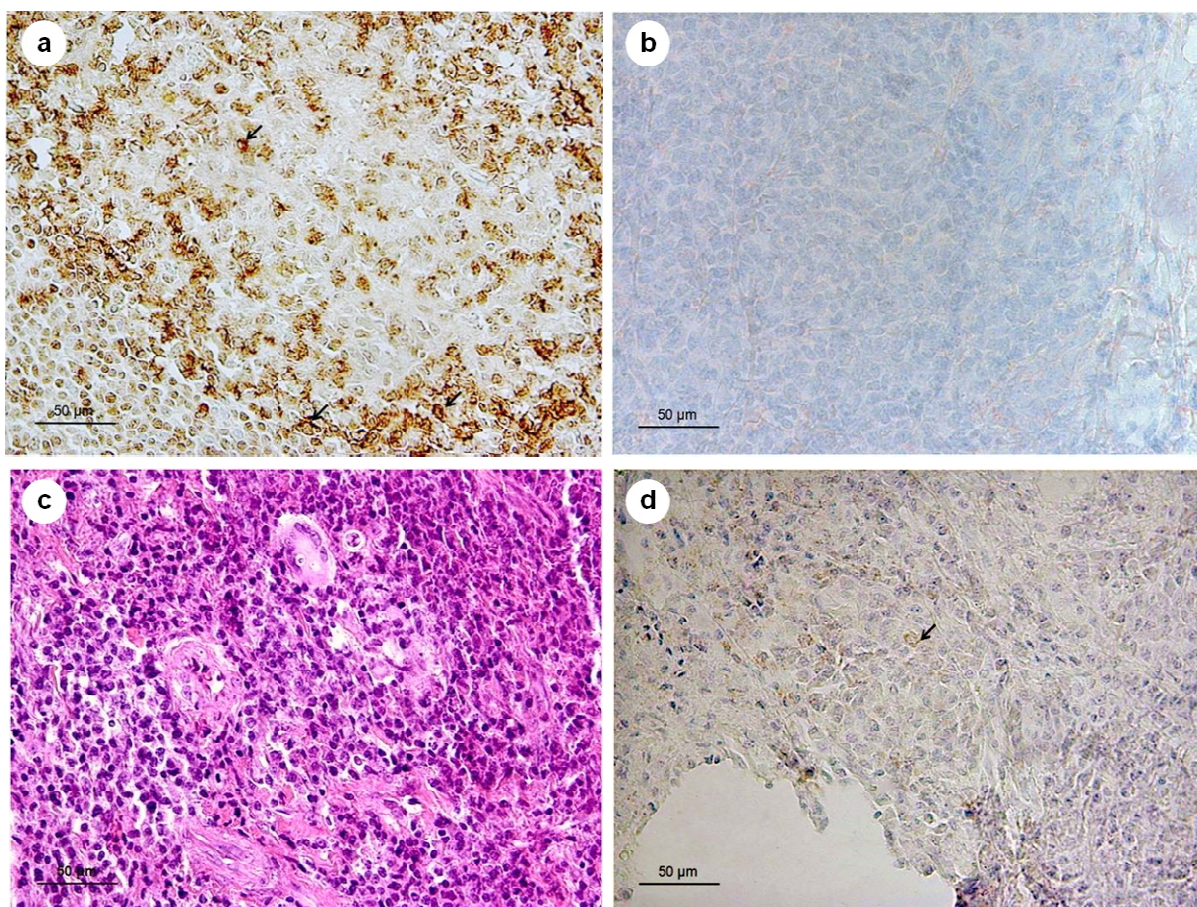


Figura 5 – Lesão de cavidade bucal resultante da paracoccidiodiomiose. (a) Tonsila humana controle positivo para CD4 40X. (b) Tonsila humana controle negativo para CD4 40X. (c) células imunomarcadas para CD4 40X e (d) HE 40X

6 DISCUSSÃO

No presente estudo a prevalência de lesões bucais representadas por HFI 8 (23,5%), LPCG 7 (20,6%), CEC 12 (35,5%) e PCM 7 (20,6%) é similar a outros registros no Brasil e no exterior (MORESCO; NORA FILHO; BALBINOT, 2003; FREITAS, 2004; TAMARIT-BORRÀS et al., 2005; BERTOJA et al., 2007; MARIN et al., 2007; KIJNER; SCARSANELLA, 2008; PRADO; TREVISAN; PASSARELI, 2010), tendo em vista que as lesões descritas nos trabalhos citados apresentavam similaridade entre as características consideradas neste estudo, tal resultado representa a escolha de uma população homogênea e representativa dentro de cada lesão.

A detecção dos marcadores imunohistoquímicos CD4 (linfócitos T *helper*), CD8 (linfócito T citotóxico), CD68 (macrófagos) e CD57 (*Natural killer*) para células do infiltrado inflamatório nas lesões propostas, permite determinar o tipo celular, enquanto a histopatologia se restringe a identificar a célula. Tal fato é importante porque mediante a caracterização do tipo celular podemos avaliar o status imunológico do paciente, aumentando as possibilidades de controle ou cura por meio da orientação terapêutica adequada.

As lesões por HFI e LPCG constituem processos reacionais em resposta às agressões contínuas e de baixa intensidade, tais como próteses mal adaptada ou desgastadas, ocasionando trauma, resultando em necrose que induz reação inflamatória (SANTOS; COSTA; SILVA NETO, 2004; CAPELOZZA; TAVEIRA; PAGIN, 2007; MATOS et al., 2010). Devido a essas características comuns tais processos serão abordados conjuntamente na discussão.

Nas lesões reativas HFI e LPCG, houve alternância no tipo celular predominante. Na HFI os linfócitos T (CD8), em seis casos (75%) prevaleceram sobre os macrófagos (CD68), com 5 casos (62,5%) enquanto, nas LPCG ocorreu o oposto, demonstrado por meio do predomínio de macrófagos (CD68) na totalidade dos casos, 7 (100%) sobre os linfócitos (CD8), 3 (42,9%). Nas HFI as células T CD8 encontravam-se nos focos inflamatórios, infiltrando o epitélio e na lâmina própria, tal como descrito por Badauy et al. (2005) que registrou a resposta inflamatória em infecções bucais por *Candida*. Em ambos os processos patológicos não se observou marcação relacionada aos linfócitos T CD4, provavelmente por estarem

relacionados à mecanismos inibitórios de apresentação do antígeno, considerando que este seria processo inicial que atrairia essa população para o local. Já as células *Natural Killer* (CD57) tiveram apenas 1 registro (12,5%), no entanto esta deficiência não é relevante neste contexto pois, sua função foi suprida pela preponderância dos linfócitos T citotóxicos que da mesma forma que as células *Natural Killer* sintetizam granzimas e perforinas (MESQUITA Jr et al., 2010)

Considerando que o desenvolvimento de lesões de continuidade, oriundas de processos traumáticos na mucosa bucal possam predispor à infecções por *Candida* sp, tal fato justificaria a prevalência de linfócitos T (CD8); a diferença na proporcionalidade de CD8 entre as lesões reativas provavelmente expressem fases distintas da evolução da resposta imunológica.

A presença de macrófagos, células CD68, neste estudo é relevante e caracteriza uma das suas funções, a limpeza de restos necróticos após traumas repetitivos (MESQUITA Jr et al., 2010).

As células da resposta inflamatória obedecem ao mesmo padrão de marcação nas lesões HFI e LPCG com ressalvas para o maior potencial patológico da LPCG e, a maior possibilidade de infecção por *Candida* sp na HFI (BADAUY et al., 2005; PETRIS et al., 2008). Nossos achados foram pioneiros em relação à LPCG, e contribuíram com o estudo escasso encontrado para a HFI além de, demonstrarem que as reações inflamatórias resultam de traumas contínuos e infecções secundárias.

A resposta imunológica nas lesões representadas por CEC e PCM obedece ao mesmo padrão e podem ocorrer de forma concomitante, conforme estudo realizado por Rodrigues et al., 2010, permitindo assim que sejam discutidas em paralelo. Em ambos os eventos as fases iniciais se caracterizam por predomínio de resposta Th1, maior secreção de fatores pró-inflamatórios os quais se mostram inibidos nas fases finais, indicando a sobreposição da resposta Th2 sobre a Th1. A resposta imune celular Th1 demonstrada por maior produção de IFN- γ por linfócitos T, que agindo sobre macrófagos estimulam a síntese de substâncias capazes de destruir células cancerosas e micro-organismos; além de estimularem os linfócitos T auxiliares. Estes por sua vez liberaram citocinas promovendo a auto-estimulação e a estimulação de mais linfócitos TCD8. A fase final caracteriza-se por secreção de IL-10 e IL-4 que suprimem a resposta imune celular demonstrando o predomínio da

resposta humoral, Th2, ineficaz no combate a fungos e células neoplásicas malignas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008a).

Nossos achados demonstraram que em todos os casos de CEC predominou a marcação de macrófagos (CD68), comprovando sua importância no processo imunológico de resposta ao câncer. Entretanto, os macrófagos do ambiente tumoral podem representar prognósticos divergentes. Tanto que, Arantes, Costa e Batista (2011), descreveram maior proporção de CD68 em CEC metastático quando comparado ao não metastático. Estudos recentes procuram esclarecer esta aparente incoerência demonstrando que a evolução ou o controle do câncer está na dependência do fenótipo dos macrófagos associados a tumores (TAM) predominantes na área tumoral (SICA; MONTOVANI, 2006; HAMMES et al., 2007; ALLAVENA et al., 2008).

Neste estudo apenas detectou-se a marcação de macrófagos sem diferenciá-los entre os padrões M1 e M2. Ao considerarmos o predomínio de macrófagos e a escassez de CD4 nesse grupo (CEC e PCM), podemos inferir que não há apresentação antigênica adequada, provavelmente devido a incapacidade de reconhecimento de antígenos no contexto da molécula MHC de classe II, caracterizando ações de macrófagos tipo 2, baixa produção de INF- γ , citocina indutora da expressão de MHC II.

No CEC a proporção entre células CD4 e CD8 demonstrou o predomínio total dos linfócitos CD8, o que concordada com as descrições de Silveira (2007). A ausência de CD4 evidencia o predomínio da ação anti-inflamatória da IL-10, interleucina mais importante na regulação da resposta imunitária humana, provavelmente produzida pelos macrófagos M2 (OPAL; DEPALO, 2000).

Neste mesmo processo a marcação das células *NK* correspondeu apenas a 8,3% dos casos, sendo discreta quando comparada aos demais linfócitos e não foi demonstrada na PCM. As duas situações vêm mais uma vez demonstrar o predomínio para o padrão M2 através da estimulação discreta ou inexistente de INF- γ .

As imunomarcações das lesões por PCM demonstraram equilíbrio entre macrófagos, CD68 e linfócitos T citotóxicos, CD8 que representaram 42,9% dos casos; já os linfócitos T CD4 exibiram praticamente a metade desses valores com 28,6%. Estes achados são compatíveis com a resposta imunológica Th2 desencadeada na PCM, assinalada por reação inflamatória constituída por

granulomas frouxamente arranjados (Fortes et al., 2010). Kaminagakura et al., 2007 descreveram equilíbrio entre as populações de células T CD4 e T CD8 nos granulomas densamente constituídos e prevalência de linfócitos T CD8 nas regiões de granulomas frouxamente arranjados. A aparente discordância deve-se ao dinamismo da resposta imunológica que está na dependência da via de ativação dos macrófagos em vigência. Pagliari et al. (2010) também demonstrou o predomínio de linfócitos T CD8 sobre células *NK* em lesões mucosas com granulomas frouxos ou compactos ou com ambos os tipos, ressaltando a sua importância na eficácia da resposta imunológica ao fungo.

O estudo demonstrou que as variações de imunomarcção nas lesões por CEC e PCM expressam fases na dinâmica da resposta imunológica de cada indivíduo. Nas duas situações podemos inferir que tanto o micro-ambiente neoplásico como o infeccioso convergem para a orientação responsiva em que predomina os macrófagos com fenótipo M2. O direcionamento da resposta demonstra a susceptibilidade do sistema imunológico frente ao CEC e ao PCM.

A despeito de os processos inflamatórios crônicos representarem uma forma de resposta robusta às agressões, a presença de macrófagos do tipo M2 torna o campo fértil para a sua perpetuação e de proliferações cancerosas. O fenótipo M2 produz diversos fatores estimulantes do crescimento dentre os quais se destacam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); no ambiente neoplásico prevalece o desequilíbrio entre os fatores pró e anti-angiogênico onde o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) desempenha papel fundamental promovendo a formação de novos vasos, favorecendo a proliferação de células cancerosas e metástases (O'BRIEN; SCHEDIN, 2009).

Esta pesquisa evidenciou que nas quatro lesões estudadas preponderaram as imunomarcções para macrófagos (CD68) e linfócito T citotóxico (CD8) sobre linfócitos T auxiliar (CD4) e células *Natural Killer*. Observa-se que embora os macrófagos tenham se destacado entre as células com maior número de imunomarcções sua função efetora foi drasticamente modificada provavelmente por comprometimento da capacidade de apresentação de antígenos. Este achado foi demonstrado por descrição de menor número de linfócitos T CD4 imunomarcados. Além disso, sugere também que os macrófagos em questão, representem células

orientadas para o fenótipo M2, após exposição à moléculas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10.

Caso o reconhecimento de antígenos tivesse ocorrido por linfócitos TCD4, esses direcionariam, muito provavelmente, a resposta imunológica para Th1 com a diferenciação dos macrófagos para o tipo M1, desta forma combatendo os agentes agressores.

Os macrófagos do tipo 2 além de constituírem grupo de células com baixo capacidade de apresentação de antígenos, produzem fatores que inibem a proliferação e a atividade de células T; impedem a secreção de INF- γ , que atua sobretudo, promovendo a ativação e amplificação da capacidade de fagocitose por macrófagos e aumenta a expressão do MHC-classe II, ampliando as possibilidades de apresentação do antígeno. Macrófagos ativados produzem radicais lesivos derivados do oxigênio e do óxido nítrico (NO), capazes de destruir fungos e células neoplásicas (MONTOVANI et al., 2002)

Demonstra-se desta forma o menor desempenho funcional de macrófagos, em detrimento de marcações escassas ou nulas para células *Natural Killer* em lesões por PCM, Pagliari (2010), mesmo na ausência destas células, descreveu quantidades adequadas de granzimas secretadas por células CD8. Diante do exposto podemos inferir que a ausência ou a deficiência de células *NK* não resulta em prejuízo a defesa imunológica nestes processos patológicos, considerando que a capacidade citotóxica dos linfócitos T CD8 pode compensar a escassez de células *Natural Killer*.

7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

As amostras por serem provenientes de biópsias eram constituídas por pequenos fragmentos. Como houve necessidade de se refazer cortes histológicos e não poderíamos fazer novas biópsias, se tornou obrigatório novo procedimento para emblocar os fragmentos, a fim de se obter maior extensão de corte para as imunomarcações. Este fato não nos permitiu examinar cortes obtidos em série nas diversas marcações imunológicas efetuadas.

8 CONCLUSÃO

Houve diferença na detecção de células inflamatórias por Imunohistoquímica nas alterações patológicas de Hiperplasia Fibrosa Inflamatória, Lesão Periférica de Células Gigantes, Cacinoma Espinocelular e Paracoccidioidomicose. Macrófagos (CD68) predominaram no Carcinoma Espinocelular e Lesão Periférica de Células Gigantes. Macrófagos e linfócitos T citotóxicos (CD8) na Paracoccidioidomicose e linfócitos T citotóxicos (CD8) na Hiperplasia Fibrosa Inflamatória.

REFERÊNCIAS

Abbas AF, Lichtman AH, Pillai S. Citocinas. In: _____. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008a. p. 267-301.

Abbas AF, Lichtman AH, Pillai S. Processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T. In: _____. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008b. p. 113-6.

Adornato MC, Patcoff KA. Intralesional corticosteroid injection for treatment of central giant-cell granuloma. *J Am Dent Assoc*. 2001; 132(2):186-90.

Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008 Apr; 66(1):1-9.

Almeida OP, Corrêa MEP. Infecções bucais e doenças sistêmicas. *Rev Bras Med*. 2003; 60(4): 175-8.

Álvarez Martínez E, Uribe AP, Fernández SAM, Gómez RJ, López AP. Características clínico-histopatológicas del carcinoma escamocelular bucal, Colombia. *Rev Cubana Estomatol*. 2010; 47(1):81-95.

Amadei SU, Pereira AC, Silveira VAS, Carmo ED, Scherma AP, Rosa LEB. Prevalência de processos proliferativos não neoplásicos na cavidade bucal: estudo retrospectivo de quarenta anos. *Clínica e Pesquisa em Odontologia – UNITAU*. 2009;1(1): 38-42.

Amaral SM, Miranda AMMA, Pires FR. Reações medicamentosas na cavidade oral: aspectos relevantes na Estomatologia. Rev Bras Odontol. 2009; 66(1):41-53.

Arantes DAC, Costa NL, Batista AC. Avaliação da proporção de macrófagos e a relação dessas células com o prognóstico do carcinoma espinocelular da cavidade oral [on line]. [2011] [acesso em 1 nov 2013]. Disponível em:

http://www.sbpnet.org.br/livro/63ra/conpeex/pivic/trabalhos/DIEGO_AN.PDF

Badauy CM, Barbachan JJD, Rados PV, Sant'Ana Filho M, Chies JAB. Relationship between Candida infection and immune cellular response in inflammatory hyperplasia. Oral Microbiol Immunol. 2005 Apr; 20(2):89-92.

Barreto RC, Paiva MAF, Soares MSM, Pereira GAS. Prevalência de câncer bucal nas mesorregiões paraibanas. Rev Bras Ciênc Saúde. 2006; 10(1):9-16.

Batista AC, Costa NL, Oton-Leite AF, Mendonça EF, Alencar RCG, Silva TA. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Mar; 109(3):e74-9.

Bertoja IC, Tomazini JG, Braosi APR, Zielak JC, Reis LFG, Giovanini AF. Prevalência de lesões bucais diagnosticadas pelo Laboratório de Histopatologia do UnicenP. RSBO. 2007; 4(2): 41-6.

Birman EG, Novelli M, Simões IS, Vicente SP. Patologia gengival hiperplasia fibrosa inflamatória localizada. ARS Cvrandi Odontol. 1981: 77-84.

Bisinelli, JC, Telles, FQ, Andrade Sobrinho, J, Rapoport, A. Manifestações estomatológicas da paracoccidiodomicose. Rev. Bras. Otorrinolaringol. 2001; 67(5):683-7.

Bittar TO, Paranhos LR, Fornazari DH, Pereira AC. Epidemiological features of oral cancer: a world public health matter. RFO UPF. 2010; 15(1):87-93.

Bomfim IPR, Soares DG, Tavares GR, Santos RC, Araújo TP, Padilha WWN. Prevalência de lesões de mucosa bucal em pacientes portadores de prótese dentária. Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr. 2008; 8(1):117-21.

Brito AJP, Fava AS, Makowicky M, Sartini AL, Costa GP, Montoro JRMC. Aspectos clínicos e histopatológicos de tumores de palato mole. Arq Int Otorrinolaringol. 2008; 12(2):179-82.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidiodomycosis: an update. Clin Microbiol Rev. 1993 Apr; 6(2):89-117.

Buchner A, Shnaiderman-Shapiro A, Vered M. Relative frequency of localized reactive hyperplastic lesions of the gingiva: a retrospective study of 1675 cases from Israel. J Oral Pathol Med. 2010 Sep; 39(8):631-8.

Capelozza ALA, Taveira LAA, Pagin O. Lesão periférica de células gigantes: relato de caso. Salusvita. 2007; 26(1):99-104.

Carvalho SHG, Soares MSM, Figueiredo RLQ. Levantamento epidemiológico dos casos de câncer de boca em um hospital de referência em Campina Grande, Paraíba, Brasil. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr*. 2012; 12(1):47-51.

Cavalcante ASR, Marsilio AL, Kühne SS, Carvalho YR. Lesões bucais de tecido mole e ósseo em crianças e adolescentes. *Pós Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos*. 1999; 2(1):67-75.

Cavezzi Junior O, Sartori JHF, Aguiar ECG. Lesão periférica de células gigantes: relato de caso clínico. *Odontol Clín-Cient*. 2008; 7(3):257-60.

Chen JY, Wang WC, Chen YK, Lin LM. A retrospective study of trauma-associated oral and maxillofacial lesions in a population from southern Taiwan. *J Appl Oral Sci*. 2010 Jan-Feb; 18(1):5-9.

Coelho CMP, Zucoloto S, Lopes RA. Denture-induced fibrous inflammatory hyperplasia: a retrospective study in a school of dentistry. *Int J Prosthodont*. 2000 Mar-Apr; 13(2):148-51.

Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006 Jan 27; 124(2):263-6.

Consolaro A. Inflamação e reparo: um silabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas. Maringá: Detal Press Editora, 2009

Costa LJ, Soares MSM, Komatsu AA, Albuquerque AAL. Pacientes com doenças sistêmicas de origem auto-imune/dermatológicas: incidência das manifestações bucais e revisão de literatura. *Rev Bras Ciênc Saúde*. 2009; 13(3):49-54.

Coutinho ZF, Silva D, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública*. 2002; 18(5):1441-54.

De Carli JP, Moraes NP, Crivelini MM, Silva SO, Linden MSS, Trentin MS. Avaliação da agressividade da lesão de células gigantes periférica da cavidade bucal através de estudo histoquímico-imunohistoquímico. *Rev Odonto Ciênc*. 2008; 23(3):291-6.

Dedivitis RA, França CM, Mafrá ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2004; 70(1):35-40.

Falcão AFP, Lamberti PLR, Lorens FGL, Lacerda JÁ, Nascimento BC. Hiperplasia fibrosa inflamatória: relato de caso e revisão de literatura. *Rev Ciênc Méd Biol*. 2009; 8(2): 230-6.

Falcão MML; Alves TDB; Freitas VS; Coelho TCB. Conhecimento dos cirurgiões-dentistas em relação ao câncer bucal. *RGO, Rev gaúch odontol*. 2010: [acesso em 18 out 2013] Disponível em:

<http://revodontobvsalud.org/pdf/rgo/v58n1/a06v58n1.pdf>

Fernandes JP, Brandão VSG, Lima AAS. Prevalência de lesões cancerizáveis bucais em indivíduos portadores de alcoolismo. *Rev Bras Cancerol*. 2008; 54(3):239-44.

Ferreira SP, Santos RS, Paula LB, Reis AAS. Prevalência da paracoccidiodomicose em pacientes diagnosticados no Hospital Araújo Jorge em Goiânia-Goiás, Brasil. *Rev Univ Vale Rio Verde*. 2012; 10(1):167-77.

Filioreanu AM, Popescu E, Cotrutz C, Cotrutz CE. Immunohistochemical and transmission electron microscopy study regarding myofibroblasts in fibroinflammatory epulis and giant cell peripheral granuloma. *Rom J Morphol Embryol*. 2009; 50(3):363-8.

Firoozmand LM, Almeida JD, Cabral LAG. Study of denture-induced fibrous hyperplasia cases diagnosed from 1979 to 2001. *Quintessence Int*. 2005 Nov-Dec; 36(10):825-9.

Fortes MRP, Miot HA, Kurokawa CS, Marques MEA, Marques AS. Imunologia da paracoccidiodomicose. *An Bras Dermatol*. 2011; 86(3):516-25.

França BHS, Souza AM. Prevalência de manifestações estomatológicas originárias do uso de próteses totais. *JBC J Bras Clin Odontol Integr*. 2003; 40(7):296-300.

França DCC, André NV, Lessi MAA, Reis G, Aguiar SMHCA. Granuloma periférico de células gigantes: relato de caso. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac*. 2010; 10(3):29-32.

Freitas JB. Alterações da mucosa bucal em idosos usuários e não usuários de prótese total removível em duas comunidades rurais de Minas Gerais [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2004.

Gallarreta FWM, Turssi CP, Palma-Dibb RG, Serra MC. Histórico de saúde: atenção a condições sistêmicas e suas implicações, sobretudo nos fatores de risco de cárie. *Rev Odonto Ciênc.* 2008; 23(2):192-6.

Gassen HT, Silva SO, Moraes SG. Carcinoma epidermóide da cavidade bucal. *Rev Méd Hosp São Vicente de Paulo.* 2005; 17(36):35-8.

Goiato MC, Castelleoni L, Santos DM, Gennari Filho H, Assunção WG. Lesões orais provocadas pelo uso de próteses removíveis. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr.* 2005; 5(1):85-90.

Hammes LS, Tkemal RR, Naud P, Edelweiss MI, Kirma N, Valente PT, Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression: clinicopathological correlation. *Gynecol Oncol.* 2007 Apr; 105(1):157-65.

Harris CK, Warnakulasuriya KAAS, Cooper DJ, Peters TJ, Gelbier S. Prevalence of oral mucosal lesions in alcohol misusers in south London. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33(5):253-9.

Hipólito RA, Martins CR. Prevalência de alterações da mucosa bucal em adolescentes brasileiros institucionalizados em dois centros de reeducação. *Cien Saude Colet.* 2010; 15(2):3233-42.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER-INCA. Estimativas 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro; 2011. [acesso em 15 nov 2013]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>.

Kaminagakura E, Bonan PRF, Jorge J, Almeida OP, Scully C. Characterization of inflammatory cells in oral paracoccidioidomycosis. *Oral Dis*. 2007 Jul; 13(4):434-9.

Katsikeris N, Angelopoulou-Kakarantza E, Angelopoulos AP. Peripheral giant cell granuloma: clinicopathologic study of 224 new cases and review of 956 reported cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1988 Apr; 17(2):94-9.

Kijner M, Scarsanella MS. Lesões mais freqüentes na clínica de estomatologia da Faculdade de Odontologia ULBRA Torres, no segundo semestre do ano de 2003. *Rev Inicia Cient ULBRA*. 2008; 1. [acesso em 15 nov 2013]. Disponível em: <http://revista.ulbratorres.com.br/artigos/artigo05.pdf>.

Lin WW, Karin M. A cytokine mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007 May; 117(5):1175-83.

Marcucci, G, editor. Fundamentos de odontologia: estomatologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

Marin HJI, Silveira MMF, Souza GFM, Pereira JRD. Lesões bucais: concordância diagnóstica na Faculdade de Odontologia de Pernambuco. *Odontol Clín-Cient*. 2007; 6(4):315-318.

Marques SA, Cortez DB, Lastória JC, Camargo RMP, Marques MEA. Paracoccidioidomicose: freqüência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. *An Bras Dermatol*. 2007; 82(4):411-7.

Martinelli KG, Vieira MM, Barros LAP, Maia RMLC. Análise retrospectiva das lesões da região bucomaxilofacial do serviço de anatomia patológica bucal: Odontologia/UFES. Rev Bras Pesqui Saúde. 2011; 13(2):24-31.

Mashberg A, Samitt A. Early Diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. CA Cancer J Clin. 1995 Nov-Dec; 45(6):328-51.

Matos FR, Souza LB, Miguel MCC, Costa ALL, Freitas RA. Estudo clinicopatológico da eosinofilia tecidual associada a tumor em carcinoma oral de células escamosas. Brasília Med. 2010; 47(1):46-52.

Menezes Filho JF. Incidência de neoplasias BMF. RGO. 1991; 39(6):428-30.

Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Cruvinel WM, Andrade LEC, Silva NP. Sistema Imunitário – Parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. Rev Bras Reumatol 2010; 50(5):552-8.

Montovani A, Sozzani S, Locati M, Sica PAA. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol. 2002 Nov; 23(11):549-55.

Moreira ARO, Oliveira CDM, Silva RR, Lopes FF, Bastos EG. Levantamento epidemiológico das doenças epiteliais da região bucomaxilofacial: casuística de 20 anos. Rev Gaucha Odontol. 2011; 59(1):65-70.

Moresco FC, Nora Filho MR, Balbinot MA. Levantamento Epidemiológico dos Diagnósticos Histopatológicos da Disciplina de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da ULBRA-Canoas/RS. *Stomatos*. 2003; 9(17):29-34.

Neville, BW. *Patologia oral e maxilofacial*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.

O'Brien J, Schedin P. Macrophages in breast cancer: do involution macrophages account for the poor prognosis of pregnancy-associated breast cancer? *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2009; 14(2):145–57.

Opal SM, DePalo VA. Impacto f basic research on tomorrow's medicine: anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000; 117(4): 1162-72.

Padovani CTJ. Detecção de marcadores fenotípicos de células T regulatórias e suas citocinas em pacientes HPV infectadas. Campo Grande. [Doutorado]. Mato Grosso do Sul. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2013

Pagliari C, Pereira NV, Kanashiro L, Stegun FW, Croda J, Duarte MIS. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. *J Cutan Pathol*. 2010 May; 37(5):565-70.

Palmeiro M, Cherubini K, Yurgel LS. Paracoccidioidomicose: revisão da literatura. *Sci Med. (Porto Alegre)*. 2005; 15(4):274-8.

Paniago AMM, Aguiar JI, Aguiar ES, Cunha RV, Pereira GROL, Londero AT, Paracoccidiodomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36(4):455-9.

Pereira TTM, Gaetti-Jardim EC, Castillo KA, Paes GB, Barros RMG. Levantamento epidemiológico das doenças da boca: casuística de dez casos. Arch Health Invest. 2013; 2(3):15-20.

Petris GP, Bremm LL, Tanaka F, Melhado RM, Miura CS. Lesão periférica de células gigantes: diagnóstico diferencial e tratamento da lesão: relato de caso clínico. Rev Port Estomatol Cir Maxilofac. 2008; 49(4):237-40.

Prado BN, Trevisan S, Passarelli DHC. Estudo epidemiológico das lesões bucais no período de 05 anos. Rev Odontol Univ Cid São Paulo. 2010; 22(1):25-9.

Ramos LMA, Rocha FS, Batista JD, Oliveira AG, Gomes VL. Conduta alternativa para reabilitação oral em portador de hiperplasia fibrosa inflamatória: relato de um caso clínico. In: 4ª Semana do Servidor e 5ª Semana Acadêmica. Anais; 2008; Uberlândia, Brasil. Uberlândia: UFU; 2008 [acesso em 20 jun 2013]. Disponível em: <https://ssl4799.websiteseuro.com/swge5/seg/cd2008/PDF/SA08-21066.PDF>

Ramu S, Rodrigues C. Reactive hyperplastic lesions of the gingiva: a retrospective study of 260 cases. World Journal of Dentistry. 2012; 3(2):126-30.

Rassi TNO, Passos RRB, Kumagai KM, Soranz Filho JE, Freitas JAH. Paracoccidiodomicose crônica multifocal tendo como primeira manifestação o envolvimento palpebral: relato de caso. Arq Bras Oftalmol. 2009; 72(6):822-5.

Ribeiro BB, Guerra LM, Galhardi WMP, Cortellazzi KL. Importância do reconhecimento das manifestações bucais de doenças e de condições sistêmicas pelos profissionais de saúde com atribuição de diagnóstico. *Odonto*. 2012; 20(39):61-70.

Rodrigues GS, Severo CB, Oliveira FM, Moreira JS, Prolla JC, Severo LC. Associação entre paracoccidiodomicose e câncer. *J Bras Pneumol*. 2010; 36(3):356-362.

Rosa LB, Zuccolotto MCC, Bataglion C, Coronatto EAS. Odontogeriatrics: a saúde bucal na terceira idade. *RFO UPF*. 2008; 13(2):82-6.

Santos ALF, Derchain SFM, Martins MR, Sarian LO, Martinez EZ, Syrjänen KJ. Procedimentos laboratoriais em imunohistoquímica e hibridização in situ. In: Alves VAF, Bacchi C, Vassalo J, editors. *Manual de imunohistoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. p. 237-259.

Santos LCO, Cangussu MCT, Batista OM, Santos JP. Oral câncer: population sample of the State of Alagoas at a reference hospital. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009; 75(4):524-9.

Santos MESM, Costa WRM, Silva Neto JC. Terapêutica cirúrgica da hiperplasia fibrosa inflamatória: relato de caso. *Rev Cir e Traumatol Buco-Maxilo-Fac*. 2004; 4(4):241-5.

Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML, Grupo de Consultores do Consenso em Paracoccidiodomicose. Consenso em paracoccidiodomicose. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39(3):297-310.

Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006 Apr; 42(6):717-27.

Silva WS. Paracoccidioidomicose: estudo clínico-demográfico a partir de pacientes portadores de lesões bucais [Dissertação]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2007.

Silveira EJD. Perfil imuno-histoquímico do infiltrado inflamatório no front de invasão em carcinomas epidermóides de língua e lábio inferior [Tese]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2007.

Tamarit-Borràs M, Molina ED, Aytés LB, Escoda CG. Removal of hyperplastic lesions of the oral cavity: a retrospective study of 128 cases. *Med Oral Patol Oral CirBucal*. 2005 Mar-Apr; 10(2):151-62.

Teixeira AKM, Almeida MEL, Holanda ME, Sousa FB, Almeida PC. Carcinoma espinocelular da cavidade bucal: um estudo epidemiológico na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. *Rev Bras Cancerol*. 2009; 55(3):229-36.

Tian XF, Li TJ, Yu SF. Giant cell granuloma of the temporal bone: a case report with immunohistochemical, enzyme histochemical and in vitro studies. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Sep; 127(9):1217-20.

Tiffe JC, Aufdemorte TB. Markers for macrophage and osteoclast lineages in giant cell lesions of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997 Oct; 55(10):1108-12.

Umbelino Júnior AA, Silva AA, Klumb EM, Dias EP, Cantisano MH. Achados bucais no lúpus eritematoso sistêmico. Rev Bras Odontol. 2010; 67(2):183-7.

Vieira FLD. Tipagem das células do infiltrado inflamatório peritumoral em carcinoma de células escamosas da mucosa bucal: correlação com expressão de Ki67 [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2009.

Zarei MR, Chamani G, Amanpoor S. Reactive hyperplasia of the oral cavity in Kerman province, Iran: a review of 172 cases. Br J Oral Maxillofac Surg. 2007 Jun; 45(4):288-92.

ANEXO I



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

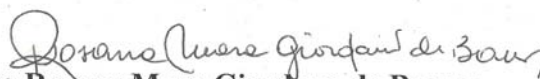
FACULDADE DE ODONTOLOGIA "PROF ALBINO COIMBRA FILHO"



DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE TÉCNICA

Eu, Profa Dra ROSANA MARA GIORDANO DE BARROS, RG 030.136 SSP-MS residente em Campo Grande Mato Grosso do Sul, sito à rua Manoel Inácio de Souza, 1304 - Bairro Santa Fé, SIAPE: 04317691 declaro que sou a responsável técnica pela biópsia e laudo histopatológico do material coletado para atender o projeto "CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS EM PROCESSOS PATOLÓGICOS MAIS FREQUENTES NA CAVIDADE BUCAL" sob a responsabilidade da Profa Maria Auxiliadora Gomes Sandim Abdo.

Campo Grande, 06 de junho de 2011.


Profa. Dra Rosana Mara Giordano de Barros

ANEXO II



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa / CEP/UFMS

*Carta de Aprovação*

O protocolo nº 2018 CAPE 0076.0.049.000-11 da Pesquisadora Maria Auxiliadora Gomes Sandim Abdo, intitulado "Caracterização de células inflamatórias em processos patológicos da cavidade bucal", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião extraordinária no dia 9 de junho de 2011, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.


Prof. Ernesto Antonio Figueiro Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 10 de junho de 2011.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

fone 0XX67 345-7187