

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE MASTÓCITOS EM TECIDO
GENGIVAL DE PACIENTES SOB TERAPIA COM NIFEDIPINA:
POSSÍVEL RELAÇÃO DESTAS CÉLULAS COM A ANGIOGÊNESE
E COM A COLAGENIZAÇÃO**

ANNELISE CARRILHO CORRÊA DE CASTRO

GOIÂNIA - GOIÁS
Novembro de 2007

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE MASTÓCITOS EM TECIDO
GENGIVAL DE PACIENTES SOB TERAPIA COM NIFEDIPINA:
POSSÍVEL RELAÇÃO DESTAS CÉLULAS COM A ANGIOGÊNESE
E COM A COLAGENIZAÇÃO**

ANNELISE CARRILHO CORRÊA DE CASTRO

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer
Co-orientadores: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça
Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

GOIÂNIA - GOIÁS
Novembro de 2007

“...Muda que quando a gente muda, o mundo muda com a gente
A gente muda o mundo na mudança da mente
E quando a mente muda, a gente anda pra frente

Na mudança de atitude não há mal que não se mude nem doença
sem cura

Na mudança de postura, a gente fica mais seguro
Na mudança do presente, a gente molda o futuro...”

(Gabriel O Pensador/ Tiago Mocotó/ Itaal Shur)

Dedicatória

... a Deus

que me deu circunstâncias para que amadurecesse, me deu força e inteligência para chegar até aqui.

... aos meus queridos pais (Ronaldo & Hermelinda)

a vocês devo tudo que sou hoje.

... aos meus irmãos (Ronaldo & Ulisses)

a vocês que fazem parte da melhor equipe que formamos em nossa vida: nossa família.

... aos meus amigos

presenças importantes no meu cotidiano, sendo fontes marcantes de carinho e apoio

Agradecimentos

...à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer

externo minha gratidão, admiração e reconhecimento pelo exemplo intelectual, conduta e personalidade com que me conduziu durante estes anos. Obrigada pelo tanto que me ensinou, pelos passos apoiados, pelos conselhos proferidos, pelo estímulo e dedicação que foram as bases do meu saber. A você, meu sincero carinho e respeito.

...aos meus co-orientadores Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça e Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista

a quem admiro muito e se fazem carinhosamente especiais, por terem me acolhido e dedicado seu tempo, permitindo que minha formação fosse também um aprendizado de vida. A vocês, minha eterna gratidão pela presença indispensável, marcante e solícita durante este ano de convívio.

...a todos os professores do Mestrado

que de uma forma ou de outra, participaram da minha formação acadêmica.

...aos funcionários da UCG, especialmente ao Carlos

pela presteza e atenção com que dedicaram seu trabalho e seu tempo contribuindo para esta realização. A vocês, meu abraço fraterno.

...aos funcionários e alunos da UFG, especialmente à Simone, à Larissa e ao Stéfano

pela colaboração e auxílio incondicional no laboratório de Patologia Bucal.

...aos meus colegas de curso: Marcelo Zanini e Marielle

pelo companheirismo, bom humor e amizade em todas as aulas.

...aos colegas do IBCO, especialmente ao Clóvis

pelo incentivo. Obrigada por terem sido companheiros a todo custo, por tentar entender que o prejuízo da minha ausência na clínica justificava-se pela concretização de um projeto de vida, além de um investimento na qualidade profissional.

...aos funcionários do IBCO, especialmente à minha secretária Kárita

por sua imprescindível ajuda. Durante este último ano, estive ao meu lado sempre pronta a me ajudar em tudo que precisei, mesmo diante das dificuldades, das inseguranças e dos erros. Serei sempre grata pelo importante apoio que me deu no atendimento dos meus pacientes da clínica.

O carinho, o apoio, a compreensão e a dedicação que recebi de todas as pessoas que fizeram parte deste percurso, serão lembrados para sempre como parte de minha história. A todos vocês, muito obrigada.

Resumo

A nifedipina é uma diidropiridina amplamente utilizada no tratamento anti-hipertensivo devido à sua ação vasodilatadora, especialmente, por bloquear o influxo de cálcio. Entretanto, o uso crônico deste bloqueador dos canais de cálcio está associado ao aumento da mucosa gengival, gerando problemas estéticos, fonéticos e mastigatórios. Os dados da literatura não são unânimes em sugerir que a nifedipina possa resultar na alteração da densidade celular do tecido gengival. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a densidade de mastócitos e sua relação com os processos de colagenização e vascularização no tecido gengival sob efeito da nifedipina. Para este fim, foram utilizadas 14 amostras de tecido gengival de pacientes usuários de nifedipina. Para fins comparativos, foram utilizadas 15 amostras de tecido gengival de indivíduos saudáveis. As amostras foram avaliadas no departamento de Patologia Bucal da Universidade Federal de Goiás. A análise histoquímica do grau de colagenização foi realizada por meio da coloração de picrosírius. Para a avaliação da densidade de mastócitos, foi realizado um estudo quantitativo destas células a partir da técnica imunoistoquímica com marcação pelo anticorpo anti-triptase. A mensuração da densidade de vasos sanguíneos foi avaliada através de técnica imunoistoquímica com marcação pelo anticorpo anti-CD 31. Os resultados revelaram que os pacientes usuários de nifedipina apresentavam um aumento estatisticamente significativo do número de MCs-triptase+, quando comparados ao grupo controle (Mann-Whitney, $P=0,02$). No entanto, não houve correlação entre a densidade de vasos e a densidade de mastócitos (Teste de Pearson, $P=0,3$), assim como não houve correlação entre o grau de colagenização e a densidade de mastócitos (Teste de Spearman, $P=0,6$). Também não foi observada correlação entre a densidade de MCs e a dose e/ou duração da terapia com nifedipina (Teste de Pearson, $P=0,2$ e $P=0,7$, respectivamente). As alterações microscópicas observadas no tecido conjuntivo de pacientes usuários de nifedipina sugerem que esta medicação está relacionada às alterações na densidade dos MCs-triptase+.

Palavras-chave: Crescimento Excessivo da Gengiva, Induzido Quimicamente, Mastócitos.

Abstract

Nifedipine is a dihydropyridine widely used for the control of arterial hypertension, which because of its vessel dilating, in particular for the blockade by the entry of calcium. However, the chronic use of this calcium channel blocker is associated with the gingival overgrowth, resulting in the esthetic, phonetic and mastication problems. Data from the literature aren't unanimous in suggesting that cells density alterations of gingival tissues might be caused by nifedipine. The aim of this study was to analyze the variations in mast cells densities and associated with collagen and vasculature degrees of the gingival tissues by effect of nifedipine. In order to do so, fourteen samples of gingival tissue of patients undergoing chronic treatment with nifedipine were obtained. For comparative purposes, fifteen samples of gingival tissues of healthy patients who did not use drugs associated with gingival overgrowth were used. The samples were analysed in the department of oral pathology, Federal University of Goiás. The histochemical analysis of the collagen degree was made using picosirius staining. To evaluate mast cells and blood vessels density, the samples were processed by standard immunoperoxidase immunohistochemical technique using mast cell tryptase and CD31 antibodies. The results showed that the number of tryptase-positive mast cells in nifedipine group was significantly higher than the number of tryptase-positive mast cells in the control group (Mann-Whitney test, $P=0,02$). However, there wasn't relationship between mast cells density and the degree of angiogenesis (Pearson test, $P=0,3$). The number of tryptase-positive mast cells was not correlated with collagen degree (Spearman test, $P=0,6$). Also there wasn't relationship between mast cells density and dose or duration of the nifedipine therapy (Pearson test, $P=0,2$ and $P=0,7$). Microscopic alterations observed in the connective tissue of nifedipine users suggest that this drug might be associated to alterations observed in tryptase-positive mast cells density.

Keywords: Gingival overgrowth, Chemically Induced, Mast Cells.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2,1. Crescimento Gengival Induzido por Nifedipina	5
2.1.1. Características Clínicas do Crescimento Gengival Induzido por Nefidpina	12
2.1.2. Características Microscópicas do Crescimento Gengival Induzido por Medicação	13
2.1.3. Etiologia do CG Induzido por Medicação	17
2.2. Mastócitos	36
2.2.1. Mastócitos e sua Correlação com o Crescimento Gengival	42
2.2.2. Papel dos Mastócitos na Colagenização	46
2.2.3. Papel dos Mastócitos na Angiogênese	54
2.2.4. Marcadores Específicos	57
3. PROPOSIÇÃO	59
4. MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.1. Seleção da Amostra	60
4.2. Técnicas Empregadas	62
4.2.1. Técnica de Rotina da Hematoxilina e eosina e Coloração de Picrosirius	62
4.2.2. Técnica Imunoistoquímica	63
4.3. Análise Qualitativa das Lâminas de Tecido Gengival Clinicamente Saudável e sob Efeito da Nifedipina	66
4.4. Análise Quantitativa das Lâminas de Tecido Gengival Clinicamente Saudável e sob Efeito da Nifedipina	67
4.4.1. Contagem de Células por mm ² nas Lâminas de Tecido Gengival Clinicamente Saudável e sob Efeito da Nifedipina	67
4.4.2. Análise Estatística das Lâminas de Tecido Gengival Clinicamente Saudável e sob Efeito da Nifedipina	68
5. RESULTADOS	69
5.1. Análise Qualitativa das Lâminas de Tecido Gengival Clinicamente Saudável e sob Efeito da Nifedipina	69
5.1.1. Grupo Nifedipina	69
5.1.2. Grupo Controle	74

5.2. Análise Quantitativa das Lâminas de Tecido Gengival Clinicamente Saudável e sob Efeito da Nifedipina	77
5.2.1 Contagem de Mastócitos por mm ² nos Grupos Nifedipina e Controle	77
5.2.2 Contagem de Vasos Sangüíneos por mm ² nos Grupos Nifedipina e Controle	78
5.2.3. Avaliação do Grau de Colagenização entre os Grupos Nifedipina e Controle	79
5.2.4. Correlação entre o Número de MCs e de Vasos Sangüíneos no Grupo Nifedipina	80
5.2.5. Correlação do Número de MCs com as Variáveis Farmacológicas no Grupo Nifedipina	80
5.2.6. Correlação entre o Número de MCs e o Grau de Colagenização no Grupo Nifedipina	82
6. DISCUSSÃO	83
7. CONCLUSÕES	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
9. ANEXOS	108

LISTA DE ABREVIATURAS

BCC - Bloqueadores dos canais de cálcio

BSA - Bovine serum albumina (Soro-albumina bovina)

CAM - Cellular adhesion molecules (Moléculas de adesão celular)

CG - Crescimento Gengival

CTGF - Connective tissue growth factor (Fator de crescimento de tecido conjuntivo)

DAB - Diaminobenzidine (Diaminobenzidina)

DNA - Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucléico)

EGF - Epidermal growth factor (Fator de crescimento epidérmico)

Elisa - Enzyme linked immuno sorbent assay (Ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas)

FGF - Fibroblast growth factor (Fator de crescimento de fibroblastos)

GAG – Glicosaminoglicanos

G/G – guanina-guanina

GIPB - Gengivite induzida pela placa bacteriana

GM-CSF - Macrophage colonies stimulating factor (Fator estimulador de colônias de macrófagos)

GN - Gengiva normal

G/TA – guanina/timina, adenina

H-E - Hematoxilina-eosina

HSD - Hidroxiesteróide desidrogenase

Ig - Imunoglobulina

IL – Interleucina

kD – Massa molecular (kDa)

KGF - Keratinocyte growth factor (Fator de crescimento para queratinócitos)

LPS – Lipopolissacarídeos

M - mol

MC - Mastócito

MC_C - Mastócito que contém apenas quimase

MCP – Monocyte chemoattractant protein (Proteína quimioatrativa de monócitos)

MC_{TC} - Mastócito com fenótipo de conjuntivo, contém triptase e quimase

MC_T - Mastócito com fenótipo de mucosa, contém apenas triptase

MDR - Gene da resistência múltipla

µg- Micrograma

µL - Microlitro

µm – Micrômetro

µM- micromol

mm - Milímetro

MMP - Metaloproteinase

NDST - Enzima responsável pela ativação da síntese da heparina

ng - nanograma

P-gp - P-glicoproteína

PAI - Ativador de plasminogênio

PCL - Periodontite crônica localizada

PCR - Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)

PDGF-β - Platelet-derived growth factor-β (Fator de crescimento derivado de plaquetas-β)

PGE2 - Prostaglandina E2

PMI - Procedimento cirúrgico de ligação da artéria coronária

Pro-MMP – Procolagenase

RNA_m - Messenger Ribonucleic Acid (Ácido ribonucléico mensageiro)

RP - Fenômeno de Raynaud

RTK - Kinase tirosine receptor (Receptor tirosina quinase)

SCF - Stem cell factor (Fator para células indiferenciadas)

SIN-1 - Sidnonimina-1

SCF - Stem cell factor (Fator estimulador de célula tronco)

SSc - Esclerose sistêmica

SVEGR-1 - Receptor vascular endothelial growth factor (Receptor para fator de crescimento vascular endotelial)

TBS - Tris buffered saline (solução salina tamponada com TRIS)

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TGF- β - Transforming growth factor – β (Fator de crescimento transformador- β)

TNF- α - Tumor necrosis factor- α (Fator de necrose tumoral- α)

VEGF - Vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento vascular endotelial)

1 INTRODUÇÃO

Com o avanço da prevalência e da incidência da hipertensão na população, tem ocorrido um aumento na adesão à terapia medicamentosa anti-hipertensiva. Muitas destas medicações estão associadas a efeitos colaterais na cavidade bucal como é o caso dos bloqueadores dos canais de cálcio (BCC). Dentre os BCC associados à alteração gengival, encontram-se as diidropiridinas (nifedipina e amlodipina), as fenilalquilaminas (verapamil) e as benzotiazepinas (diltiazem), sendo que a nifedipina é a medicação anti-hipertensiva que apresenta maior prevalência de alteração gengival (ELLIS *et al.*, 1999; ESLAMI *et al.*, 2004; GROOVER *et al.*, 2007). No que se refere ao perfil farmacológico, a nifedipina atua como um bloqueador de cálcio específico, inibindo o influxo de cálcio, tanto no miocárdio como no músculo esquelético, resultando na diminuição da pressão arterial e da resistência vascular (ELLIS *et al.*, 1999; SOUSA, 2002). Paralelamente, a nifedipina causa como efeito adverso o crescimento gengival (CG), ocasionando problemas estéticos, prejudicando a mastigação e a fonação (CASTRO, 2006).

O CG representa metade das lesões proliferativas que acometem a cavidade bucal, sendo definido como um grupo de alterações relacionadas com um aumento da mucosa gengival. Sua etiologia é multivariada, uma vez que pode ser transmitido de forma hereditária (fibromatose gengival hereditária), como componente ou não de uma síndrome (doença de Crohn, síndrome de Cross, síndrome de Laband, síndrome de Ramon); pode estar relacionado à presença de condições inflamatórias (granuloma piogênico, lesão periférica de células gigantes, hiperplasia fibrosa) e tumorais (leucemia aguda e paramieloblástica); pode ainda ser um efeito colateral do uso de medicações ou de caráter idiopático

(MARTELLI-JUNIOR *et al.*, 2000; BELLINI, 2003; CLOCHERET *et al.*, 2003). Acredita-se que o CG idiopático possivelmente esteja relacionado a desordens genéticas não diagnosticadas (CLOCHERET *et al.*, 2003).

Além dos fatores causais, o CG está relacionado a fatores de risco que atuam na prevalência e na gravidade do aumento gengival entre os indivíduos. Dentre alguns dos fatores de risco estão: idade, gênero, raça, hábitos de higiene bucal, presença de placa bacteriana, número de dentes, posição dentária, má oclusão, respiração bucal, alteração hormonal, uso do tabaco, duração da terapia medicamentosa, nível plasmático da droga, sinergismo entre as medicações, dieta (deficiência de vitamina C) e presença de inflamação gengival (WILCOX & GRIMES, 1963; LEGGOTT *et al.*, 1991; NISHIDA *et al.*, 2000; BELLINI, 2003; CORREA, 2004). Logo, o CG é definido como um processo multifatorial influenciado por variáveis extrínsecas e intrínsecas ao indivíduo, resultando na alteração do periodonto (NURMENIEMI *et al.*, 1999; FIGUEIREDO & PARRA, 2002).

Quanto à localização, o CG associado à terapia medicamentosa não afeta todo o periodonto (peri= em torno de, odonto = dente), mas apenas o periodonto de proteção (FIGUEIREDO & PARRA, 2002). O periodonto de proteção é formado por uma mucosa queratinizada (gengiva) e uma mucosa alveolar, delimitadas pela linha muco-gengival. A gengiva inserida saudável é composta por um epitélio queratinizado estratificado e pela lâmina própria. A lâmina própria é constituída por um tecido conjuntivo fibroso, rico em fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos e pouco ou nenhum infiltrado inflamatório (células plasmáticas, linfócitos e histiócitos, principalmente). A membrana basal mostra-se irregular devido à presença de cristas associadas ao tecido conjuntivo subjacente. Em continuidade com a membrana basal estão as células cilíndricas da camada

basal. Logo acima desta, são encontradas células poliédricas da camada espinhosa. Em seqüência, é observada a camada granulosa composta de células alongadas e a camada córnea composta de células com citoplasma repleto de microfilamentos (NURMENNIEMI, 2006).

Devido ao tecido conjuntivo rico em fibras colágenas tipo I, a mucosa queratinizada está firmemente aderida ao dente e ao osso subjacente, sendo clinicamente rígida e imóvel. Diferentemente, a mucosa alveolar apresenta um epitélio não queratinizado, além de fibras elásticas que determinam mobilidade (BELLINI, 2003). Sob ação dos BCC, os tecidos gengivais apresentam alterações no epitélio queratinizado, na matriz extracelular do tecido conjuntivo, na densidade de fibras colágenas tipo 1, na densidade de células inflamatórias e de seus respectivos mediadores químicos (NURMENNIEMI *et al.*, 1999; KATAOKA *et al.*, 2001; LINDEN *et al.*, 2001; PERNU & KNUUTTILA, 2001; NURMENNIEMI *et al.*, 2002; ESLAMI *et al.*, 2004; KATAOKA *et al.*, 2005; CASTRO, 2006; GROOVER *et al.*, 2007). O risco de desenvolvimento destas alterações entre os usuários de BCC, parece ser maior nos indivíduos sob terapia com nifedipina, o que poderia estar relacionado à interação da droga com as células do tecido gengival (MERAW & SHERIDAN, 1998; ELLIS *et al.*, 1999).

Dados da literatura mostraram que intimamente à camada basal, eram encontradas células do infiltrado inflamatório, sendo que estas células foram observadas também no epitélio (DJEMILEVA *et al.*, 1999; NURMENNIEMI *et al.*, 2001; PERNU & KNUUTTILA, 2001; NURMENNIEMI *et al.*, 2002). Quando feita a avaliação do infiltrado inflamatório, foi observada a presença de mastócitos (MCs), sugerindo que estas células possam ter um papel importante no desenvolvimento do CG (ESLAMI *et al.*, 2004). Logo, o CG nos usuários de nifedipina pode ser

resultado da sinergia entre o sistema de defesa do periodonto e a ação da droga nos seus tecidos bucais (NURMENNIEMI *et al.*, 1999).

A relevância desta investigação deve-se ao aumento da incidência de hipertensão arterial e conseqüentemente, da utilização de terapia anti-hipertensiva com BCC. Logo, os resultados deste estudo além de ajudarem a compreender o efeito da nifedipina sobre a população de MCs gengivais, podem ser úteis para esclarecer o papel dos MCs na patogênese do CG. Como perspectiva futura, espera-se o desenvolvimento de medidas preventivas e terapêuticas para os pacientes suscetíveis ao CG induzido por medicação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Crescimento Gengival Induzido por Medicação

O CG induzido por medicação é de evolução lenta, multifatorial e variável quanto à magnitude e prevalência tanto entre os indivíduos, quanto nos tecidos gengivais do mesmo indivíduo. Na literatura, o CG foi relacionado à terapia anticonvulsivante com a fenitoína; à terapia imunodepressora com a ciclosporina e à terapia anti-hipertensiva com BCC, como a nifedipina (BELLINI, 2003; RAMALHO *et al.*, 2003).

O primeiro estudo correlacionando o CG à ação de medicamentos deve-se a Kimball (1939), *apud* Ramalho *et al.* (2003), descrevendo o CG como efeito colateral do uso de fenitoína no tratamento de epilepsia. Na literatura, a prevalência do CG em pacientes sob terapia com fenitoína foi estimada em torno de 50% (HASSELL *et al.*, 1976; MERAW & SHERIDAN, 1998; TRACKMAN & KANTARCI, 2004). Esta prevalência alta relacionou-se ao fato da fenitoína ser a medicação de primeira escolha dentre os anticonvulsivantes, em função de seu preço acessível e da sua eficácia. Esta medicação atua estabilizando as membranas de células nervosas em relação ao influxo de íons sódio, potássio e cálcio. Conseqüentemente, impede que haja deflagrações neuronais repetitivas. No entanto, após os 3 primeiros meses de terapia medicamentosa, o CG tornou-se aparente (HASSEL *et al.*, 1976; HASSEL & HEFTI, 1991).

Em 1983, Rateitschak-Pluss *et al.*, *apud* Ramalho *et al.* (2003), publicaram o primeiro estudo sobre o efeito da ciclosporina no CG em homens transplantados renais. A ciclosporina foi utilizada inicialmente em 1978, em pacientes

transplantados renais, e desde então tem sido administrada como monoterapia ou associada a outras drogas imunodepressoras para a prevenção da rejeição de transplantes de órgãos (MARSHALL & BARTOLD, 1998; RAMALHO *et al.*, 2003). Considerada uma droga fundamental, a ciclosporina é freqüentemente utilizada na clínica devido ao seu efeito imunodepressor. A ciclosporina bloqueia a proteína fosfatase, calcineurina, necessária para a ativação das células T no estágio precoce do ciclo celular em G0 (intervalo do ciclo celular no qual a proliferação celular está interrompida) e G1 (intervalo do ciclo celular que antecede a síntese de DNA-ácido desoxirribonucléico). Conseqüentemente, não ocorre a ativação das células T e fica limitada a transcrição do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) que codifica a interleucina-2 (IL-2). Logo, a ciclosporina inibe também a expressão de receptores de membrana para IL-2, interrompendo a transcrição do seu gene e inibindo a sua produção pelos linfócitos T auxiliares, resultando na ação imunodepressora (BACAL *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 2005). Paralelamente, ocorre também a inibição de vários mediadores e citocinas que participam da resposta imunitária, contribuindo assim para o desenvolvimento dos efeitos secundários como a hipertensão e o CG (BACAL *et al.*, 1999; NURMENNIEMI, 2006). A prevalência do CG em pacientes sob terapia imunodepressora foi estimada entre 25% e 40% e iniciava-se após 3 meses de terapia (MARSHALL & BARTOLD, 1998; BRESCHI *et al.*, 2000; LINDEN *et al.*, 2001; TRACKMAN & KANTARCI, 2004).

O primeiro relato sobre o CG induzido pela nifedipina foi em 1984 (LEDERMAN *et al.*, 1984, *apud* MARSHALL & BARTOLD, 1998). A nifedipina inibe o influxo de cálcio diretamente das células do músculo cardíaco, reduzindo sua contração e o consumo de oxigênio. Ao reduzir a concentração do cálcio intracelular, a nifedipina causa dilatação coronária e periférica. Logo, é

considerada uma medicação eficaz para o tratamento de algumas alterações cardiovasculares como a hipertensão e a *angina pectoris*. Entretanto, dentre os efeitos colaterais está o desenvolvimento do aumento gengival (MARSHALL & BARTOLD, 1998). Na maioria dos estudos, a prevalência de CG induzido pela nifedipina foi considerada baixa, variando entre 6% e 20% (ELLIS *et al.*, 1999; BRESCHI *et al.*, 2000; LINDEN *et al.*, 2001; TRACKMAN & KANTARCI, 2004).

Ellis *et al.* (1999) avaliaram a prevalência do CG induzido pelos BCC. Foram avaliados 912 indivíduos usuários de BCC, sendo que 442 utilizavam nifedipina, 181 pacientes utilizavam amlopidina, 186 usavam diltiazem e 102 indivíduos não usavam medicação alguma. O objetivo deste estudo foi investigar a associação entre os fatores de risco com o desenvolvimento do CG. Todos os pacientes foram submetidos à avaliação periodontal (índice de placa, índice de sangramento papilar e porcentagem dos sítios com profundidade de sondagem superior a 3 mm). Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos usuários de medicação, quando avaliadas variáveis como: idade, gênero ou duração da terapia medicamentosa. Uma grande porcentagem de usuários de nifedipina apresentou CG quando comparados ao grupo controle, ao grupo amlodipina ou ao grupo diltiazem. No grupo sob uso de nifedipina, o sangramento papilar, o índice de placa e o gênero tiveram significativa associação com a gravidade do CG. Com modelo de regressão múltipla, somente o índice de sangramento papilar e o gênero apresentaram correlação significativa com a gravidade do CG induzido pela nifedipina. Estes resultados indicaram que a prevalência do CG induzido pelos BCC foi baixa, sendo mais significativo nos usuários de nifedipina.

James *et al.* (2000) investigaram a prevalência do CG em transplantados renais sob terapia associada (ciclosporina e BCC). Para o estudo foram selecionados 54 transplantados renais (41 homens e 13 mulheres) do centro de Manchester e 81 pacientes (59 homens e 22 mulheres) do hospital de Belfast, sendo que todos tinham feito transplante renal e utilizavam terapia com ciclosporina associada a nifedipina ou amlodipina há pelo menos um ano. Os resultados revelaram que 135 pacientes (54 de Manchester e 81 de Belfast) faziam uso de terapia associada (ciclosporina e BCC), sendo que destes 89 usavam nifedipina e 46 amlodipina. Não houve diferença significativa na gravidade do CG entre os grupos nifedipina e amlodipina. Entretanto, foi observado que o CG foi mais grave nas áreas vestibulares dos caninos e incisivos laterais tanto nos usuários de nifedipina quanto de amlodipina. Na avaliação das faces linguais dos incisivos inferiores; o grupo amlodipina apresentou CG mais grave quando comparado ao grupo nifedipina. O grupo amlodipina apresentou uma proporção maior de CG (72%) quando comparado ao grupo nifedipina (53%), tendo sido estatisticamente significativa. A prevalência do CG em pacientes jovens (<35 anos) foi alta nos grupos usuários de amlodipina e de nifedipina (>70%). Entretanto, nos indivíduos mais velhos, a prevalência de CG foi menor nos usuários de nifedipina (40%) quando comparados aos usuários de amlodipina (72%). Logo, estes resultados foram indicativos de que a prevalência do CG em transplantados renais sob terapia associada (imunodepressor e BCC) foi menor nos usuários de ciclosporina e nifedipina em relação aos usuários de ciclosporina e amlodipina.

Morisaki *et al.* (2000) avaliaram o CG em ratos tratados com diltiazem, ciclosporina e nifedipina. Para o estudo foram utilizados 30 ratos Fischer, sendo

que todos tinham 15 dias, eram *germ-free* e machos. Os animais foram divididos em 6 grupos de 5 animais: grupo A (controle), grupo B (ciclosporina, 50 µg/g durante 7 dias, seguida de 300 µg/g durante 33 dias), grupo C (nifedipina, 100 µg/g durante 7 dias, seguida de 600 µg/g durante 33 dias), grupo D (diltiazem, 1000 µg/g durante 7 dias, seguida de 6000 µg/g durante 33 dias), grupo E (ciclosporina, 50 µg/g durante 7 dias, seguida de 300 µg/g e nifedipina, 100 µg/g durante 7 dias, seguida de 600 µg/g) e grupo F (ciclosporina, 50 µg/g durante 7 dias, seguida de 300 µg/g e diltiazem, 1000 µg/g durante 7 dias, seguida de 6000 µg/g). Após 40 dias, todos os animais foram sacrificados. A avaliação do peso corporal mostrou que os grupos sob suplementação dietética com ciclosporina, ou seja, grupos B, E e F foram significativamente menores quando comparados aos grupos A, C e D, sugerindo que a ciclosporina possa ter um efeito inibidor sobre o crescimento de ratos. Todos os grupos sob suplementação com medicação apresentaram alteração gengival, tendo sido observada maior gravidade no grupo E ($1.020 \pm 63,3 \mu\text{m}$) quando comparado ao grupo F ($895 \pm 43,8 \mu\text{m}$). Os níveis sanguíneos de ciclosporina estavam reduzidos nos ratos do grupo E e F. Logo, pode-se inferir que o CG em ratos foi decorrente do uso da ciclosporina, da nifedipina e do diltiazem, sendo que o efeito aditivo influenciou no crescimento, nos níveis plasmáticos das drogas e na gravidade do CG em ratos.

Romito *et al.* (2000) investigaram a associação entre o CG e a condição clínica e microbiológica de pacientes transplantados cardíacos submetidos à terapia com ciclosporina. Foram selecionados 30 pacientes (10 mulheres e 20 homens – média 44,89 anos), subdivididos entre aqueles que apresentavam CG e aqueles sem CG, submetidos à avaliação periodontal (índice de placa bacteriana, índice gengival, profundidade de sondagem e nível de inserção) e microbiológica.

Os resultados mostraram prevalência de 70% dos casos de CG na região anterior, com manifestação após três meses do início da terapia. Conclui-se que não houve diferença entre os grupos com relação ao gênero dos pacientes, à dosagem de ciclosporina, ao tempo decorrido após o transplante e aos índices periodontais.

Miranda *et al.* (2001) avaliaram a prevalência e o risco do CG induzido pela nifedipina. Selecionaram 65 pacientes sob uso de nifedipina e 147 indivíduos que não faziam uso de medicação alguma. Todos os pacientes foram avaliados periodontalmente quanto à presença de CG (índice de crescimento gengival vertical - GO), índice gengival, índice de placa e profundidade de sondagem. Os resultados mostraram uma prevalência significativamente maior das medidas clínicas no grupo usuário de nifedipina quando comparado ao grupo controle. A análise de regressão nos dois grupos correlacionando as variáveis periodontais e qualitativas mostrou que somente o índice gengival teve associação significativa com o CG. Estes dados indicaram que os pacientes sob terapia com nifedipina apresentaram alto risco para o CG, sendo que a inflamação gengival poderia ser considerada como fator de risco adicional.

Sousa (2002) avaliou a prevalência e a gravidade do crescimento gengival induzido pela nifedipina em pacientes brasileiros. O estudo foi realizado com 35 pacientes sob terapia com nifedipina (grupo teste) e em um grupo controle de 35 indivíduos saudáveis. Foram avaliadas condições demográficas (gênero e idade), condições farmacológicas (dose e duração da terapia), condições periodontais (índice de placa, índice gengival, nível de inserção periodontal, profundidade de sondagem e sangramento à sondagem) e o crescimento gengival. Os resultados foram significativos em 68% dos pacientes do grupo nifedipina e em 23% dos

indivíduos do grupo controle houve CG. No grupo teste, houve correlação com as variáveis periodontais, exceto para o índice de placa. Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre as condições demográficas e farmacológicas quando comparadas ao CG nos dois grupos analisados. Os autores sugeriram que a inflamação gengival pode influenciar na progressão do CG induzido pela nifedipina.

Eslami *et al.* (2004) investigaram a prevalência do CG em pacientes sob terapia com nifedipina e sua correlação com o gênero, a idade, o índice de placa, a dose diária de nifedipina e a duração da terapia medicamentosa. Foram selecionados 200 pacientes (98 homens e 102 mulheres), divididos em 2 grupos: grupo de estudo (51 homens e 49 mulheres usuários de nifedipina) e grupo controle (47 homens e 53 mulheres sob uso de outros anti-hipertensivos). Todos foram avaliados quanto ao índice de placa e índice gengival. Em seguida, foi obtida biópsia gengival de um paciente usuário de nifedipina há 15 meses. Os resultados mostraram que 17% dos indivíduos usuários de nifedipina são afetados pelo CG; no entanto, não foi observado CG no grupo controle. A maior prevalência do CG ocorreu na quarta década de vida, sendo que não foi encontrada correlação significativa entre o índice gengival e a gravidade da gengivite no grupo nifedipina. Houve correlação estatisticamente significativa entre o índice de placa e a dose diária da droga em relação às mudanças gengivais. Logo, estes resultados indicaram uma correlação entre a inflamação gengival e a dose da nifedipina com o CG.

Portanto, os resultados dos estudos citados não foram unânimes na avaliação da correlação entre a prevalência e a gravidade do CG induzido pela nifedipina com o gênero, a idade, a dose diária da droga e a duração da terapia

(ELLIS *et al.*, 1999; MIRANDA *et al.*, 2001; ESLAMI *et al.*, 2004; LINS *et al.*, 2005b; NURMENNIEMI, 2006). Diferentemente, os resultados tendem a mostrar uma correlação positiva entre o padrão de higiene bucal e o grau de inflamação gengival. Apesar dos resultados conflitantes dos estudos, estes concordam que as características clínicas e histológicas observadas no CG são similares independentes do tipo de medicação (HASSEL & HEFTI, 1991; MARSHALL & BARTOLD, 1998; TRACKMAN & KANTARCI, 2004; NURMENNIEMI, 2006).

2.1.1 Características Clínicas do Crescimento Gengival Induzido por Nifedipina

Meraw & Sheridan (1998) relatam que o CG aparece clinicamente entre o primeiro e o terceiro mês de terapia com nifedipina, sendo que o tipo de CG variou de acordo com a dose administrada e com a concentração plasmática da droga em animais. Entretanto, em humanos não foi demonstrada esta correlação. A maior dificuldade em comprovar a correlação entre o CG e um determinado fator de risco deve-se ao fato desta patologia ser multifatorial e envolver uma combinação entre os efeitos da droga, qualidade da higiene bucal e a condição inflamatória do tecido gengival, sugerindo que haja variação na suscetibilidade entre os indivíduos em decorrência da sinergia entre os fatores causais e de risco (MIRANDA *et al.*, 2001; SOUSA, 2002; BELLINI, 2003; CORREA, 2004; NURMENNIEMI, 2006).

No paciente suscetível, o CG induzido pela nifedipina apresentou-se como um aumento lobular ou nodular inicialmente restrito à papila interdentária e posteriormente se estendendo às faces livres dos dentes anteriores. Sua

gravidade máxima ocorreu entre 12 e 18 meses de terapia medicamentosa (LINS *et al.*, 2005b). O tecido gengival aumentado apresentou-se firme e denso, podendo em alguns casos ter aspecto edematoso e hiperemiado devido ao acúmulo da placa bacteriana. Estas mudanças estavam limitadas à gengiva inserida, não tendo sido observado aumento nas áreas edêntulas (ESLAMI *et al.*, 2004; GNOATTO, 2005; GROOVER *et al.*, 2007). Entre os sintomas mais freqüentes estavam: dor, sangramento, flacidez tecidual, comprometimento estético e fonético, alteração da posição dentária e cáries (MIRANDA *et al.*, 2001). Dentre os sinais, observou-se que há sangramento à sondagem e aumento tecidual, sendo que a inflamação gengival foi mais pronunciada na face vestibular da gengiva (RAMALHO *et al.*, 2003).

As alterações clínicas observadas no CG estavam relacionadas à ação da droga sobre os tecidos gengivais, sendo que o mecanismo farmacocinético variou conforme a droga. Logo, os estudos sugeriram que medicações distintas atuariam de maneira diferente no tecido gengival, entretanto resultando em aspectos clínicos comuns (HASSEL & HEFTI, 1991; MARSHALL & BARTOLD, 1998; GNOATTO, 2005; LINS *et al.*, 2005b;).

2.1.2 Características Microscópicas do Crescimento Gengival Induzido por Medicação

As mudanças histopatológicas observadas nos tecidos gengivais não foram consideradas patognomônicas para os usuários de nifedipina (MERAW & SHERIDAN, 1998; RAMALHO *et al.*, 2003). Os resultados da avaliação histológica dos tecidos gengivais sob influência da nifedipina mostraram a presença de um

epitélio predominantemente paraqueratinizado, com presença de acantose e aumento da espessura epitelial, principalmente da camada basal (DJEMILEVA *et al.*, 1999; NURMENNIEMI *et al.*, 2001; PERNU & KNUUTTILA, 2001; NURMENNIEMI *et al.*, 2002).

Foi observado o aprofundamento das cristas epiteliais em direção ao tecido conjuntivo. Estas cristas eram constituídas principalmente pelas células da camada basal e espinhosa, sendo que seus núcleos apresentavam-se predominantemente alongados quando comparados ao tecido gengival normal. Os espaços intercelulares na camada espinhosa mostraram-se aumentados, mas o contato intercelular estava preservado pela presença de desmossomos (DJEMILEVA *et al.*, 1999; NURMENNIEMI *et al.*, 2001; PERNU & KNUUTTILA, 2001; NURMENNIEMI *et al.*, 2002).

Djemileva *et al* (1999) sugeriram que o aumento da espessura e das cristas epiteliais observadas nos tecidos gengivais poderia ser resultado da ação da nifedipina, enquanto que a presença de espaços intercelulares amplos e o aumento do infiltrado inflamatório seriam atribuídos à ação de microorganismos e de seus produtos, levando ao aumento do fluxo do fluido gengival e do edema tecidual. Logo, a participação de mecanismos imunes poderia relacionar-se ao aumento de microorganismos virulentos na proximidade gengival; mesmo assim não foi descartada uma possível ação da nifedipina sobre a resposta inflamatória.

Foi observado um grande acúmulo de matriz extracelular no tecido conjuntivo, particularmente componentes do colágeno, com variado grau de infiltrado inflamatório (KATAOKA *et al.*, 2001; KATAOKA *et al.*, 2005). O tecido conjuntivo apresentou muitos fibroblastos, áreas de colágeno desorganizadas e a presença de vasos sangüíneos congestos. Acredita-se que a predominância

destes seria decorrente da ação da nifedipina sobre a dilatação dos vasos (DJEMILEVA *et al.*, 1999). Ainda foram observadas áreas com grande quantidade de fibras colágenas de aspecto denso e mais maduro que na gengiva normal e aumento da substância fundamental com grande quantidade de glicosaminoglicanos (GAGs) (KATAOKA *et al.*, 2001; PERNU & KNUUTTILA, 2001; SHIMIZU *et al.*, 2002; BELLINI, 2003; RAMALHO *et al.*, 2003; CORREA, 2004).

Apesar dos efeitos farmacológicos e do princípio ativo dos BCC, dos imunodepressores e dos anticonvulsivantes serem diferentes, estas drogas não apresentaram diferenças no aspecto histopatológico pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) (LINS *et al.*, 2005b). No entanto, quanto à proporção dos componentes da matriz extracelular da gengiva humana, foram relatadas diferenças entre as drogas.

Bonnaure-Mallet *et al.* (1995) avaliaram a proporção e a correlação de diferentes componentes da matriz extracelular (colágeno tipo III, tipo IV e fibronectina) com a densidade celular. Para o estudo foram selecionados 4 usuários de ciclosporina, 4 usuários de hidantoína, 4 usuários de nifedipina, 4 indivíduos com gengivite e 4 indivíduos saudáveis (grupo controle). As amostras foram submetidas à análise morfológica com microscópio óptico, análise histoquímica para fibras colágenas e elásticas e análise imunoistoquímica para colágeno. Cada campo microscópico media 0,7 x 0,7 mm, tendo sido avaliados 10 campos para cada um dos três cortes selecionados em cada grupo. Os resultados da análise morfológica mostraram que os componentes predominantes na matriz extracelular foram: vasos sanguíneos, fibroblastos e colágeno, sendo que as fibras elásticas representaram menos que 3% do total das fibras. A área ocupada pelos vasos foi significativamente maior no grupo nifedipina e hidantoína quando

comparado ao grupo controle, grupo ciclosporina e grupo gengivite. A área ocupada pelos fibroblastos foi significativamente maior no grupo hidantoína quando comparado ao grupo nifedipina e ciclosporina. A porcentagem da área ocupada pelo colágeno foi maior no grupo nifedipina e no grupo controle quando comparados aos demais. O colágeno tipo IV foi significativamente mais presente no grupo ciclosporina quando comparado aos demais. A área ocupada pelo colágeno tipo III foi maior no grupo gengivite e no grupo hidantoína quando comparados aos demais. A porcentagem da área ocupada pela fibronectina foi maior no grupo nifedipina quando comparada aos demais, assim como a porcentagem da área ocupada pelas fibras elásticas foi maior no grupo nifedipina e no grupo controle. O autor concluiu que há diferenças quantitativas nos componentes da matriz extracelular. Entretanto, estes resultados devem ser considerados com ressalvas, uma vez que o tamanho da amostra foi pequeno.

Quanto à terminologia, antigamente o CG era descrito como uma hipertrofia ou hiperplasia gengival devido à análise histológica revelar um grande número de fibroblastos no tecido conjuntivo. Contudo, estes termos foram considerados inadequados, uma vez que não refletem com exatidão a composição histológica do tecido gengival alterado pela medicação. Atualmente estas alterações gengivais foram denominadas de CG ou aumento gengival, uma vez que estavam relacionadas com um acúmulo de matriz extracelular no tecido conjuntivo, particularmente das proteínas fibrosas, e não apenas relacionadas com um aumento da proliferação dos fibroblastos (KATAOKA *et al.*, 2005).

2.1.3 Etiologia do CG Induzido por Medicação

Inúmeras teorias foram propostas na tentativa de explicar o CG induzido pela nifedipina, sendo que a etiopatogenia do CG induzido por medicação baseia-se apenas em hipóteses que tentam responder a questão primordial a respeito da atuação da droga sobre os tecidos gengivais (MARSHALL & BARTOLD, 1998; KATAOKA *et al.*, 2001; TRACKMAN & KANTARCI, 2004; GNOATTO, 2005; KATAOKA *et al.*, 2005; LINS *et al.*, 2005a; NURMENNIEMI, 2006). Os estudos sugeriram que o CG poderia ocorrer em diversos níveis (alteração da matriz extracelular, alterações celulares, atuação exacerbada de mediadores químicos, alteração na expressão gênica e alteração no metabolismo do cálcio) predispondo à alteração na resposta imune-inflamatória dos pacientes sob terapia medicamentosa com BCC (MARSHALL & BARTOLD, 1998; ASHARA *et al.*, 2000; PERNU & KNUUTTILA, 2001; NURMENNIEMI *et al.*, 2002; NURMENNIEMI *et al.*, 2004; NURMENNIEMI, 2006; GROOVER *et al.*, 2007).

Uma vez que a matriz extracelular do tecido conjuntivo é composta por proteínas fibrosas (colágeno e elastina) e proteínas não fibrosas (glicoproteínas alongadas, proteoglicanos e GAGs) envolvidas por um gel hidrofílico de polissacarídeos associados ou não a proteínas; haveria uma diversidade de mecanismos de ação da nifedipina sobre a matriz extracelular e seus componentes. Estes resultariam em uma alteração na degradação do colágeno e no acúmulo da matriz extracelular (GNOATTO, 2005; KATAOKA *et al.*, 2005). Logo, acredita-se que a nifedipina poderia atuar sobre os mediadores químicos e as células que participam da homeostasia da matriz extracelular (KATAOKA *et al.*, 2005).

Tanizaki *et al.* (1983) avaliaram o efeito inibidor da nifedipina sobre a liberação da histamina pelos MCs de ratos. Para o estudo foram utilizados ratos

sensibilizados com ovalbumina. Após 12 a 14 dias da sensibilização, os ratos foram sacrificados e os MCs peritoneais isolados. Foi realizada a cultura de células incubadas com cálcio radioativo (Ca^{45}), ovalbumina sozinha ou associada a nifedipina em diversas proporções. Em seguida, foi removido o cálcio excedente através de um filtro e medida a liberação da histamina por técnica de espectrofluorimetria. Os resultados revelaram que as células estimuladas com ovalbumina apresentaram maior influxo do cálcio. O aumento do cálcio utilizado pelas células estimuladas foi paralelo ao aumento numérico das células. Estes resultados revelaram que o aumento do influxo do cálcio nas células estimuladas foi induzido pela reação antígeno-anticorpo. Foi observado também que a nifedipina inibiu o influxo do cálcio nas células estimuladas com ovalbumina, sendo que o efeito inibidor da nifedipina assumiu o seu pico na concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$, com um percentual de inibição de 63,5%. Este efeito foi suprimido na concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$. Quando avaliada a liberação da histamina, esta foi inibida pela nifedipina. O efeito inibidor da nifedipina atingiu seu pico na concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$, tendo seu percentual de inibição máximo de 20,4%. Este efeito foi suprimido na concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$. Estes resultados indicaram que a nifedipina inibiu o influxo do cálcio em MCs peritoneais, seguido da inibição da liberação da histamina.

Ozaki *et al.* (1998) investigaram a localização e a distribuição da elastase no CG induzido pela nifedipina. Para o estudo foram utilizados dois grupos de ratos Fischer: 32 ratos Fischer *germ-free* com 20 dias e 34 ratos Fischer alimentados com dieta suplementada com nifedipina (grupo experimental) e 32 ratos Fischer *germ-free* sem suplementação com droga (grupo controle). Os animais foram sacrificados nas semanas 2, 8, 16 e 32. Foram obtidas biópsias da

mandíbula, na área entre o primeiro e o segundo molar. Por meio de técnica imunoistoquímica, foi avaliada a atividade da elastase e a contagem foi realizada com microscópio utilizando um aumento de 200x e retículo com área de 0,0625 mm². Os resultados da análise qualitativa revelaram que o CG era aparente após 8 semanas do início da medicação, acometendo particularmente as faces interproximais e progredindo ao longo das 32 semanas posteriores. Chamou a atenção o progressivo aumento do infiltrado inflamatório no grupo experimental quando comparado ao grupo controle. Na avaliação da área com CG induzido pela fenitoína foi observado aumento significativo no grupo experimental quando comparado ao grupo controle, na semana 8, semana 16 e 32. A análise imunoistoquímica revelou poucas células inflamatórias e elastase-positivas presentes no grupo controle, não tendo sido observado epitélio alongado. Por outro lado, o grupo experimental apresentou, após 2 semanas de dieta com nifedipina, presença de células inflamatórias no tecido conjuntivo adjacente ao epitélio da bolsa, com predominância de neutrófilos. As mudanças histopatológicas mostraram-se evidentes após 8 semanas, tendo sido observada uma maior densidade de infiltrado inflamatório e de células elastase-positivas tanto no conjuntivo como no epitélio. Foi observado aumento progressivo do epitélio, do infiltrado e das células elastase-positivas no grupo experimental ao longo do tempo. No grupo controle foi observado aumento do infiltrado inflamatório e das células elastase-positivas no período de 32 semanas quando comparado a segunda e oitava semanas. As células elastase-positivas foram predominantemente os neutrófilos e alguns macrófagos. Quando comparados os grupos experimental e controle, houve aumento significativo na porcentagem de células elastase-positivas no grupo experimental ao longo da semana 8, 16 e 32.

Entretanto, a porcentagem destas células, em cada semana avaliada, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Estes resultados sugeriram que enzimas como a elastase poderiam estar envolvidas com a resposta imunoinflamatória no CG induzido pela nifedipina em ratos. Segundo Sköld *et al.* (1999), uma possível explicação para esta associação, estaria na atuação da elastase na manutenção da homeostase da matriz extracelular.

Nurmenniemi *et al.* (1999) estudaram o efeito da nifedipina sobre as células de Langerhans. As amostras gengivais foram obtidas de pacientes subdivididos em quatro grupos: grupo de usuários de imunodepressores (ciclosporina, prednisolona e azatioprina) (n=11), grupo de usuários de terapia combinada (ciclosporina, prednisolona, azatioprina, nifedipina) (n=11), grupo de usuários de nifedipina (n=12) e grupo controle de pessoas saudáveis (n=28). A avaliação imunohistoquímica foi realizada com anticorpos anti-CD1a e os resultados revelaram a presença de um moderado infiltrado inflamatório com redução das células de Langerhans nos grupos sob terapia medicamentosa quando comparados ao grupo controle. A densidade de células CD1a-positivas foi significativamente menor no epitélio sulcular do grupo nifedipina quando comparado ao grupo imunodepressor, ou ao grupo de terapia associada. Os resultados revelaram que a redução na densidade das células de Langerhans estaria associada ao CG induzido por nifedipina e imunodepressores.

Saito *et al.* (1999, 2000) examinaram a expressão da proteína p53, do antígeno anti-ki-67, das oncoproteínas bcl-2 e c-Myc no aumento gengival relacionado ao uso de nifedipina e fenitoína. Para o estudo foram obtidas biópsias gengivais de 4 pacientes (2 homens e 2 mulheres) usuários de nifedipina, de 7 pacientes (5 homens e 2 mulheres) usuários de fenitoína e de 11 indivíduos

saudáveis. As biópsias foram submetidas às técnicas imunoistoquímicas. Os resultados mostraram expressão do anti-p53 no epitélio gengival de 2 pacientes do grupo nifedipina e de 4 do grupo fenitoína. Sendo que não houve diferença entre estes grupos. O grupo nifedipina apresentou uma distribuição média do anti-ki-67 de 16.7, enquanto que o grupo fenitoína apresentou uma distribuição média de 17.5, tendo sido estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença entre os grupos sob terapia medicamentosa. Quanto à expressão da oncoproteína c-Myc, 4 pacientes do grupo nifedipina e 5 do grupo fenitoína apresentaram expressão; enquanto que 5 pacientes do grupo nifedipina e 7 pacientes do grupo fenitoína apresentaram expressão positiva do bcl-2 na camada basal e suprabaasal do epitélio gengival. No entanto, não houve diferença na expressão do c-Myc e do bcl-2 entre os grupos nifedipina e fenitoína. Por outro lado, 5 controles apresentaram expressão negativa do c-Myc e pequena expressão do bcl-2, restrita à camada basal. Estes resultados indicaram que a etiopatogenia do CG induzido pela nifedipina e pela fenitoína poderia ter correlação com alteração do DNA. Foi correlacionada a expressão do ki-67 com a prevenção da expansão das células epiteliais; enquanto que as oncoproteínas c-Myc e bcl-2, foram associadas ao aumento da atividade das células mitóticas. Segundo Saito *et al.* (2005), o sinergismo entre as oncoproteínas c-Myc e bcl-2 poderia exacerbar a proliferação do epitélio.

Das & Olsen (2000) examinaram o efeito da nifedipina na secreção do fator de crescimento para queratinócitos (KGF) e na transcrição do gene para KGF em fibroblastos gengivais *in vitro*. Foram coletadas biópsias de 5 indivíduos com gengiva normal e durante 6 dias foi feita a cultura de fibroblastos com 100 e 200 ng/ml de nifedipina e sem nifedipina (controle); além do ensaio imunoabsorvente

de ligação de enzimas (ELISA) para avaliação dos níveis de KGF e de reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliação do gene para KGF. Os resultados mostraram que houve aumento progressivo dos níveis de KGF em meios de cultura com 100 e 200 ng/ml de nifedipina, tendo sido 1.9 e 3.2 vezes maior que os valores encontrados no grupo controle, respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de KGF entre as duas concentrações de nifedipina no dia 5. Também houve diferença significativa nos níveis de transcrição do gene KGF entre os grupos nifedipina e controle. Estes resultados revelaram que a nifedipina poderia alterar tanto a secreção do KGF quanto a atividade do gene para o KGF nos fibroblastos gengivais, contribuindo para o desenvolvimento do CG.

Fujimori *et al.* (2001) investigaram os efeitos da nifedipina na proliferação e na sobrevivência dos fibroblastos gengivais. Para o estudo foram realizadas culturas de fibroblastos e de macrófagos RAW264 obtidas da gengiva humana e suplementadas com BCC (nifedipina, nicardipina, verapamil e diltiazem) durante 1 a 2 semanas. Foram avaliados os efeitos dos BCC na proliferação dos fibroblastos pela determinação da incorporação de ³H-timidina ao DNA celular. Também foi avaliado o efeito dos BCC sobre a morte dos fibroblastos induzida pelos macrófagos estimulados pelos lipopolissacarídeos (LPS). Os resultados mostraram que a nifedipina (1 µM) inibiu o aumento da morte dos fibroblastos, sendo esta inibição dependente da concentração da droga. A morte dos fibroblastos induzida pelos LPS foi inibida pela adição de nifedipina (1 µM). Esta morte celular foi deprimida pela nifedipina (80%) e pela nicardipina, não tendo sido observada no diltiazem e no verapamil. A morte celular induzida por sidnonimina (SIN-1), um co-doador de óxido nítrico e superóxidos, não foi afetada

pela nifedipina e foi efetiva na indução da morte dos fibroblastos e dos macrófagos. A indução da síntese de óxido nítrico foi deprimida pela nifedipina e pela nicardipina, não tendo sido inibida pelo diltiazem ou pelo verapamil. Estes resultados sugeriram que o CG induzido pelos BCC pode ser resultado da perda da homeostasia entre a proliferação e morte celular dos fibroblastos. A inibição da morte celular pode ser decorrente da redução das concentrações do cálcio intracelular devido ao bloqueio dos canais de cálcio tipo L, conseqüentemente afetaria a morte celular induzida pela aderência. Por outro lado, a morte celular poderia ser inibida por uma via cálcio-independente através da inibição da produção e síntese dos derivados de óxido nítrico pela nifedipina e pela nicardipina.

Kataoka *et al.* (2001) realizaram um estudo em ratos avaliando o efeito da nifedipina sobre o metabolismo do colágeno tipo I na gengiva. Para o estudo, foram selecionados 344 ratos Fisher machos com 20 dias. Os ratos foram divididos em 2 grupos: grupo nifedipina (ratos sob dieta suplementada com nifedipina 125 mg/kg na primeira semana e aumentada para 250 mg/kg nas demais semanas) e grupo controle (ratos sem suplementação na dieta). Os animais foram sacrificados nos dias 0, 3, 15, 30 e 55 após o início da dieta. As biópsias gengivais foram submetidas à técnica imunoistoquímica (anticorpo anti-colágeno tipo I), PCR e análise por citometria de fluxo. Um CG discreto foi observado no dia 30, tendo sido significativo no dia 55 no grupo nifedipina. Este tecido apresentou aumento do volume quando comparado ao tecido gengival do grupo controle. Chamou a atenção presença de discreto infiltrado inflamatório em algumas biópsias do grupo nifedipina. A densidade do colágeno aumentou em função do tempo nos dois grupos, tendo sido observada maior densidade das

fibras colágenas no grupo nifedipina nos dias 30 e 55. Os níveis de RNAm para colágeno tipo I diminuíram gradualmente nos dois grupos, sendo que a expressão de RNAm foi significativamente menor nos dias 30 e 55 no grupo nifedipina. A fagocitose do colágeno foi menor no grupo nifedipina quando comparado ao grupo controle no dia 30. Estes resultados mostraram que a inibição da fagocitose das fibras colágenas causadas pela nifedipina apareciam 25 dias antes da detecção clínica de CG avançado (dia 55). Logo, estes resultados indicaram que o CG induzido pela nifedipina poderia ser causado pela diminuição na degradação do colágeno, resultando no acúmulo excessivo de colágeno tipo I no tecido conjuntivo.

Nurmenniemi *et al.* (2001) compararam a atividade mitótica dos queratinócitos de gengiva humana saudável e de gengiva sob efeito da nifedipina e de imunodepressores. As amostras gengivais foram obtidas de pacientes subdivididos em quatro grupos: grupo de usuários de imunodepressores (n=11), grupo de usuários de imunodepressores (ciclosporina, prednisona e azatioprina) associados a nifedipina (n=11), grupo de usuários de nifedipina (n=12) e grupo controle de pessoas saudáveis (n=19). Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos na distribuição do infiltrado inflamatório. A espessura do epitélio gengival foi significativamente maior nos grupos sob uso de medicação quando comparados ao grupo controle. A porcentagem de células mitóticas (Ki-67 positivas) foi significativamente maior nos grupos sob terapia medicamentosa. Entretanto, no grupo nifedipina foi encontrada uma correlação negativa significativa entre a duração da terapia e a porcentagem de células Ki-67 positivas no epitélio bucal. Uma correlação positiva estatisticamente significativa foi encontrada entre a dose diária de ciclosporina e a porcentagem de células ki-

67 positivas no epitélio sulcular do grupo usuário de imunodepressores e nifedipina e no epitélio bucal do grupo usuário de imunodepressores. Não houve correlação estatisticamente significativa entre a atividade mitótica e a espessura do epitélio bucal. Os resultados mostraram que a atividade mitótica foi maior nos tecidos com CG induzido por medicação quando comparados aos tecidos saudáveis.

Pernu & Knuutila (2001) avaliaram a diferença na densidade de macrófagos e linfócitos no tecido gengival sob efeito da ciclosporina e da nifedipina. Para o estudo, foram selecionados 9 usuários de nifedipina, 4 transplantados renais sob terapia com imunodepressores (ciclosporina, prednisolona e azatioprina), 9 usuários de terapia associada de imunodepressores e nifedipina e 30 indivíduos saudáveis. Todos os indivíduos receberam tratamento periodontal cirúrgico e as biópsias foram submetidas à técnica imunoistoquímica com anticorpos anti-CD68 (macrófagos), anti-CD20 (linfócitos), anti-CD4 (linfócito T auxiliar) e anti-CD8 (linfócito T citotóxico). A contagem das células foi feita em 3 áreas pré-determinadas: subjacente ao epitélio sulcular, no meio do tecido conjuntivo e adjacente ao epitélio bucal. Os resultados revelaram que a porcentagem de células CD8-positivas foi significativamente maior na área subjacente ao epitélio sulcular dos pacientes sob terapia com nifedipina quando comparados aos demais grupos. Por outro lado, a porcentagem de células CD4 e CD8 positivas foi menor no grupo nifedipina quando comparado ao grupo controle. As proporções de células CD68-positivas foi maior nos grupos sob terapia medicamentosa quando comparados ao grupo controle, no entanto, esta diferença foi estatisticamente significativa apenas no epitélio bucal do grupo nifedipina. Não foi encontrada diferença significativa entre

os grupos quando avaliadas as células CD20-positivas. Estas mudanças observadas na densidade dos macrófagos e linfócitos T-citotóxicos sugeriram que a nifedipina provocaria uma alteração nas populações celulares.

Nishimura *et al.* (2002) examinaram o efeito dos BCC sobre a atividade da catepsina, particularmente da catepsina-L e -B *in vitro*. Para o estudo foram obtidas amostras gengivais de pacientes com periodontite crônica (sítios com e sem doença) e de pacientes com CG induzido pela nifedipina. Foi realizada cultura de fibroblastos adicionando thapsigargin (10 nmol/L), uma substância mobilizadora de cálcio, e nifedipina (0.1 a 100ng/mL) e PCR para RNAm de catepsina. Também foi feito um estudo em camundongos deficientes em catepsina-L, sendo que após 5 semanas foram sacrificados e removidas biópsias gengivais da mandíbula. Os resultados mostraram que a nifedipina, especialmente na concentração de 100 ng/mL, inibiu a atividade da catepsina-(B+L) na forma latente e ativa, entretanto a atividade da catepsina-B não foi influenciada. Quanto à expressão gênica da catepsina, a nifedipina inibiu a expressão do RNAm da catepsina-L no primeiro dia, sendo que, nos demais, exerceu efeito estimulador. Quando avaliado o efeito da mobilização de íons cálcio, a atividade da catepsina-(B+L) foi inibida em meio com thapsigargin e nifedipina. A avaliação histológica do tecido gengival de camundongos mostrou que os animais deficientes em catepsina-L exibiram CG caracterizado por um tecido conjuntivo mais denso, com presença de acantose e cristas epiteliais mais longas. Assim, estes resultados indicaram que a nifedipina atuaria inibindo a expressão gênica e a atividade da catepsina-L, resultando no desenvolvimento do CG.

Shimizu *et al.* (2002) investigaram o efeito da nifedipina na apoptose dos queratinócitos gengivais em animal. Para o estudo, foram utilizados 344 ratos submetidos à dieta com nifedipina, 125 mg/Kg na primeira semana e 250 mg/Kg até o término do experimento. Os ratos foram sacrificados no oitavo, décimo quinto e trigésimo dia após o início da dieta. Foram obtidas para o estudo, amostras do palato e da gengiva do arco inferior. Os exames histológicos mostraram hiperplasia epitelial na gengiva marginal do grupo sacrificado após 30 dias. A espessura epitelial aumentou gradativamente entre os grupos, tendo sido o aumento epitelial significativo entre o décimo quinto e trigésimo dia. Os resultados demonstraram diminuição da porcentagem de apoptose no grupo sacrificado entre o oitavo e décimo quinto dia de uso da nifedipina. Contudo, a nifedipina não induziu aumento da atividade proliferativa dos queratinócitos. Logo, os resultados sugeriram que a nifedipina induzia o CG por prolongar a sobrevivência da célula e não por interferir na sua proliferação.

Johnson (2003) avaliou o efeito da nifedipina e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) sobre o metabolismo dos fibroblastos *in vivo*. Para o estudo foram obtidas biópsias gengivais de 4 pacientes com indicação para extração dentária. Os fibroblastos foram submetidos à cultura de célula e incubados com nifedipina (10^{-7} M) e TNF- α (0, 5, 50 ou 500 ng/mL). Os resultados mostraram que houve efeitos significantes da nifedipina e do TNF- α , associados ou isolados, na proliferação dos fibroblastos e nas taxas de colágeno depositado na matriz extracelular. A nifedipina e o TNF- α (5 a 500 ng/ml) tiveram um efeito inibidor sobre o número de fibroblastos, quando utilizados separadamente. Entretanto, quando adicionada no meio com TNF- α , a nifedipina revertia o efeito inibitório da citocina sobre o número de fibroblastos. Quando utilizados concomitantemente, a

nifedipina e o TNF- α (5 e 50 ng/ml) não alteravam o número de fibroblastos. O TNF- α inibiu significativamente a incorporação da prolina-H às fibras colágenas. No entanto, quando a nifedipina era adicionada, a incorporação desta prolina aumentava de acordo com a dose do TNF- α . Logo, os pacientes sob terapia com nifedipina poderiam ser mais suscetíveis ao CG pelo efeito sinérgico da nifedipina e do TNF- α sobre o metabolismo dos fibroblastos.

Allanore *et al.* (2004) investigaram o efeito da nifedipina nas concentrações das moléculas de adesão das células endoteliais (CAMs), do receptor para fator de crescimento vascular endotelial (SVEGFR-1) e de fatores angiogênicos como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Os exames clínicos e laboratoriais foram feitos em 40 pacientes sob terapia com nifedipina e os resultados comparados àqueles encontrados nos 20 indivíduos do grupo controle. Os resultados mostraram significativa diminuição na concentração do marcador de adesão CAM-1, sugerindo que a nifedipina poderia atuar minimizando a lesão endotelial, uma vez que a circulação de CAM-1 foi considerada um marcador da atividade e gravidade da esclerose sistêmica (SSc).

Hattori & Wang (2004) avaliaram o efeito isolado e concomitante do agente antiproliferativo tranilast e da nifedipina sobre a proliferação de fibroblastos gengivais. Para o estudo, foram obtidos fibroblastos humanos da gengiva e feita cultura de células com nifedipina 10 μ M sozinha (grupo 1) ou associada ao tranilast 100 μ M (grupo 2). Foram avaliadas por mais de 14 dias a proliferação dos fibroblastos e o nível de fator de crescimento de fibroblastos- β (FGF- β). Os resultados mostraram que a nifedipina sozinha ou associada ao tranilast tem efeito sobre a proliferação dos fibroblastos, sendo que o tranilast inibe significativamente o efeito da nifedipina sobre a proliferação e sobre o nível de

FGF- β . Uma das hipóteses levantadas no estudo para a etiopatogenia do CG induzido pelos BCC seria o efeito da droga aumentando a concentração do cálcio no meio extracelular, conseqüentemente este íon facilitaria a liberação do FGF- β . Uma vez liberado, o FGF- β ativaria o receptor tirosina quinase (RTK) e sua expressão gênica levando à proliferação celular e síntese do colágeno tipo I. Os resultados deste estudo indicaram que a nifedipina sozinha estimula a proliferação dos fibroblastos gengivais a partir do seu efeito estimulador sobre a liberação do FGF- β .

Trackman & Kantarci (2004) estudaram os efeitos da terapia medicamentosa sobre o CG. Seus achados sugeriram que as substâncias responsáveis pelo CG sofreriam a influência do desequilíbrio das citocinas nos tecidos gengivais, uma vez que citocinas e fatores de crescimento estavam aumentados nos tecidos humanos sob efeito de drogas e incluíam interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β), fator de crescimento derivado de plaquetas- β (PDGF- β), fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), FGF-2 e TGF- β . Uma vez alterada a homeostasia dos mediadores químicos nos tecidos gengivais, poderiam ocorrer alterações na diferenciação de vários tipos celulares, interferindo sobre a degradação do colágeno, a angiogênese e a fibrose gengival.

Ogino *et al.* (2005) avaliaram a associação entre o polimorfismo da integrina α 2 com o CG induzido pelos BCC. Para o estudo foram selecionados 136 indivíduos sob terapia com BCC há pelo menos 1 ano. A partir da avaliação periodontal, os pacientes foram divididos em 2 grupos: grupo 1 (crescimento gengival leve ou ausente) e grupo 2 (crescimento gengival cobrindo pelo menos 1/3 da coroa dentária). Fizeram parte do grupo 1, 64 pacientes (29 homens e 35 mulheres), enquanto que o grupo 2 foi constituído por 72 pacientes (37 homens e

35 mulheres). Houve uma diferença significativa na frequência do alelo polimórfico +807 C entre o grupo 2 e o grupo 1. Estes resultados sugeriram que o polimorfismo no alelo +807 da integrina $\alpha 2$ seria um importante fator genético envolvido na etiopatogênese do CG induzido pelos BCC, uma vez que Kataoka *et al.* (2005) também indicaram que esta integrina atuaria como receptor específico para o colágeno tipo 1 nos fibroblastos e sua expressão reduzida interferiria na regulação do colágeno.

Sato *et al.* (2005) avaliaram o efeito da nifedipina e da IL-1 α sobre a proliferação e a síntese de DNA em fibroblastos de 5 pacientes com CG associado à terapia com nifedipina e de 5 pacientes sob terapia com nifedipina, mas sem CG. Os resultados da citometria de fluxo revelaram que os indivíduos com CG tiveram maior taxa de proliferação dos fibroblastos, no entanto não foi estatisticamente significativa. Entretanto, no segundo e quarto dias, a taxa de proliferação de fibroblastos de indivíduos com e sem CG foi significativamente maior na presença de nifedipina e IL-1 α quando comparado à presença isolada de nifedipina ou IL-1 α . A taxa de síntese de DNA também foi significativamente maior na presença de nifedipina e IL-1 α quando comparado à presença isolada de nifedipina ou IL-1 α . Estes resultados indicaram que os mediadores inflamatórios como a IL-1 α , seriam cruciais na patogenia do CG induzido pela nifedipina.

Castro (2006) avaliou as características microscópicas e o índice proliferativo epitelial do tecido gengival de pacientes sob terapia crônica com nifedipina. Foram obtidas 20 amostras de tecido gengival de usuários de nifedipina e 9 amostras de tecido gengival de indivíduos saudáveis. A avaliação microscópica revelou a presença de cristas epiteliais mais longas do que aquelas encontradas no grupo controle. O epitélio apresentou áreas de paraqueratinização

ou ortoqueratinização, exibindo também acantose. O tecido conjuntivo mostrou leve ou nenhum infiltrado inflamatório, com grande quantidade de fibras colágenas e vasos sangüíneos. No entanto, quanto à atividade proliferativa dos queratinócitos, não foi observado diferença significativa entre os dois grupos. Estes resultados sugeriram que o aumento da atividade proliferativa dos queratinócitos ocorreria por uma inibição da taxa de apoptose, mas não por um aumento da atividade mitótica destas células.

Flynn *et al.* (2006) avaliaram o efeito da ciclosporina e da nifedipina no acúmulo de GAG *in vitro* a partir de cultura de fibroblastos humanos. Para o estudo, foram obtidas biópsias gengivais de pacientes transplantados renais sob terapia com ciclosporina e nifedipina, sendo que 8 pacientes apresentavam CG clínico (grupo suscetível) e 8 pacientes não apresentaram CG clínico (grupo não suscetível). Todos os pacientes eram homens e recebiam terapia com prednisona (10-15 mg/dia), nifedipina (20-30 mg/3x/dia), ciclosporina (310-330 mg/dia) e azatiopina (25-50 mg/dia). A partir da cultura de células, foi avaliada a concentração de IL-1 β , a exposição dos fibroblastos à ciclosporina e à nifedipina isoladas ou associadas e à incorporação de sulfato e prolina pelos fibroblastos. Os resultados mostraram que a concentração de IL-1 β foi significativamente maior no grupo suscetível quando comparado às amostras de gengiva normal (GN) do grupo não-suscetível. Na avaliação dos fibroblastos expostos à ciclosporina (300-500 ng/ml), as amostras gengivais de todos os grupos estudados apresentaram maior incorporação de sulfato quando comparados ao controle. A incorporação de sulfato foi maior no grupo suscetível quando comparado ao grupo com GN. A incorporação de prolina pelos fibroblastos expostos a 200-500 ng/mL de ciclosporina foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle. A

incorporação de sulfato também foi maior no grupo suscetível quando exposto à nifedipina quando comparado ao grupo GN. Apenas na concentração de 10^{-10} M de nifedipina houve redução estatisticamente significativa na incorporação de prolina pelos fibroblastos do grupo suscetível. Quando combinadas 10^{-7} M de nifedipina e 400 ng/ml de ciclosporina, houve um aumento significativo na incorporação de sulfato pelos fibroblastos do grupo suscetível quando comparado ao controle. Por outro lado, houve diminuição na incorporação do sulfato pelos fibroblastos expostos a 10^{-10} M de nifedipina e 400 ng/ml de ciclosporina. Estes resultados indicaram que os mecanismos envolvidos na patogênese do CG estariam relacionados ao aumento da síntese dos GAG-sulfatados pelos fibroblastos.

Kanno (2006) avaliou o padrão histológico de distribuição de fibras colágenas após a administração de ciclosporina, nifedipina e fenitoína e correlacionou com a expressão dos genes do colágeno tipo I, metaloproteinase (MMP) 1 e 2. Para o estudo foram utilizados 12 macacos-prego machos. Os animais foram divididos em três grupos, constituídos de três animais subadultos e um adulto. Os animais do primeiro grupo receberam ciclosporina na forma de xarope (5mg/kg de peso corporal) e o segundo grupo recebeu fenitoína (7,5 mg/kg de peso corporal), sendo que após uma semana, os dois grupos (ciclosporina e fenitoína) tiveram aumento da dose para 15 mg/kg, enquanto que o terceiro grupo recebeu nifedipina sem alteração na dose (40mg/kg). Após 52 dias, 2 animais de cada grupo foram submetidos à biópsia gengival da área do canino superior esquerdo. E após 120 dias, foram obtidas biópsias gengivais da mesma região nos animais não biopsiados anteriormente. Os controles foram obtidos a partir de biópsias do canino superior direito antes da suplementação

com medicação. As amostras foram submetidas à técnica histoquímica (picrossirius, H-E), à técnica imunoistoquímica para colágeno tipo IV e ao PCR para a MMP-2 e o colágeno tipo I. Os resultados revelaram que os macacos adultos não apresentaram evidência clínica de CG, mas apresentaram menor expressão do gene da MMP-1. Houve aumento de fibras colágenas imaturas, induzido por todos os medicamentos. Não foi observada correlação entre os parâmetros clínicos de inflamação gengival e a expressão da MMP-1 e -2. Os valores obtidos aos 52 dias, sugeriram diminuição da expressão do gene da MMP-1 em todos os grupos; enquanto que aos 120 dias, mostraram aumento destes valores. Estes resultados indicaram que as medicações ocasionam padrões diferentes de expressão genética, resultando em um metabolismo alterado do colágeno. Entretanto, é preciso considerar que um número reduzido de animais foi utilizado no experimento, impossibilitando até mesmo a análise estatística dos dados.

Meisel *et al.* (2006) investigaram a expressão da P-glicoproteína (P-gp) nos tecidos gengivais, uma vez que este transportador de membrana ligado ao gene da resistência múltipla (*MDR1*) atua limitando o acesso da droga a alguns tecidos. Fez parte do estudo uma amostra de 1484 indivíduos, sendo que 1391 faziam uso de BCC (27 nifedipina, 19 amlodipina, 23 nitrendipina, 18 veparamil, 1 diltiazem e 5 outras diidropirinas) e 93 não utilizam medicação alguma. Todos foram submetidos à avaliação periodontal através da sondagem da profundidade de bolsa periodontal (≥ 4 mm, ≥ 5 mm ou ≥ 6 mm), perda de inserção (≥ 4 mm) e quantidade de dentes. O genótipo de cada indivíduo foi determinado pela técnica de PCR. Para o estudo de imunoistoquímica para P-gp foi usado o anticorpo anti-JSB-1 nas biópsias gengivais de 8 pacientes sob terapia medicamentosa e de 7

indivíduos saudáveis com indicação de extração dentária. Os resultados mostraram que a expressão do anticorpo JSB-1 era predominante nas camadas endoteliais dos vasos sanguíneos, tendo sido mais intenso nos tecidos gengivais saudáveis. O grupo usuário de BCC apresentou maior profundidade de sondagem quando comparado ao grupo controle. O CG induzido pelos BCC mostrou correlação significativa com o genótipo *MDR1* 2677 guanina/guanina (G/G) ou guanina/timina, adenina (G/TA). A associação do aumento da profundidade de sondagem de 4 mm ou mais no grupo com genótipo *MDR1* 2677G/G ou G/TA foi significativa. Estes resultados sugeriram uma significativa associação entre a terapia com BCC e o aumento da profundidade de sondagem, a inflamação e o polimorfismo do *MDR1*. Estes resultados indicaram que os BCC poderiam induzir o CG através da resposta inflamatória que sofreria modulação pela expressão do P-gp e do genótipo *MDR1*. Logo, o genótipo *MDR1* estaria associado à variação na suscetibilidade ao CG entre os indivíduos usuários de BCC.

Nurmenniemi (2006) avaliou o efeito de imunodepressores e da nifedipina sobre as células inflamatórias e na atividade mitótica dos queratinócitos em tecidos gengivais humanos. Foram obtidas biópsias de 12 pacientes usuários de imunodepressores (ciclosporina, prednisona e azatioprina), de 12 pacientes sob terapia associada (nifedipina e imunodepressores), de 11 pacientes cardíacos usuários de nifedipina e 28 indivíduos saudáveis (grupo controle). Os quatro grupos foram similares quanto à idade e distribuição do gênero. A análise imunoistoquímica foi realizada com anticorpos anti-CD1a (células de Langerhans), anti-27E10 (macrófagos), anti-25F9 (macrófagos residentes), anti-RM3/1 (macrófagos reparativos), anti-triptase (MCs triptase-positivos), anti-quimase (MCs quimases-positivos), anti-triptase e anti-quimase (MCs triptase e quimase-

positivos) e anti-ki-67 (proliferação celular). As contagens celulares foram realizadas com um retículo de 1cm² em três áreas: adjacente ao epitélio sulcular, adjacente ao epitélio bucal e no meio do tecido conjuntivo. Os resultados mostraram que a duração da terapia com nifedipina foi mais longa no grupo sob terapia associada quando comparado ao grupo nifedipina; enquanto que a dose diária de ciclosporina foi significativamente maior no grupo usuário de terapia associada quando comparado ao grupo imunodepressor. Foi observado um aumento significativo na espessura do epitélio bucal nos grupos sob terapia medicamentosa quando comparados ao grupo controle. O número de células CD1a-positivas foi significativamente menor no grupo nifedipina quando comparado ao grupo imunodepressor, ou ao grupo de terapia associada. O número de macrófagos 27E10-positivos foi maior no grupo imunodepressor, quando comparado aos grupos controle e nifedipina. Os números de MCs triptase-quimase-positivos e quimase-positivos foram menores quando comparados ao grupo controle. Não foi encontrada diferença no número de MCs triptase-positivos. O percentual de células ki-67-positivas na camada basal do epitélio foi significativamente maior nos grupos sob terapia medicamentosa quando comparados ao grupo controle. Não foi encontrada diferença na atividade mitótica dos queratinócitos. No grupo nifedipina, foi encontrada correlação negativa significativa entre a duração da terapia e o percentual de células ki67-positivas no epitélio bucal. Foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre a atividade mitótica do epitélio bucal e o comprimento das cristas epiteliais. Estes resultados indicaram que o CG induzido por medicação (imunodepressores e nifedipina) estava relacionado às alterações na homeostasia tecidual, possivelmente como efeito da alteração na densidade de populações

celulares que atuaria diretamente sobre o tecido conjuntivo, como é o caso dos macrófagos e dos MCs.

A partir dos estudos citados, é possível inferir que o uso de nifedipina e imunodepressores pode afetar as populações de células de Langerhans, de macrófagos, de MCs e de queratinócitos (NURMENNIEMI *et al.*, 1999; NURMENNIEMI *et al.*, 2001; NURMENNIEMI *et al.*, 2002; NURMENNIEMI *et al.*, 2004; NURMENNIEMI *et al.*, 2006). Logo, as medicações influenciariam a resposta inflamatória através da alteração na densidade das células inflamatórias. Dentre estas, os MCs podem ter um papel relevante no desenvolvimento do CG, pois estão presentes em praticamente todos os tecidos humanos e participam do controle do fluxo sanguíneo, da angiogênese, da inflamação e da fibrose (NURMENNIEMI *et al.*, 2004; NURMENNIEMI, 2006).

2.2 Mastócitos

Os MCs foram originalmente descritos por Ehrlich em 1879, tendo sido caracterizados pela presença de grânulos, que se coram metacromaticamente com corantes básicos como violeta de genciana (WALLS *et al.*, 1990). Posteriormente, Todaro (1938), *apud* Angelopoulos (1973), apresentou os primeiros estudos da presença dos MCs no tecido gengival em humanos e animais. Quanto à sua distribuição, os MCs estavam presentes na mucosa e no tecido conjuntivo, sendo que na mucosa bucal e na pele localizavam-se próximos aos vasos sanguíneos. A proximidade dos MCs com as células endoteliais foi atribuída à interação entre o componente laminina da membrana basal do endotélio e a integrina CD49f ($\alpha 6\beta 1$). Devido a esta característica, os MCs foram

definidos como células móveis, capazes de migrarem entre os tecidos. Conseqüentemente, os MCs apresentavam também o potencial de influenciar através do conteúdo de seus grânulos, as células vizinhas, resultando em efeito inibitório, tóxico ou estimulador (WALSH *et al.*, 1995).

Quanto ao conteúdo de seus grânulos, os MCs apresentaram mediadores pré-formados como amina vasoativa (histamina), proteases (triptase e quimase), proteoglicanos (heparina) e citocinas (TNF- α) (WALSH *et al.*, 1995, DUARTE *et al.*, 1999). A histamina influenciou na vasodilatação e na permeabilidade vascular, tendo sido relacionada às mudanças vasculares observadas na resposta inflamatória. As proteases corresponderiam a 20% do conteúdo dos grânulos dos MCs humanos. Estas proteases estariam firmemente ligadas ao proteoglicano heparina, sugerindo a atuação da heparina como co-fator ou estabilizador das proteases (BARNETT, 1973a).

Quanto à localização, os MCs dos tecidos bucais humanos e de animais apresentaram algumas variações morfológicas. Nos tecidos bucais foram diferenciadas as populações de MCs de acordo com seus fenótipos, sendo identificado como fenótipo de tecido conjuntivo (MC_{TC}), quando seus grânulos apresentavam as proteases quimase e triptase. Por outro lado, também poderiam apresentar o fenótipo de mucosa (MC_T), expressando apenas triptase (WALSH *et al.*, 1995). Esta variação no conteúdo dos grânulos, foi responsável pelas variações na atuação dos mediadores dos MCs (maior ou menor intensidade), promovendo alterações teciduais (BARNETT, 1973a).

Angelopoulos (1973) realizou um estudo comparativo entre a morfologia dos MCs gengivais em humanos e ratos. Foram selecionados 15 pacientes com gengiva normal e inflamada e 2 ratos albinos. As biópias gengivais dos pacientes

e das línguas dos ratos foram submetidas à técnica histoquímica com azul de toluidina e astrablau. Os tecidos foram avaliados em microscópio óptico com aumento de 10x e as células contadas com retículo de 10 mm em um aumento de 97x. Os resultados da análise qualitativa revelaram que não houve diferença no tamanho e na forma dos MCs nos tecidos saudáveis ou inflamados. Assim como, não houve diferença na forma dos MCs humanos e de ratos. Os MCs geralmente apresentaram forma elíptica, tendo sido definida como forma ovóide. Quanto ao tamanho, foi observado que os MCs de ratos eram significativamente maiores (média de $93.60 \mu\text{m}^2$) quando comparados aos MCs humanos (média de $68.05 \mu\text{m}^2$).

Os MCs encontrados nos tecidos periodontais possuíam as mesmas características citológicas básicas que os MCs encontrados em outros tecidos bucais, como o epitélio da mucosa mastigatória. Contudo, Barnett (1973a) descreveu várias diferenças entre os MCs epiteliais vistos na doença periodontal e aqueles encontrados na gengiva saudável. Os MCs presentes no epitélio da gengiva saudável apresentaram forma uniforme mais arredondada, raramente exibindo processos citoplasmáticos longos. O núcleo raramente continha impressões ou podia ser visto. Seus grânulos tendiam a ser numerosos e distribuídos por toda a célula. A desgranulação era vista ocasionalmente. Diferentemente, os MCs epiteliais da bolsa periodontal apresentaram características citológicas indicativas de maior atividade celular. Foi descrito um nucléolo proeminente sugestivo de síntese protéica, tendo sido observado extensão do processo de Golgi e grânulos imaturos próximos. Também foram observadas nas camadas superficiais do epitélio, extensões citoplasmáticas dos

MCs na camada basal do epitélio, aumento dos espaços entre as células epiteliais e desgranulação adjacente aos queratinócitos (BARNETT, 1973a).

A partir destas características morfológicas, Barnett (1973a) sugeriu que os MCs epiteliais poderiam ter um importante papel na etiopatogenia de algumas doenças bucais envolvendo o epitélio. Sugeriu-se que os MCs poderiam migrar da lâmina própria para o epitélio sulcular da bolsa periodontal. Quando localizados no epitélio sulcular, os MCs atuariam na patogênese da doença periodontal através de suas proteases, afetando os queratinócitos, aumentando o tamanho e a permeabilidade dos espaços inter-celulares. Conseqüentemente, haveria o influxo de bactérias e toxinas do meio bucal e neutrófilos e anticorpos para o sítio inflamatório, resultando nas alterações teciduais observadas na gengivite.

Barnett (1973b) avaliou as características dos MCs no tecido conjuntivo de pacientes com doença periodontal. Foram selecionados 5 pacientes do gênero feminino, com idade entre 20 e 73 anos e com presença de bolsa periodontal. Foram removidas cirurgicamente as paredes vestibulares das bolsas periodontais e avaliadas por microscopia eletrônica com citrato de chumbo e acetato de uranila. A avaliação do tecido conjuntivo revelou distribuição difusa dos MCs, observados ocasionalmente próximos aos vasos sangüíneos e ao epitélio sulcular. Quanto à forma, os MCs apresentaram geralmente forma ovóide com processos citoplasmáticos longos. Observou-se a proximidade das microvilosidades dos MCs com as fibras colágenas. Os grânulos estavam freqüentemente próximos à periferia dos MCs. A partir desta análise descritiva, sugeriu-se que os MCs teriam um papel relevante na degradação do colágeno. Uma hipótese relacionou-se à participação dos MCs na quebra da homeostasia

do tecido conjuntivo através da liberação da heparina. Uma vez presente no meio extracelular, este mediador ativaria a colagenase, resultando na degradação das fibras colágenas.

Walsh *et al.* (1995) avaliaram a relação entre a desgranulação dos MCs e a inflamação em 4 microambientes: mucosa bucal normal, gengiva marginal, periodonto apical e polpa dental. Foram obtidas biópsias da mucosa bucal normal (n=15), de líquen plano bucal (n=29), de gengivite experimental, após 10 dias de meticulosa higiene bucal (dia 0) e após 7 dias sem higiene bucal (n=10), de lesão periapical (n=48) e de polpa dental (n=12). Os tecidos foram submetidos à técnica imunohistoquímica com anticorpo anti-TNF (B154.2), anti-E-selectina (H4/18), anti-imunoglobulina (Ig) G (X-40), anti-histamina, anti-quimase e anti-triptase. Para a avaliação da expressão do TNF foi utilizada a técnica de hibridização *in situ* que permite visualizar a reação entre as moléculas de RNAm. Para a análise da relação entre o número de MC_{TC} e a expressão da E-selectina foram escolhidos 5 campos seqüenciais (área de cada campo = 0.2mm²). Foi observada a predominância do fenótipo MC_{TC} em todos os tecidos. Quando avaliada a porcentagem de MC_{TC} em relação ao total de MCs, não houve diferença significativa nas lesões inflamatórias. Também não houve diferença entre a mucosa normal e o líquen plano ou na gengivite experimental no dia 0 e no dia 7. Não foi observada diferença na proporção de desgranulação nos vários tipos de lesões, mas foi observada desgranulação dos MCs em todas as lesões inflamatórias. Houve expressão de E-selectina nas lesões inflamatórias, encontrando-se forte correlação entre a densidade de MCs (MC_{TC}/mm²) e a intensidade de expressão da E-selectina. A partir da hibridização *in situ*, verificou-se que os MCs presentes nas lesões de líquen plano apresentaram reatividade

para TNF. Os resultados mostraram que o fenótipo MC_{TC} foi predominante na cavidade bucal, sendo que os MC_T continham nos seus grânulos a citocina TNF pré-formada. Foi considerada como característica das lesões inflamatórias, a desgranulação dos MCs e confirmada a correlação entre os MCs e a molécula de adesão E-selectina. Estes resultados indicaram que estímulos possam levar à desgranulação dos MCs, liberando no meio extra-celular mediadores pré-formados. Estes mediadores poderiam atuar promovendo os eventos inflamatórios, contribuindo para as alterações gengivais.

Batista *et al.* (2005) compararam o número de MCs, em diferentes estágios da doença periodontal, quantificados por duas técnicas distintas (histoquímica e imunoistoquímica). Para o estudo, utilizaram biópsias de 20 casos de periodontite crônica localizada (PCL), 20 casos de gengivite induzida pela placa bacteriana (GIPB) e 20 casos de gengiva clinicamente saudável (controle). As amostras foram submetidas à análise histoquímica (azul de toluidina) e imunoistoquímica (anticorpo anti-triptase). A contagem dos MCs positivos foi realizada com microscópio em aumento de 64x, contando-se 25 campos com área de 0,0176625 mm². Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos pela técnica histoquímica. Entretanto, houve diferença significativa no número de MCs/mm² entre os três grupos, entre o grupo PCL quando comparado ao grupo controle e entre o grupo GIPB quando comparado ao grupo controle. O mesmo não foi observado entre os grupos PCL e GIPB. O número de MCs triptase+ foi significativamente maior que o número de MCs identificados pelo azul de toluidina. Estes resultados mostraram que ambas as técnicas são capazes de identificar os grânulos dos MCs, entretanto a técnica imunoistoquímica foi mais sensível. Esta maior sensibilidade é justificada pelo

maior número de MCs triptase+ em relação àqueles corados pelo azul de toluidina. Assim como, apenas na técnica imunoistoquímica foi possível estabelecer diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Quando comparado os grupos, foi sugerido um aumento na densidade dos MCs na PCL e na GIPB, em relação ao tecido saudável. Este aumento indicaria a participação dos MCs nos diferentes estágios da doença periodontal.

2.2.1 Mastócitos e sua Correlação com o Crescimento Gengival

Os MCs apresentam um importante papel na inflamação, na resposta imunitária e no reparo tecidual. Na presença de um estímulo, os MCs foram capazes de secretar entre 80 e 300 grânulos ricos em histamina, proteoglicanas (heparina), proteases, mediadores derivados dos lipídeos (ácido araquidônico e fosfolipídeos acetilados), proteinases (triptase e metaloproteinases), fosfatase ácida e citocinas (WALSH, 2003; RODINI, 2005). Após a desgranulação, estes mediadores eram depositados em grande quantidade no meio extracelular, onde exerciam efeitos sobre as células endoteliais; participavam das reações de hipersensibilidade e contribuíam para o desenvolvimento e amplificação de respostas inflamatórias específicas e inespecíficas (RODINI *et al.*, 2004; RODINI, 2005).

Estudos sobre células no infiltrado inflamatório mostraram a presença de MCs no tecido hiperplásico de pacientes que faziam uso de medicações; no entanto, os resultados foram contraditórios (ASAHARA *et al.*, 2000; ESLAMI, *et al.*, 2004; NURMENNIEMI *et al.*, 2004).

Dummett *et al.* (1961) avaliaram a densidade de MCs em tecidos gengivais sob efeito da fenitoína. Para o estudo, foram obtidas biópsias gengivais de 9

pacientes epilépticos e submetidas à técnica histoquímica com H-E, tionina e azul de toluidina. Os resultados clínicos mostraram presença de CG em todos os pacientes, sendo de aspecto firme e nodular. O exame microscópico revelou hiperplasia do epitélio, aumento na densidade das fibras colágenas e aumento da vascularização com variado grau de infiltrado inflamatório. Os MCs mostraram-se abundantes no tecido conjuntivo, apresentando citoplasma denso devido aos grânulos. A desgranulação foi considerada uma característica inconsistente. Quanto à forma e ao tamanho, houve muitas variações. A contagem dos MCs foi realizada por mm^2 utilizando um planímetro polar, sendo que a densidade celular variou de 0.47 à 146 MCs/ mm^2 . Não houve nenhuma correlação entre a densidade de MCs e a duração da terapia, o grau de vascularização e o grau de resposta inflamatória. Estes resultados sugeriram que a densidade dos MCs era extremamente variável nos tecidos gengivais, estando condicionada à resposta tecidual à droga.

Asahara *et al.* (2000) estudaram os MCs no CG induzido pela ciclosporina-A. Para o estudo, foi feito um experimento com 60 camundongos, sendo 30 deficientes em MCs e 30 normais. Os camundongos foram submetidos à dieta suplementada com ciclosporina em várias concentrações (0, 300, 400, 500, e 600 mg/kg), sendo que cada concentração correspondia a um grupo (1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente). Cada um destes grupos era formado por 6 animais (3 machos e 3 fêmeas). Após 30 dias, todos os animais foram sacrificados e obtidas amostras de gengiva as quais foram submetidas à coloração com azul de toluidina. Os resultados mostraram que apenas os animais sob terapia com 600 mg de ciclosporina por Kg apresentaram sinais clínicos de hiperplasia gengival. No entanto, não houve diferença no grau de sangramento gengival entre os

camundongos normais e deficientes em MCs alimentados com 600 mg/dia de ciclosporina. Não foi observada diferença numérica dos MCs nos grupos normais sob terapia com ciclosporina, sendo que a densidade de MCs foi pequena, sem diferença significativa entre os grupos. Estes resultados sugeriram que os MCs não eram necessários para o desenvolvimento do CG induzido pela ciclosporina. Apesar destes resultados, os autores ressaltaram que os MCs poderiam ter um papel importante na patogênese do CG, uma vez que atuariam na fibrose tanto em humanos como em animais.

Soory & Suckak (2001) estudaram a resposta metabólica ao hormônio esteróide em MCs incubados com histamina e fenitoína. Para o estudo, foi feita cultura de células incubadas com testosterona e androstenediona. Foram previamente selecionados 6 pacientes (3 homens e 3 mulheres, com idade entre 30-50 anos) com indicação de ressecção cirúrgica de bolsa de 6-8 mm de profundidade à sondagem, mas sem sangramento no momento da cirurgia. Foram obtidos 6 tipos celulares, sendo que 3 foram submetidos à avaliação dos efeitos de diversas concentrações (1-5 $\mu\text{g/mL}$) de histamina liberada pelos MCs em cultura de fibroblastos. Paralelamente, foi feito um experimento com fibroblastos gengivais em cultura com fenitoína em diversas concentrações ou histamina (8-10 $\mu\text{g/mL}$), sozinha ou em combinação com testosterona (0,925 kBq/ml) e androstenediona (0,37 kBq/ml). Os resultados mostraram que os MCs causaram 67% de estímulo da atividade da 5 α -redutase na concentração de 10 $\mu\text{L/ml}$ de sobrenadante de MCs, diminuindo gradualmente nos valores de 100 $\mu\text{L/ml}$. Houve um aumento de 30% na formação do 4-androstenediona a 15 $\mu\text{L/ml}$ de sobrenadante de MCs, reduzindo para valores de 30-100 $\mu\text{L/ml}$. Houve aumento na formação de diols em resposta a 15 $\mu\text{L/ml}$ de supernadante de MCs. Houve

um aumento de 72% na formação da diidrotestosterona em resposta à histamina a 8 µg/ml, diminuindo em 68% a 10 µg/ml. Houve um aumento de 70% na expressão da atividade da 17β-hidroxiesteróide desidrogenase (HSD) em resposta a histamina a 10 µg/ml, resultando na formação da 4-androstenediona. A fenitoína de 1/5 µg/ml estimulou a síntese da diidrotestosterona e da 4-androstenediona de 80 a 71 e de 51 a 43%, respectivamente. A combinação do sobrenadante de MCs e da fenitoína de 1 a 5 µg/ml estimulou a expressão da atividade da 5α-redutase e da HSD em 70 e 51%, respectivamente. A incubação com histamina sozinha (70%) ou associada à fenitoína (60%) mostrou significativo estímulo da diidrotestosterona. Estes resultados sugeriram que os mediadores dos MCs (histamina) e a fenitoína estimularia a formação de esteróides (andrógenos) na forma ativa, contribuindo para o desenvolvimento do CG, uma vez que a testosterona e a diidrotestosterona exerceriam efeitos anabólicos sobre o tecido conjuntivo dos mamíferos.

Nurmenniemi *et al.* (2004) realizaram um estudo de imunoistoquímica comparando a distribuição das subpopulações de MCs na gengiva normal e no CG induzido por medicação. Foram coletadas biópsias de 4 grupos de indivíduos: 11 pacientes usuários de nifedipina (grupo nifedipina), 12 pacientes usuários de ciclosporina, metilpredisolona e azatioprina (grupo imunodepressores), 11 usuários de nifedipina e de imunodepressores concomitantemente (grupo nifedipina e imunodepressores) e 20 indivíduos saudáveis (grupo controle). As amostras foram submetidas à técnica imunoistoquímica com anticorpo anti-triptase (clone G3) e anti-quimase (clone CC1). Em seguida, foi determinado o número de células em 3 áreas do tecido conjuntivo: adjacente ao epitélio sulcular, adjacente ao epitélio bucal e no meio do tecido conjuntivo. Para a contagem

celular foi utilizado um microscópio com retículo de 20x20 em um aumento de 250x. Para cada área determinada, foram selecionados 2 campos, tendo cada campo uma área de 0.4 mm². Os resultados mostraram que os quatro grupos foram similares quando avaliadas as idades e a distribuição do gênero. A duração da terapia foi estatisticamente maior no grupo nifedipina e imunodepressores quando comparado ao grupo nifedipina. A dose diária de imunodepressores (mg/dia) foi estatisticamente maior no grupo nifedipina e imunodepressores quando comparado ao grupo imunodepressores. O número de MC_{TC} e de MCs que contém apenas quimase (MC_C) foi baixo no grupo imunodepressores. No grupo nifedipina, não foi encontrada diferença no número de MCs. Logo, o uso exclusivo de imunodepressores como a ciclosporina estaria associado à diminuição numérica dos MC_{TC} e leve diminuição no número de MC_C. A terapia associada nifedipina e imunodepressores reduziria o efeito da ciclosporina sobre a população de MCs, o que seria justificado pela concentração plasmática de ciclosporina ter sido similar entre os grupos imunodepressores e o grupo nifedipina e imunodepressores. A diminuição dos MC_{TC} e MC_C poderia estar associada com um efeito inibitório da ciclosporina. Estes resultados sugeriram que os MC_C teriam um importante papel na etiopatogenia do CG, especialmente em pacientes sob terapia exclusiva com ciclosporina.

Apesar dos poucos estudos sobre os MCs no CG induzido por medicação, acredita-se que haja uma participação relevante desta célula nas alterações do tecido gengival (ASHARA *et al.*, 2000; NURMENNIEMI *et al.*, 2004).

2.2.2 Papel dos Mastócitos na Colagenização

Os MCs foram considerados células importantes no processo de reparo, participando dos processos fibrosos em várias doenças, como na fibrose renal intersticial (KONDO *et al.*, 2001), nas doenças cardiovasculares (PATELLA *et al.*, 1998), na SSc (MASON *et al.*, 2000) e nos sinais fibróticos da pele (CHUGUNOVA, 2004). Os mecanismos responsáveis pelo acúmulo do colágeno e pela fibrose mediada pelos MCs ainda são incertos. Acredita-se que os MCs atuam nos processos fibróticos a partir do conteúdo de seus grânulos ricos em proteases (triptase e quimase) e em citocinas (IL-4, IL-6, IL-13, TGF- β , TNF- α), influenciando os fibroblastos e estimulando a produção da matriz extracelular em algumas condições patológicas (PATELLA *et al.*, 1998; CHUGUNOVA, 2004).

Taylor (1971) investigou o papel dos MCs na colagenólise. Para o estudo, foram obtidas biópsias da gengiva e do mesentério de ratos. Os MCs obtidos a partir das biópsias foram submetidos à cultura de células com heparina, histamina, serotonina e vitamina A em diversas concentrações. Os resultados da análise histoquímica com hematoxilina e ácido van Gieson revelaram que a maioria dos MCs desgranularam durante a manipulação do mesentério, mas após algumas horas apresentavam aparência habitual com grânulos evidentes no citoplasma. O número e o tamanho das áreas com degradação do colágeno estavam aumentados pela heparina e pela vitamina A, no entanto mostraram-se reduzidos na presença de cortisona e histamina. Não foram observados MCs em culturas de mesentério com colagenase oriunda da bactéria *Clostridium histolyticum*. Estes resultados sugeriram que os MCs participariam do controle da degradação do colágeno através da liberação de enzimas ativadoras da colagenólise.

Günhan *et al.* (1991) avaliaram a relação entre o número de MCs e as características do tecido periodontal, correlacionado com o grau de inflamação e de fibrose. Foram selecionados 10 indivíduos saudáveis e 10 pacientes com doença periodontal crônica. Todos os participantes tinham idade acima de 30 anos e cada grupo possuía 5 homens e 5 mulheres. Foi removida uma biópsia da papila interdental de pré-molares e molares e corada com azul de toluidina e Giemsa. Para a contagem dos MCs foi determinada a área subjacente ao epitélio, correspondendo a 20 campos seqüenciais avaliados em um aumento de 500x. Os resultados mostraram maior número de MCs nos tecidos inflamados, quando comparados aos tecidos saudáveis. No entanto, o número de MCs nos tecidos inflamados foi menor que aquele encontrado nos tecidos saudáveis no pós-operatório. Na análise qualitativa, observou-se que a inflamação reduziu após o procedimento cirúrgico, sendo que a fibrose aumentou. Estes resultados sugeriram que os mediadores presentes nos grânulos dos MCs poderiam ter a habilidade de afetar os componentes do tecido conjuntivo, uma vez que foi observado um aumento do número de MCs, especialmente próximo às áreas de fibrose.

Trautmann *et al.* (1998) avaliaram a influência dos MCs, através da IL-4, na proliferação dos fibroblastos. Para o estudo foi feita cultura de MCs da pele e de fibroblastos da pele de crianças e adultos. Foram determinadas a proliferação dos fibroblastos, a expressão do receptor de IL-4 nos fibroblastos e a liberação de IL-4 pelos MCs. Os resultados mostraram que os MCs da pele aumentaram significativamente a proliferação dos fibroblastos. Houve aumento significativo da proliferação dos fibroblastos quando incubados com IL-4, PDGF A/B e FGF- β . Os resultados mostraram que a liberação da IL-4 pelos MCs foi induzida pelo contato

fibroblasto-MCs. Todas as linhagens celulares de fibroblastos tiveram alta expressão do receptor para IL-4. Estes resultados sugeriram que os MCs influenciariam diversas funções dos fibroblastos, particularmente a proliferação e a produção de componentes da matriz extracelular, contribuindo para os eventos fibróticos.

Mason *et al.* (2000) realizaram um estudo histoquímico (azul de toluidina) e imunoistoquímico (anticorpos policlonais para as isoformas de TGF- β) para avaliar a densidade de MCs e sua correlação com mudanças nas proteínas da matriz extracelular ou na expressão do TGF- β e de seus receptores nas glândulas salivares de pacientes com SSc e com fenômeno de Raynaud (RP). Para o estudo foram obtidas biópsias de glândulas salivares de 13 pacientes com SSc e de 5 pacientes com RP e comparados às amostras de 10 indivíduos saudáveis. A contagem de MCs revelou diferença significativa entre os grupos, tendo sido encontrado mais MCs no grupo SSc quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença na porcentagem de elastina e na expressão da fibronectina entre os três grupos. No entanto, houve maior porcentagem de fibroblastos expressando TGF- β 2 no grupo SSc quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença na expressão do receptor para TGF- β entre os grupos. Estes resultados indicaram que a SSc e o RP estariam associados com um aumento na densidade de MCs nas glândulas salivares e mudanças na expressão da isoforma TGF- β 2 pelos fibroblastos.

Artuc *et al.* (2002) avaliaram a habilidade dos MCs em produzir fatores de crescimento e estimular os fibroblastos dermais. Para o estudo foram realizadas culturas de MCs dermais, culturas de fibroblastos dermais, PCR e teste de ELISA para avaliação dos níveis de fatores de crescimento. Os resultados mostraram

que os MCs dermais expressaram vários fatores de crescimento: FGF-2, FGF-7, FGF-10 e fator de crescimento epidérmico (HB-EGF). Houve aumento significativo de FGF-2 pelos fibroblastos dermais na presença de triptase na concentração de 0.05 e de 5 μ M quando comparado ao grupo controle. Quando avaliado o efeito da histamina sobre a atividade dos fibroblastos, observou-se que a histamina estimulou a secreção de FGF-7 pelos fibroblastos dermais, mas não teve efeito sobre a secreção de IL-2. Estes resultados sugeriram que os MCs expressariam ou influenciariam a produção dos fatores de crescimento pelos fibroblastos, tendo um importante papel durante o processo de reparo e na homeostasia tecidual.

Kondo *et al.* (2001) avaliaram o papel dos MCs na fibrose renal intersticial. Para o estudo, foram obtidas biópsias teciduais de 70 pacientes com doenças renais variadas. Foram realizadas técnicas, imunoistoquímica (anti-triptase), culturas de fibroblastos renais, avaliação da atividade da triptase e estudo da proliferação dos fibroblastos em presença da triptase e da heparina. Os resultados mostraram que os MCs triptase-positivos não foram detectados em pacientes com alterações renais sem fibrose intersticial. A análise estatística mostrou que a densidade de MCs estava correlacionada ao grau de fibrose renal intersticial. Observou-se aumento da síntese de DNA pelos fibroblastos na presença de triptase e heparina, quando comparados aos fibroblastos não tratados e aos fibroblastos tratados somente com triptase. A atividade mitogênica dos fibroblastos quando incubados apenas com triptase, foi maior quando comparada aos fibroblastos não tratados. Também observou-se aumento da síntese de DNA pelos fibroblastos, quando tratados somente com heparina e comparados aos fibroblastos não tratados. A triptase aumentou a síntese de

fibronectina e colágeno tipo I pelos fibroblastos renais, indicando que a triptase poderia ser um importante fator fibrogênico. Logo, estes resultados sugeriram que a triptase dos MCs atuaria na proliferação dos fibroblastos e na produção dos componentes da matriz extracelular, através da sua ação sobre a atividade dos fibroblastos, contribuindo para o desenvolvimento da fibrose intersticial.

Chugunova (2004) avaliou a função da quimase de MCs *in vitro* e *in vivo*. Para o estudo, foram utilizados camundongos com defeito na enzima responsável pela ativação da síntese da heparina (NDST-2) e camundongos deficientes na quimase MCP-4^{-/-}. Os MCs dos camundongos NDST^{-/-} mostraram redução drástica dos níveis de mediadores inflamatórios como a histamina e as proteases (triptase, quimase e carboxipeptidase A). A análise por *western-blot* demonstrou a presença de fibronectina intacta maior nos camundongos NDST^{-/-}. A análise imunistoquímica para fibronectina revelou maior marcação nos animais MCP-4^{-/-} quando comparados aos controles, indicando maior grau de deposição de fibronectina, logo a quimase MCP-4 participa da remodelação da fibronectina. Na cultura de células de camundongos NDST^{-/-}, observou-se que a degradação da fibronectina foi mediada pela quimase dos MCs e dependente da heparina. Os resultados também mostraram que a coagulação extravascular foi afetada pela quimase e pela heparina. Quando adicionado plasminogênio à cultura de células, observou-se aumento nas taxas de ativação do plasminogênio, tanto em camundongos NDST^{-/-} quanto nos NDSR^{+/+}. Logo, o processo de ativação do plasminogênio foi considerado dependente dos MCs. A análise dos MCs peritoneais de camundongos NDST^{-/-} revelou acúmulo de pró-MMP-9 e de sua enzima ativa (MMP-9), enquanto que nos animais MCP-4^{-/-} foi encontrado acúmulo de pró-MMP-9 e pró-MMP-2, indicando que esta quimase teria um

importante papel na ativação destas MMPs. Estes resultados sugeriram que a inativação da NDST-2 e da MCP-4 afetaria a regulação da coagulação extravascular e da fibrinólise, indicando uma possível participação dos MCs.

Nurmenniemi *et al.* (2004) observaram que, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa da população de MCs, estes poderiam ter um papel essencial na degradação do colágeno, uma vez que atuariam, através de suas proteinases (quimase e triptase) associadas à molécula de heparina, sobre a liberação da fibronectina e da colagenase tipo IV, ativando a MMP III e indiretamente a procolagenase-1 (proMMP-1), interferindo sobre a degradação da matriz extracelular.

Takehita *et al.* (2004) avaliaram a resposta dos MCs e dos cardiomiócitos na indução do inibidor 1 de ativador de plasminogênio (PAI-1), nos eventos fibróticos do infarto do miocárdio. Para o estudo, foram utilizados 15 camundongos (grupo PMI) e camundongos deficientes em PAI-1 (grupo controle) com 6 semanas de vida, todos com pelo menos 40% de áreas infartadas no miocárdio devido ao procedimento cirúrgico de ligação da artéria coronária esquerda (PMI). Quatro semanas após o procedimento cirúrgico, todos os animais foram sacrificados e os tecidos adiposos, do coração, do fígado, dos rins e da adrenal foram submetidos à análise de hibridização *in situ*, PCR e imunistoquímica.(anti-PAI-1). Os resultados revelaram que os níveis de antígeno PAI-1 no plasma estavam aumentados no grupo PMI, não tendo aumento no grupo controle. A expressão do RNAm de PAI-1 estava drasticamente aumentada nas áreas não infartadas do grupo PMI, quando comparada ao grupo controle. Observou-se menos áreas fibróticas nos grupo controle quando comparado ao grupo PMI, sugerindo que a deficiência no PAI-1 poderia prevenir o aumento do

depósito de colágeno pela aceleração da degradação da matriz extracelular. Observou-se aumento na expressão de PAI-1, nas áreas de remodelação, assim como abundante produção de PAI-1 pelos cardiomiócitos e MCs localizados próximo às áreas infartadas. Também observou-se a indução de RNAm de TGF- β e TNF- α nas áreas não infartadas do grupo PMI. Os MCs foram observados somente nos tecidos cardíacos do grupo PMI, sugerindo que os MCs cardíacos teriam um importante potencial de produzir PAI-1 durante processos patológicos, contribuindo para o aumento da expressão de PAI-1, resultando no desenvolvimento da fibrose intersticial e perivascular.

Pinheiro (2006) citou possíveis mecanismos de ação dos mediadores produzidos pelos MCs na colagenização. A histamina possui um papel estimulador sobre o crescimento de fibroblastos e no aumento da síntese de colágeno *in vitro* e *in vivo*. Paralelamente, a heparina também influencia o crescimento dos fibroblastos e o aumento na síntese de colágeno. A triptase dos MCs induz a proliferação de fibroblastos *in vitro*, além de ser um fator fibrogênico capaz de estimular a síntese de RNAm e a quimiotaxia. Finalmente, os MCs podem atuar diretamente sobre a fibrose através da produção de glicoproteínas da matriz extracelular. A literatura sugeriu que os MCs poderiam regular a função e a expressão dos mediadores químicos, afetando os fibroblastos e os componentes da matriz extracelular e contribuindo para o desenvolvimento da fibrose (DUARTE *et al.*, 1999; WALSH, 2003).

2.2.3 Papel dos Mastócitos na Angiogênese

A angiogênese ou neovascularização pode ser um processo fisiológico ou patológico e inclui formação de arteríolas e vênulas, crescimento e desaparecimento de capilares. Todo este processo é controlado pela atividade regulatória positiva e negativa de moléculas e agentes angiogênicos. A angiogênese ocorre em etapas, sendo uma sucessão de eventos que envolvem a diferenciação das células endoteliais em capilares, a partir da ação de citocinas e fatores de crescimento. As CAMs mediam a interação célula-célula ou célula-matriz extracelular (UEDA, 2006). Muitos tipos celulares (células tumorais, macrófagos, linfócitos e MCs) estão correlacionados à indução da angiogênese, sendo maior o enfoque sobre os MCs por se localizarem próximo aos pequenos vasos e apresentarem mediadores que influenciam a proliferação das células endoteliais (PINHEIRO, 2006). Os MCs produzem diversos mediadores angiogênicos (proteases, FGF-2, VEGF, TNF- α , IL-8, heparina e histamina). Entretanto, ainda são desconhecidos os mecanismos de atuação dos MCs e de seus mediadores em processos patológicos inflamatórios ou tumorais (GRIMBALDESTON *et al.*, 2006; TUNA *et al.*, 2006).

Kankkunen *et al.* (1997), *apud* Benitez-Bribiesca *et al.* (2001), realizaram a análise quantitativa dos MCs e suas subpopulações em lesões benignas e malignas de pulmão. Seus resultados mostraram que a triptase presente nos grânulos dos MCs foi um potente agente angiogênico. Posteriormente, em 2001, Benitez-Bribiesca *et al.* realizaram um estudo a partir de biópsias obtidas de 21 pacientes com câncer e de 63 pacientes com displasia e carcinoma espinocelular. Seus resultados mostraram aumento dos MCs triptase-positivos e correlação

positiva deste aumento com a angiogênese tecidual, sugerindo que os MCs triptase-positivos poderiam atuar na regulação da angiogênese.

Resende & Mill (2002) estudaram as vias alternativas de produção da angiotensina II. Este peptídeo possui ação complementar ao clássico sistema renina-angiotensina-aldosterona. Estes sistemas renina-angiotensina locais exercem efeitos diretos sobre os mecanismos regulatórios locais, como o crescimento celular, formação da matriz dos tecidos, proliferação vascular, modulação da função do endotélio e controle do processo de apoptose. Observou-se que várias proteinases (tripsina, quimase) presentes nos tecidos são capazes de gerar angiotensina II, a partir da angiotensina I ou do próprio angiotensinogênio. Dentre as proteinases, a quimase identificada nos MCs foi uma via alternativa de formação de angiotensina II nos vasos sanguíneos. Desta forma, a quimase presente nos grânulos dos MCs parece contribuir significativamente nos processos de proliferação vascular. Portanto, sugeriu-se que o aumento da atividade da quimase em determinados tecidos estaria associado à densidade local de MCs. Estes, por sua vez, poderiam ter sua proporção alterada em certas condições e, conseqüentemente, na capacidade metabolizadora da angiotensina I pela via da quimase.

Ribatti *et al.* (2005) avaliaram a correlação entre a densidade de MCs triptase+ e a angiogênese em adenocarcinomas endometriais. Foram obtidas biópsias de 10 pacientes com hiperplasia endometrial e de 20 pacientes com adenocarcinoma, estágio I (10 pacientes) e estágio III (10 pacientes). Estes tecidos foram submetidos à técnica imunoistoquímica com anticorpos anti-triptase e anti-CD31. Os resultados mostraram maior densidade de MCs nos pacientes com adenocarcinoma estágio I e III, quando comparados aos pacientes com

hiperplasia. A densidade de vasos foi maior também nos adenocarcinomas estágio I e II, quando comparados à hiperplasia. Estes resultados sugeriram que a angiogênese em adenocarcinomas estava correlacionada com uma maior densidade de MCs triptase+.

Tuna *et al.* (2006) investigaram a associação entre a densidade de MCs e a angiogênese, em carcinomas celulares renais. Obteve-se biópsias de 71 pacientes portadores de carcinoma renal e realizou-se os estudos da densidade dos MCs (técnica imunoistoquímica e azul de toluidina) e da densidade dos vasos sanguíneos (técnica imunoistoquímica com anticorpo anti-CD31). Como controles foram utilizadas biópsias de rins normais. Os resultados mostraram maior densidade de MCs no grupo com carcinoma, quando comparado ao grupo controle. Os MCs localizaram-se preferencialmente próximo à área tumoral e inflamatória peritumoral. Observou-se uma tendência no aumento da densidade dos MCs com a evolução tumoral e correlação estatisticamente significativa entre a densidade de MCs e o subtipo histológico e a densidade dos vasos. Estes resultados sugeriram que os MCs teriam um importante papel na angiogênese tumoral.

Ribatti *et al.* (2007) correlacionaram a angiogênese com a densidade de MCs triptase+ e leptina+ em mioma uterino. Foram obtidas amostras de 14 pacientes com mioma, 14 pacientes com prolapso genital (controle) e 4 pacientes com cisto ovariano (controle). Os tecidos foram submetidos à técnica de imunofluorescência para triptase e leptina e imunoistoquímica com anticorpos anti-triptase, anti-CD31 e anti-leptina. Os resultados mostraram maior densidade de MCs em miomas, quando comparados aos controles, e maior densidade de vasos em miomas em relação aos controles. As densidades de MCs triptase+ e

leptina+ foram significativamente maiores no grupo mioma em relação aos controles. Estes resultados sugeriram que a angiogênese em miomas uterinos correlacionaria-se à maior densidade de MC triptase+ e leptina+.

Estes estudos sugeriram uma forte correlação entre a densidade de MCs e a angiogênese, sendo que a predominância destas células nos tecidos hiperplásicos indicaria uma importante atuação na progressão dos eventos angiogênicos (RIBATTI *et al.*, 2005).

2.2.4 Marcadores específicos

O estudo da densidade dos MCs e dos vasos sanguíneos é feito utilizando um método imunoperoxidase (avidina-biotina-peroxidase) com anticorpos monoclonais anti-triptase e anti-CD31, respectivamente. A técnica de imunoperoxidase utiliza anticorpos marcados com a enzima peroxidase e a presença do antígeno é revelada pela ação da enzima no substrato, ocasionado a mudança de cor (RODINI *et al.*, 2004; BATISTA *et al.*, 2005; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2007).

A triptase é o marcador de escolha específico geralmente utilizado para o estudo da densidade de MCs, uma vez que a triptase corresponde a uma das proteases presentes nos grânulos dos MCs (RODINI *et al.*, 2004). Nos tecidos bucais foram diferenciadas as populações de MCs de acordo com seus fenótipos, sendo identificado como fenótipo de tecido conjuntivo (MC_{TC}), quando seus grânulos apresentavam as proteases quimase e triptase. Por outro lado, também poderiam apresentar o fenótipo de mucosa (MC_T), expressando apenas triptase (WALSH *et al.*, 1995). Logo, a reação positiva à triptase reflete o número total de

MCs (RIBATTI *et al.*, 2005). Walsh *et al.* (1995) observaram no tecido bucal, a predominância de MC_{TC}. Entretanto, a taxa de MCs quimase-positivos não mostrou diferença significativa do total de MCs (triptase-positivos).

As técnicas imunoistoquímicas também são amplamente utilizadas para a caracterização das células endoteliais vasculares utilizando-se marcadores específicos e sensíveis como o CD31 (RIBATTI *et al.*, 2005; TUNA *et al.*, 2006; RIBATTI *et al.*, 2007). O anticorpo monoclonal CD31 corresponde a uma molécula de adesão das células endoteliais às plaquetas. É definido como uma glicoproteína de 100 kD que atua na adesão entre as células endoteliais e as plaquetas, entretanto também pode estar presente em plaquetas e macrófagos (QUEIROGA & LOPES, 2002).

3 PROPOSIÇÃO

Baseado na capacidade dos MCs de produzirem mediadores químicos que participam dos eventos efetores e regulatórios da fibrose e da angiogênese, em condições normais e patológicas, assim como no limitado número de estudos sobre os efeitos da nifedipina na densidade destas células; objetivamos:

a) investigar a densidade dos MCs nos tecidos gengivais de indivíduos saudáveis e pacientes sob terapia com nifedipina;

b) correlacionar esses achados com o grau de colagenização e de vascularização no tecido gengival aumentado pela nifedipina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção da Amostra

Para este estudo caso-controle, foram utilizados casos referentes às espécimes coletados por Castro (2006) e enviados ao Laboratório de Patologia Bucal, da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Goiás. Estes indivíduos foram localizados através de seus registros e solicitada autorização através de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), para uso dos blocos teciduais, com a finalidade de um novo estudo (Anexo I).

A partir destes blocos, foram selecionadas amostras gengivais de pacientes hipertensos usuários de nifedipina (grupo nifedipina) e amostras de tecido gengival clinicamente saudável (grupo controle), com base nos critérios de seleção empregados por Castro (2006) para os dois grupos:

- 1) homens e mulheres usuários regulares de nifedipina (grupo nifedipina);
- 2) homens e mulheres saudáveis (grupo controle);
- 3) presença de CG significativa;
- 4) não apresentar doença periodontal (grupo controle);
- 5) não usar aparelho fixo (grupo controle)
- 6) apresentar indicação de extração ou aumento de coroa clínica.

Foram adotados como critérios de exclusão para os grupos:

- 1) indivíduos que não estavam sob controle médico (grupo nifedipina);
- 2) fumantes;
- 3) edêntulos totais;

4) usuários de nifedipina por um período inferior a seis meses (grupo nifedipina);

5) mulheres grávidas ou na fase de amamentação

6) indivíduos usuários de qualquer droga de uso contínuo (grupo controle).

Os grupos nifedipina e controle foram constituídos de adultos, de ambos os sexos (Anexo II). Verificou-se que a maioria das amostras de tecido gengival referia-se a pacientes do sexo feminino, tanto para o grupo nifedipina (71%), quanto para o grupo controle (62%). Quanto à idade dos pacientes, observou-se que esta variou entre 37 e 71 anos para o grupo nifedipina, com média de aproximadamente 56 anos. Enquanto que no grupo controle, a idade variou entre 24 e 51 anos, sendo a média de aproximadamente 41 anos. Quanto às variáveis farmacológicas, a dose diária de nifedipina variou entre 10 e 40 mg/dia, com média de aproximadamente 33 mg/dia, enquanto que a duração da terapia teve uma variação entre 12 e 144 meses, com média de aproximadamente 50 meses de duração (Quadro 1).

Variáveis	Grupo I (Nifedipina)	Grupo II (Controle)
Número de pacientes	14	9
Idades (anos)	56,14±12,03 (37-71)	41,50±9,72 (24-51)
Distribuição por gênero (F:M)	10:4	5:4
Dose de nifedipina (mg/dia)	33,57±10,81 (10-40)	-
Tempo de uso (meses)	50,35±36,80 (12-144)	-

Quadro 1. Médias, desvios padrão, valores mínimos e máximos das variáveis demográficas e farmacológicas nos grupos nifedipina e controle, para todo o estudo.

O estudo da densidade de MCs foi realizado com 14 amostras de tecido gengival de pacientes hipertensos controlados e usuários de nifedipina que constituíram o grupo nifedipina. Também, selecionou-se 8 amostras de tecido clinicamente saudável, proveniente de pacientes não usuários de medicação, com indicação de aumento de coroa ou gengivectomia, que constituíram o grupo controle.

O estudo da densidade dos vasos sanguíneos foi realizado com amostras de 13 pacientes do grupo nifedipina e 12 do grupo controle, sendo que 3 amostras do grupo controle foram excluídas na contagem. Diferentemente, o estudo da colagenização foi realizado com 14 amostras do grupo nifedipina e 13 amostras do grupo controle, sendo que 5 amostras do grupo controle foram excluídas na avaliação da intensidade de coloração pelo picrossirius (Quadro 2).

Estudos	Grupo I (Nifedipina)	Grupo II (Controle)
Densidade de MCs	14	8
Densidade de Vasos	13	9
Grau de Colagenização	14	8

Quadro 2. Tamanho das amostras do grupo nifedipina e controle utilizadas para o estudo da densidade de mastócitos, densidade de vasos sanguíneos e grau de colagenização.

4.2 Técnicas Empregadas

4.2.1 Técnica de Rotina da Hematoxilina e Eosina e Coloração de Picrossirius

A partir dos casos selecionados emblocados em parafina, realizaram-se cortes seriados com aproximadamente 5 µm de espessura, em micrótomo; em

seguida, estes foram estirados em água e montados em lâminas silanizadas. Os cortes sobre as lâminas silanizadas foram submetidos à técnica histoquímica de rotina da H-E e coloração por picrosirius para identificação do grau de colagenização, cujos os passos foram:

1-Desparafinização, alcoolização e hidratação dos cortes, conforme a seqüência:

a-xilol- 5 minutos

b-álcool absoluto, 3 vezes, por 2 minutos cada vez

c-álcool etílico 95%, 1 vez, por 2 minutos

d-água destilada.

2-Imersão em solução de picrosirius (Anexo III), por trinta minutos.

3-Lavagem em água corrente.

4-Coloração com Hematoxilina de Harris, por um minuto.

5-Diferenciação em água corrente, por um minuto.

6-Imersão em álcool (70, 95 e 100 GL) e xilol (3 vezes).

7-Montagem das lamínulas com resina.

Ao final da coloração, foram obtidas 15 lâminas do grupo controle e 14 lâminas do grupo nifedipina.

4.2.2 Técnica Imunoistoquímica

A partir dos blocos de parafina do grupo controle e dos blocos do grupo nifedipina foram obtidos cortes de 3 µm (11 cortes e 14 cortes, respectivamente) estendidos em lâminas de vidro silanizadas e submetidos à técnica imunoistoquímica por meio de Imunoperoxidase (estreptoavidina-biotina-

peroxidase) para a identificação de MCs e dos vasos sangüíneos através dos anticorpos anti-triptase (DAKO, AA1, M7052) e anti-CD31 (Novocastra, 1A10), respectivamente. Os passos foram os seguintes:

Parte I

1-Desparafinização e hidratação dos cortes, pela seqüência:

a-xilol, 3 vezes, por 5 minutos cada vez

b-álcool absoluto, 3 vezes, por 2 minutos cada vez.

c-álcool etílico 95%, 1 vez, por 2 minutos

d-lavagem em solução salina tamponada Tris (TBS) (Anexo IV), 2 vezes, por 1 minuto.

2-Lavagem em água destilada morna.

3-Incubação em tampão citrato (Anexo V), pH 6,0, por 30 minutos, aquecido previamente a 95 °C, com auxílio de Banho Maria Digital (DeLeo), para exposição do antígeno CD31.

4-Resfriamento Progressivo à temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos.

5-Lavagem em TBS com Triton X-100, 2 vezes.

6-Incubação com peróxido de hidrogênio (Merck) a 3% em solução salina tamponada (PBS), por 40 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena.

7-Lavagem em TBS com Triton X-100.

8-Incubação em soro de leite a 3% em água destilada (leite desnatado Molico®), por 30-40 minutos, para o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas.

9-Incubação com os anticorpos primários, por 18 horas e mantidas em temperatura de 4°C. Os anticorpos que foram utilizados e suas respectivas diluições estão especificados no Quadro 3.

Anticorpo	Diluição	Clone	Código	Fabricante
Monoclonal de camundongo anti-triptase humano	1:2000	AA1	M7052	DAKO
Monoclonal de camundongo anti-CD31 humano	1:200	1A10	-	Novocastra

Quadro 3. Anticorpo primário e sua respectiva diluição, clone, código e fabricante utilizados nas amostras.

Para todas as diluições realizadas foi utilizado o PBS associado ao soro albumina bovina (PBS-BSA) a 1%, em câmara úmida; sendo que os cortes a serem incubados com anticorpos anti-triptase não precisaram de exposição antigênica, conseqüentemente, os passos 2, 3, 4 e 5 foram realizados somente para os cortes a serem incubados com anticorpos anti-CD31.

Parte II

1-Lavagem em TBS com Triton X-100, 6 vezes ou mais, para remoção do resíduo de anticorpo.

2-Secagem da área ao redor do corte.

3-Incubação com os anticorpos biotinizados anti-IgG de coelho/camundongo/cabra por 30 minutos, à temperatura de 22 a 25 °C.

4-Lavagem em TBS com Triton X-100, 6 vezes ou mais, para remoção do resíduo de anticorpo.

5-Incubação com a estreptoavidina marcada com peroxidase por 30 minutos, à temperatura ambiente (kit DAKO LSAB +, Peroxidase- Universal-k0690).

6-Lavagem em TBS com Triton X-100, 6 vezes ou mais.

7-Revelação da reação com o 3.3'Diaminobenzidina (DAB) em uma solução cromogênica (DAKO, K3468), por 2 a 3 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz.

8-Interrupção da revelação com incubação em água destilada.

9-Contra-coloração com hematoxicilina de Mayer, por 1 minuto, à temperatura ambiente.

10-Lavagem em água corrente por 5 a 10 minutos.

11-Incubação com álcool 70%, por 1 minuto.

12-Incubação com álcool 95%, por 1 minuto.

13-Incubação com álcool absoluto, por 1 minuto (2 vezes).

14-Incubação em xilol (3 vezes).

15-Montagem das lâminas com solução de resina não aquosa (Entellan, Merck).

4.3 Análise Qualitativa das Lâminas de Tecido Gengival Clinicamente Saudável e Sob Efeito da Nifedipina

As lâminas submetidas às técnicas histoquímica e imunoistoquímica foram avaliadas com o auxílio de um microscópio (CARL ZEISS, Germany), quanto à intensidade das fibras colágenas, bem como a distribuição destas fibras, dos MCs

e dos vasos sangüíneos. Observou-se, também, a presença de infiltrado inflamatório, a localização e a marcação dos MCs.

4.4 Análise Quantitativa das Lâminas de Tecido Gengival Clinicamente Saudável e Sob Efeito da Nifedipina

4.4.1 Contagem de Células por mm² das Lâminas de Tecido Gengival Clinicamente Saudável e Sob Efeito da Nifedipina

O número de células CD31-positivas e triptase-positivas foi determinado por meio de análise morfométrica, utilizando microscópio óptico (CARL ZEISS, Germany) contendo um retículo de integração (CARL ZEISS, Germany). Para esta contagem, utilizou-se objetiva de 40x; neste aumento, o lado (L) do retículo de integração, obtido por meio de uma lâmina milimetrada, corresponde a 0,31 mm. Determinou-se a área do retículo (A), pela expressão matemática: $A = (L)^2$, resultando em uma área de 0,0961mm².

Para cada amostra selecionada, os MCs e os vasos sangüíneos foram quantificados em dez campos microscópicos consecutivos (área total de 0,0961mm²), determinou-se a região subjacente à lâmina própria. Registrou-se o número total de MCs e vasos encontrados na área total percorrida e dividiu-se este número por 0,0961 mm², obtendo-se a média de células por milímetro quadrado (mm²).

Todas as contagens foram realizadas por um único examinador; enquanto que a avaliação do grau de colagenização pelo picrosírius foi realizada por outro

examinador, com aumento de 10x, conforme a intensidade de colagenização: escore 1 (muito colagenizado) e escore 2 (intensamente colagenizado).

4.5 Análise Estatística das Lâminas de Tecido Gengival Clinicamente Saudável e Sob Efeito da Nifedipina

Utilizando o programa SPSS, versão 10.01, 1999 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA), avaliou-se a média do número de MCs por mm^2 observados em cada grupo. As médias dos números de MCs e de vasos por mm^2 e seus respectivos desvios padrão, foram analisados estatisticamente, por meio do teste U de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos não pareados (Nifedipina e Controle). Foram consideradas estatisticamente significantes, as diferenças cujo P era $\leq 0,05$. A comparação do grau de colagenização entre o grupo nifedipina e controle foi realizada pelo teste de Tukey. As correlações entre o número de MCs e a dose de nifedipina, assim como a correlação entre o número de MCs e vasos sangüíneos, foram analisadas e trabalhadas estatisticamente, por meio do teste de Pearson. Já a correlação entre o número de MCs e o grau de colagenização foi analisada pelo teste de correlação de Spearman. Foram consideradas estatisticamente significantes, as correlações quando $P \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Qualitativa das Lâminas de Tecido Gengival Clinicamente Saudável e sob Efeito da Nifedipina

5.1.1 Grupo Nifedipina

Observou-se no presente trabalho:

- epitélio gengival pavimentoso estratificado hiperplásico (Figura 1, 3 e 5),
- áreas paraqueratinizadas e ortoqueratinizadas (Figura 3),
- presença de acantose e cristas epiteliais alongadas de diversos comprimentos (Figura 1, 3 e 5).
- grau variado de infiltrado inflamatório, com MCs distribuídos preferencialmente próximos às cristas epiteliais e aos vasos sanguíneos (Figura 1 e 2).
- aspecto sugestivo de desgranulação da grande maioria dos MCs teciduais (Figura 2).
- imunomarcagem dos vasos sanguíneos foi qualitativamente maior no grupo nifedipina quando comparado ao grupo controle (Figura 3 e 4),
- distribuição difusa de vasos no tecido conjuntivo fibroso e geralmente apresentavam-se congestos (Figura 2 e 4).
- marcação intensa do colágeno na área subjacente à camada basal do epitélio hiperplásico (Figura 5).

- íntimo contato do colágeno com as cristas epiteliais, sendo que o colágeno foi mais intenso no grupo nifedipina quando comparado ao grupo controle (Figura 5).

Fotomicrografias de Tecido Gengival sob Efeito da Nifedipina

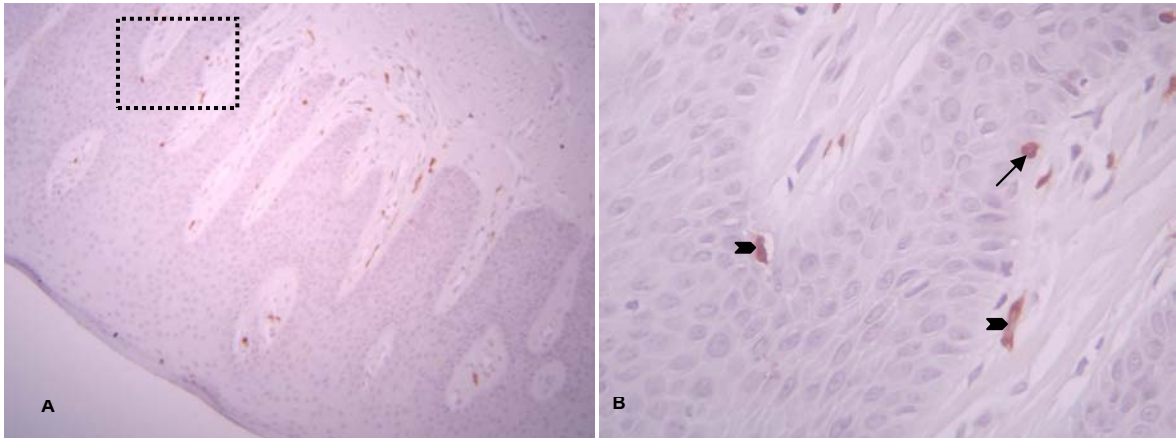


Figura 1. A- MCs no tecido gengival sob efeito da nifedipina, tanto intra quanto subepitelial (área destacada). B- Evidencia a área destacada em maior aumento (Aumento original 40x), sendo que os MCs estão em íntimo contato com o epitélio (seta), bem como no interior do mesmo (cabeça de seta).

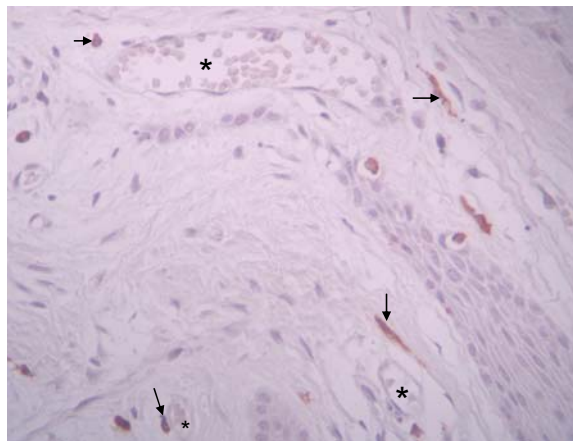


Figura 2. MCs (setas) próximos aos vasos sanguíneos (asteriscos)

Fotomicrografias de Tecido Gengival sob Efeito da Nifedipina

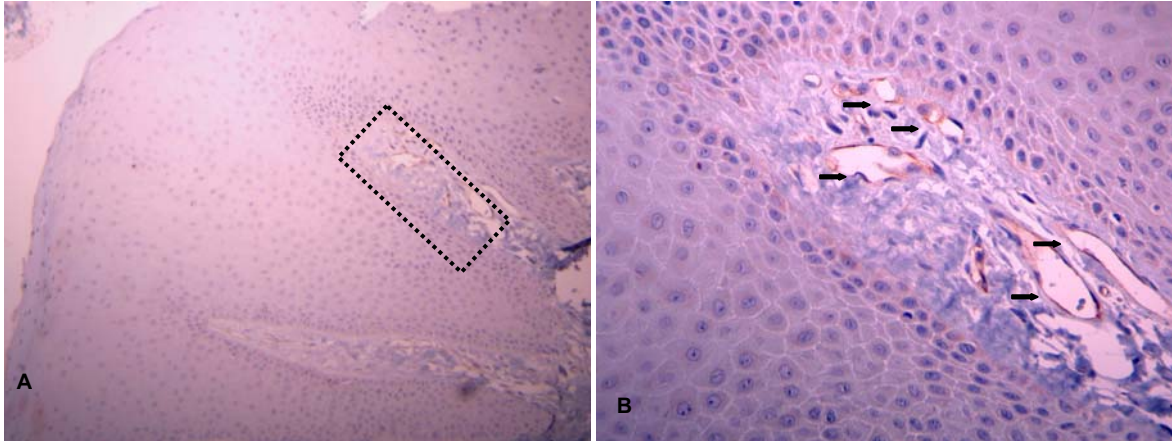


Figura 3. A – Cristas epiteliais longas no tecido gengival sob efeito da nifedipina. B- Representa em maior aumento (Aumento original 10x), a área destacada em A, evidenciando vasos sanguíneos CD31+ (setas).

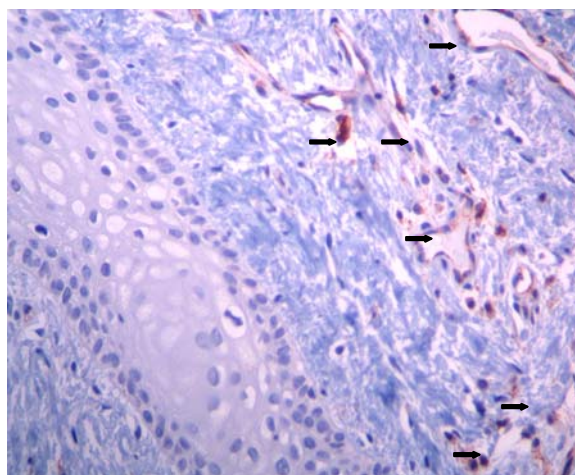


Figura 4. Cristas epiteliais longas no tecido gengival sob efeito da nifedipina, a área evidencia vasos sanguíneos CD31+ (setas).

Fotomicrografias da Técnica de Histoquímica por Picrosirius em Tecido Gengival sob Efeito da Nifedipina

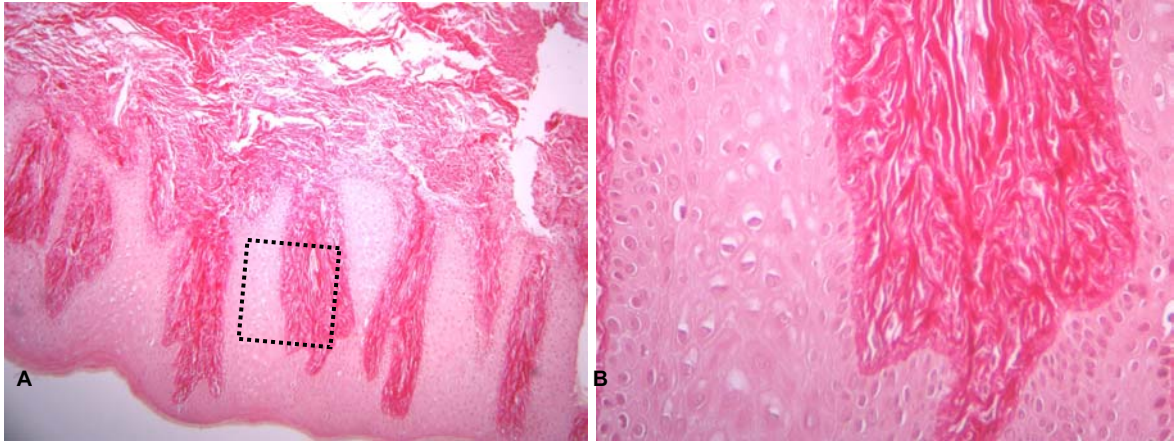


Figura 5. A – Presença de bastante colágeno subjacente ao epitélio hiperplásico do tecido gengival sob efeito de nifedipina. B – Representa em maior aumento (Aumento original de 10x) as fibras colágenas subjacentes às cristas epiteliais alongadas.

5.1.2 Grupo Controle

Observou-se nos cortes microscópicos do tecido gengival de indivíduos saudáveis:

- epitélio hiperplásico pavimentoso estratificado com áreas paraqueratinizadas e ortoparaqueratinizadas (Figura 6).

- presença de cristas epiteliais curtas e áreas de acantose (Figura 6, 7 e 8).

- leve infiltrado inflamatório com menor presença de MCs, muitas fibras colágenas e muitos vasos sangüíneos (Figuras 6).

- menor intensidade do colágeno quando comparado ao grupo nifedipina (Figura 8).

- presença de inflamação correlacionada à degradação do colágeno (Figura 8).

Fotomicrografias de Tecido Gengival Clinicamente Saudável

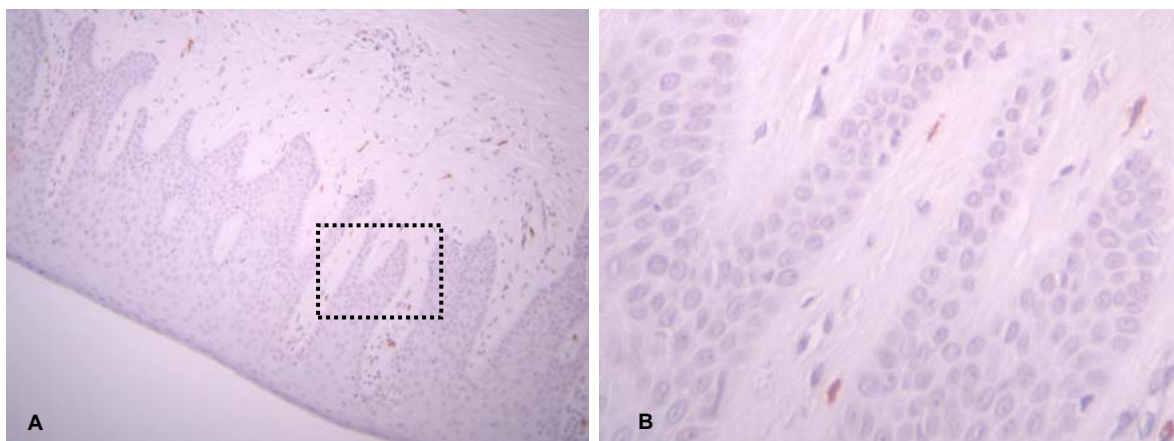


Figura 6. A – Cristas epiteliais mais curtas no tecido gengival saudável. B- Representa em maior aumento (Aumento original 40x), a área destacada em A, evidenciando menor número de MCs.

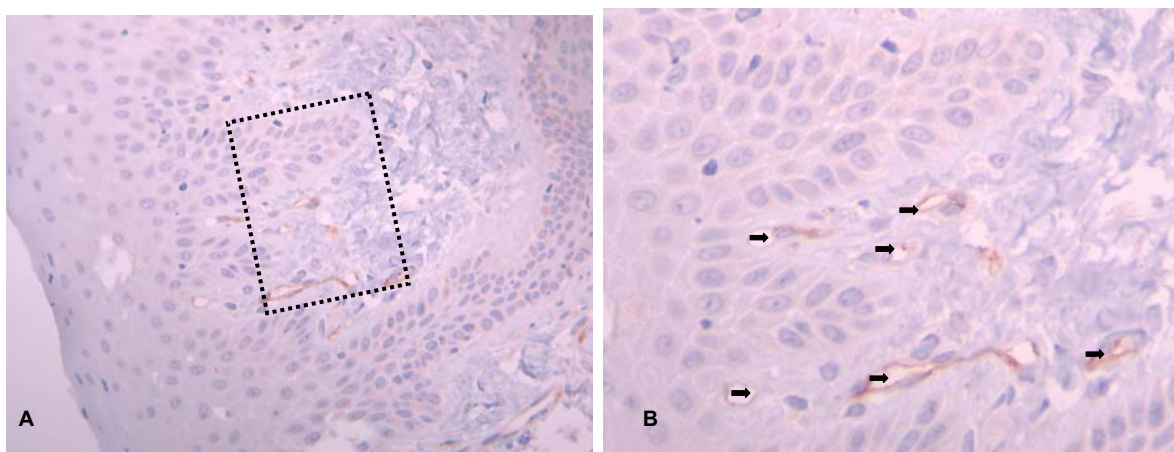


Figura 7. A – Cristas epiteliais mais curtas no tecido gengival saudável. B- Representa em maior aumento (Aumento original 40x), a área destacada em A, evidenciando vasos sangüíneos CD 31+ (setas).

Fotomicrografias de Tecido Gengival Clinicamente Saudável

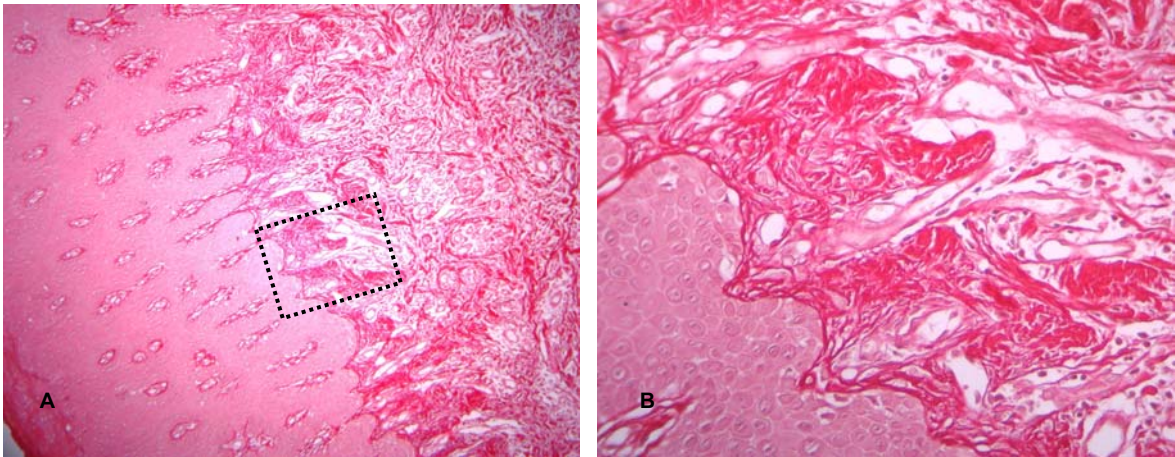


Figura 8. A – Presença de muito colágeno subjacente ao epitélio hiperplásico do tecido gengival clinicamente saudável. B – Representa em maior aumento a área evidenciada em A pela técnica de Picrosirius (Aumento original de 10x). Observa-se as fibras colágenas subjacentes às cristas epiteliais, no entanto denota-se degradação do colágeno nas áreas com inflamação.

5.2 Análise Quantitativa das Lâminas de Tecido Gengival Clinicamente Saudável e sob Efeito da Nifedipina

5.2.1 Contagem de Mastócitos por mm² nos Grupos Nifedipina e Controle

Na análise quantitativa de MCs por mm², foi verificada maior densidade de MCs triptase+ no grupo de pacientes sob terapia com nifedipina (68,23 ± 32,96) em relação ao grupo controle (29,39 ± 27,09). Esta diferença foi significativa (P=0.02, teste U de Mann-Whitney) (Figura 9).

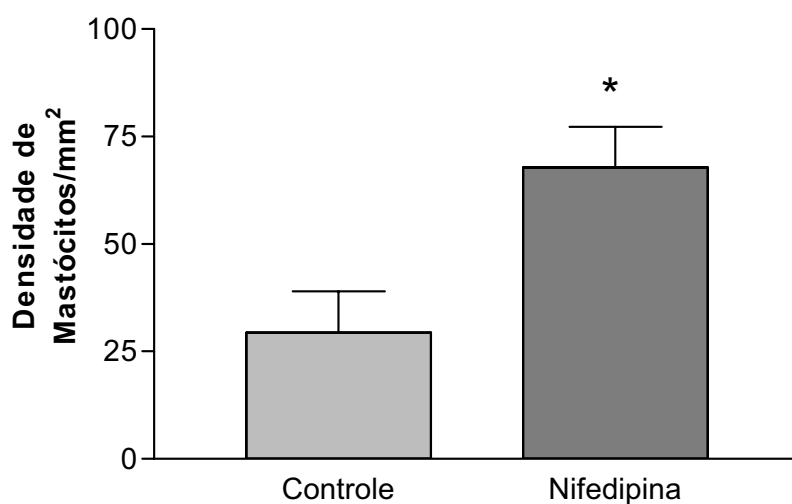


Figura 9. Média do número de MCs por mm² quantificados em amostras de tecido gengival de pacientes submetidos à terapia com Nifedipina (Nifedipina) e em amostras de tecido gengival clinicamente sem alterações e inflamação (Controle). * P<0,05, Teste U de Mann-Whitney.

5.3.2 Contagem de Vasos Sangüíneos por mm² nos Grupos Nifedipina e Controle

Quando avaliada a quantidade dos vasos sangüíneos, o grupo nifedipina (78,352 ± 32,71) revelou maior número de vasos em relação ao grupo controle (75,610 ± 38,23). No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa (P=0,6, teste U de Mann-Whitney) (Figura 10).

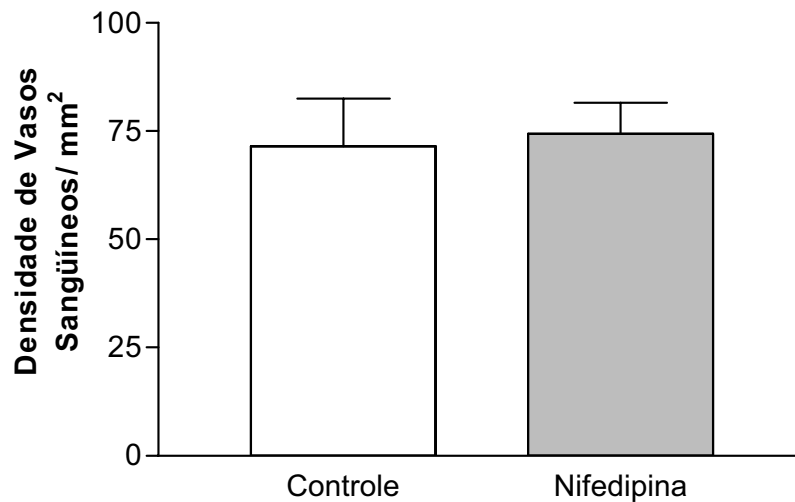


Figura 10. Média da densidade de vasos sangüíneos por mm² quantificados em amostras de tecido gengival de pacientes submetidos à terapia com Nifedipina (Nifedipina) e em amostras de tecido gengival clinicamente sem alterações e inflamação (Controle). P>0,05, Teste U de Mann-Whitney.

5.3.3 Avaliação do Grau de Colagenização entre os Grupos Nifedipina e Controle

O colágeno presente no tecido conjuntivo foi avaliado pela técnica histoquímica com picrossirius, medindo-se a intensidade da coloração das fibras colágenas e os valores foram enquadrados em duas categorias: escore 1 (muito colagenizado) e escore 2 (intensamente colagenizado) (Quadro 7). Pode ser observado que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P=0,6$, teste de Tukey) (Figura 11).

Grupos	Tamanho da Amostra	Escore 1	Escore 2
Nifedipina	n=14	10	4
Controle	n=8	5	3

Quadro 7. Escore de colagenização dos tecidos gengivais de pacientes usuários de nifedipina e em indivíduos saudáveis.

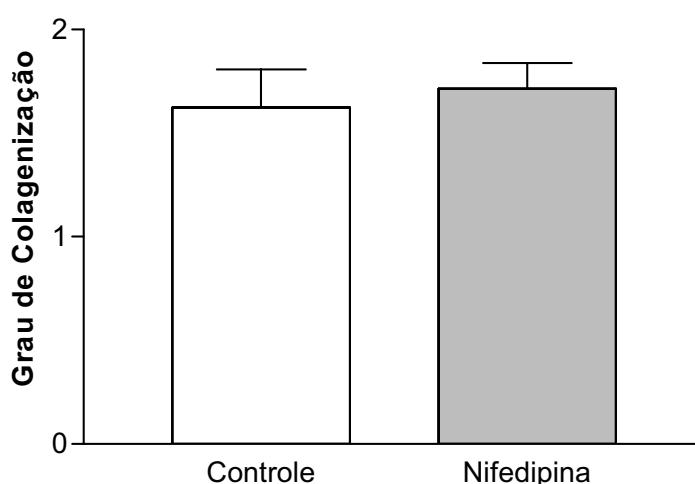


Figura 11. Comparação entre os grupos nifedipina e controle quanto ao grau de colagenização do tecido gengival. $P>0,05$, Teste de Tukey.

5.3.4 Correlação entre o Número de MCs e de Vasos Sangüíneos no Grupo Nifedipina

Na avaliação da correlação entre o número de MCs e o número de vasos, observamos que não houve correlação estatisticamente significativa ($P=0,3$, teste de Pearson) (Figura 12).

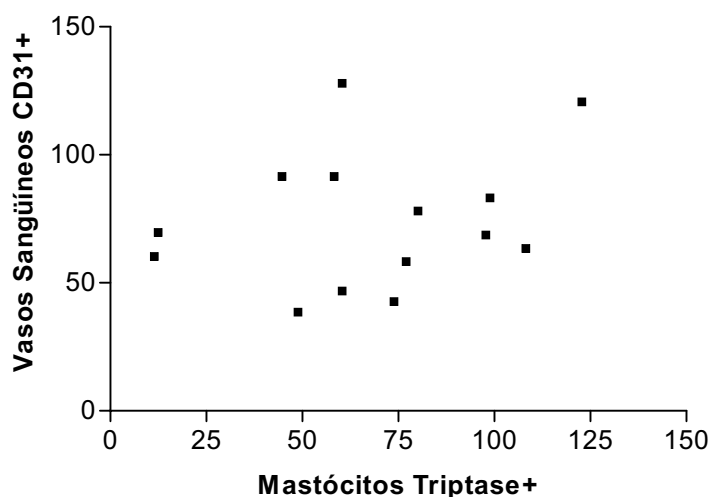


Figura 12. Teste de correlação entre a densidade de MCs por mm^2 e a densidade de vasos sangüíneos por mm^2 no grupo nifedipina. $P>0,05$, Teste de Pearson.

5.3.5 Correlação do Número de MCs com as Variáveis Farmacológicas no Grupo Nifedipina

Na avaliação da correlação entre o número de MCs e a dose diária da nifedipina, observamos que não houve correlação ($P=0,2$, teste de Pearson) (Figura 13). Também não foi significativa a correlação do número de MCs com a duração da terapia com nifedipina ($P=0,7$, teste de Pearson) (Figura 14).

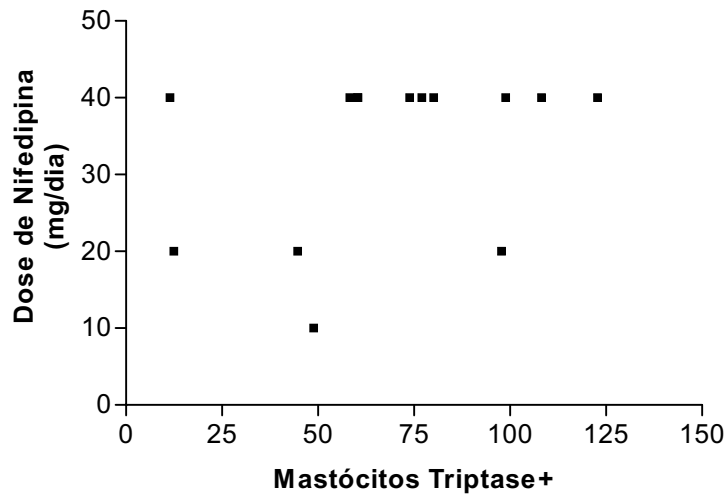


Figura 13. Teste de correlação entre a densidade de MCs por mm² e a dose de nifedipina. P>0,05, Teste de Pearson.

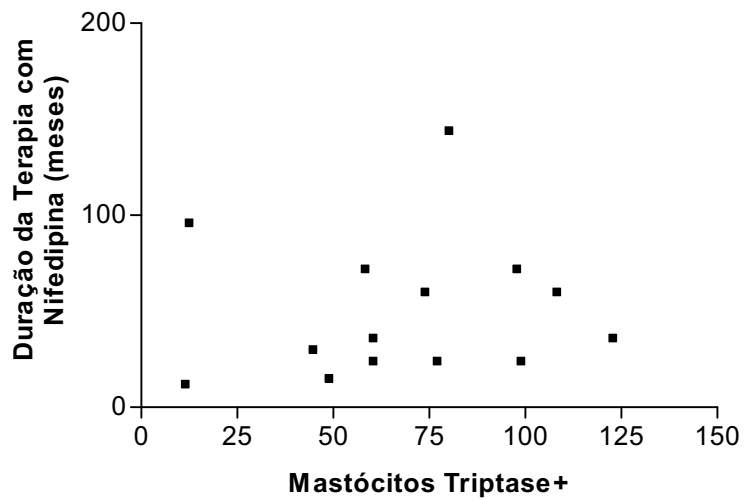


Figura 14. Teste de correlação entre a densidade de MCs com a duração da terapia com nifedipina. P>0,05, Teste de Pearson.

5.3.6 Correlação entre o Número de MCs e o Grau de Colagenização no Grupo Nifedipina

Na avaliação da correlação entre o número de MCs e o grau de colagenização, observamos que não houve correlação entre as variáveis ($P=0,1$, teste de Spearman) (Figura 15).

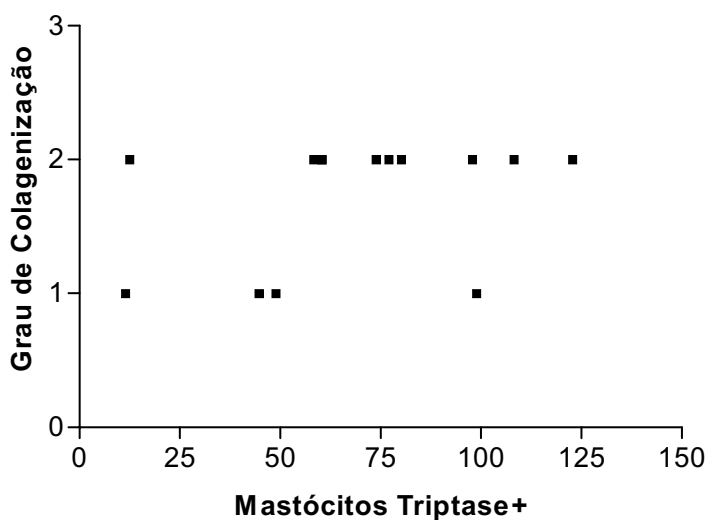


Figura 15. Teste de correlação entre a densidade de MCs e o grau de colagenização dos tecidos gengivais sob efeito da nifedipina. $P>0,05$, Teste de Spearman.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, estudamos a densidade de MCs, em amostras gengivais de pacientes sob terapia com nifedipina, os quais eram, em sua maioria, do sexo feminino, com idades variando entre 37 e 71 anos, com idade média de 56 anos. Nossa amostra de tecido gengival (n=14) foi maior quando comparada aos estudos anteriores realizados em indivíduos sob terapia medicamentosa, incluindo a nifedipina (DUMMENTT *et al.*, 1961; ASHARA *et al.*, 2000; SOORY & SUCKAK, 2001, NURMENNIEMI *et al.*, 2004). Dummentt *et al.* (1961) trabalharam com 9 pacientes sob terapia com fenitoína, enquanto que Asahara *et al.* (2000) trabalharam com 60 camundongos sob dieta com ciclosporina. O estudo de Soory & Suckak (2001) foi realizado a partir de cultura de MCs humanos incubados com fenitoína; Nurmenniemi *et al.* (2004) trabalharam com amostras de 11 pacientes sob terapia com nifedipina. Logo, são poucos os trabalhos investigando a densidade de MCs no CG induzido exclusivamente pela nifedipina; e dentre aqueles encontrados a casuística é inferior àquela utilizada em nosso estudo. Provavelmente, devido à dificuldade em se obter material para o estudo.

Os MCs têm sido encontrados tanto nos tecidos gengivais saudáveis quanto nas áreas de inflamação (ANGELOPOUS, 1973; BARNETT, 1973a; BARNETT, 1973b; KENNETT *et al.*, 1993; WALSH *et al.*, 1995; WALSH, 2003; BATISTA *et al.*, 2005). Apesar dos MCs estarem geralmente associados à inflamação, seu papel no CG ainda é incerto (KENNETT *et al.*, 1993; ASAHARA *et al.*, 2000; NURMENNIEMI *et al.*, 2004; NURMENNIEMI, 2006). De fato, não está definido se há

uma alteração na população dos MCs nos tecidos gengivais sob efeito de medicação.

Sabe-se que este tipo celular apresenta importantes funções regulatórias e efetoras contra patógenos, sendo que estas variam de acordo com a heterogeneidade morfológica e funcional dos MCs. Uma vez liberados na circulação sangüínea, os precursores indiferenciados completam sua maturação e diferenciação no tecido para onde são recrutados, devido à influência de fatores ambientais, fatores de origem celular (SCF) e citocinas (IL-3). Uma vez diferenciados, os MCs distribuem-se por todo o tecido, localizando-se preferencialmente adjacentes aos vasos sangüíneos, aos vasos linfáticos e próximo ao epitélio (FERREIRA *et al.*, 2004). Em seu interior, apresentam-se grânulos citoplasmáticos ricos em mediadores químicos capazes de controlar ou exacerbar a lesão tecidual, a angiogênese, a fibrose, a inflamação e a resposta imunitária (BATISTA *et al.*, 2005).

No presente estudo, analisando amostras de tecidos gengivais de humanos clinicamente saudáveis e de pacientes sob terapia com nifedipina, por meio de técnica histoquímica e imunoistoquímica, observou-se um significativo aumento no número dos MCs em relação ao tecido gengival saudável ($P=0,02$, Mann-Whitney). Este resultado pode sugerir que a nifedipina atua sobre a densidade destas células, o que poderia levar a uma maior concentração de mediadores químicos no meio extracelular, contribuindo para as alterações teciduais observadas no CG induzido por medicação. Nossos resultados são conflitantes com os estudos prévios, os quais não verificaram aumento da população de MCs em tecidos gengivais sob ação de BCC e imunodepressores (ASAHARA *et al.*, 2000; NURMENIEMI *et al.*, 2004). Dummentt *et al.* (1961), apesar

de encontrarem uma densidade variada de MCs em tecidos gengivais sob efeito da fenitoína, não utilizaram um grupo controle. Baseado em nossos resultados, o aumento da densidade dos MCs *in vivo* pode estar relacionado a uma possível participação desta célula no desenvolvimento do CG induzido pela nifedipina.

As alterações microscópicas do tecido gengival de pacientes sob terapia com nifedipina coincidem com aqueles observados nos estudos anteriores sobre crescimento gengival medicamentoso: intensa colagenização, aumento da vascularização, cristas epiteliais alongadas e epitélio hiperplásico (HASSEL *et al.*, 1976; BONNAURE-MALLET *et al.*, 1995; DJEMILEVA *et al.*, 1999; ESLAMI *et al.*, 2004; BULUT *et al.*, 2006).

No crescimento gengival induzido pela nifedipina, estudos microscópios como de Castro (2006), revelaram que os usuários de nifedipina exibiram um tecido epitelial com cristas significativamente mais longas do que os indivíduos do grupo controle ($P < 0,02$, Mann-Whitney). Embora haja indícios de que os metabólitos da droga concentrados no tecido gengival interajam com várias moléculas ou células nos tecidos hiperplásicos, é de consenso geral a participação das células inflamatórias e de seus mediadores como um dos fatores correlacionados ao CG, sugerindo uma ação sinérgica entre o sistema de defesa do hospedeiro e a ação da droga nos tecidos bucais (ASAHARA *et al.*, 2000; SOUSA, 2002; CASTRO, 2006).

Considerando que o CG apresenta uma patogênese multifatorial, uma das hipóteses sugere que as substâncias responsáveis pelo processo estariam sofrendo a influência do desequilíbrio das citocinas e de fatores de crescimento, os quais encontram-se aumentados nos tecidos humanos sob efeito de drogas anticonvulsivantes, antihipertensivas e depressoras. Uma vez alterada a

homeostasia dos mediadores químicos nos tecidos gengivais, ocorreriam alterações nos vários tipos de populações celulares, interferindo sobre a degradação do colágeno, a angiogênese e a fibrose gengival (TRACKMAN & KANTARCI, 2004). Dentre as populações que poderiam estar alteradas, os MCs e o conteúdo de seus grânulos poderiam estar associados às alterações teciduais observadas nos tecidos gengivais.

Estudos prévios sugerem que os MCs sejam responsáveis pela produção dos mediadores químicos que induzem o crescimento dos queratinócitos, a fibrose e os eventos angiogênicos (BENITEZ-BRIBIESCA *et al.*, 2001; NURMENNIEMI *et al.*, 2004; GRIMBALDESTON *et al.*, 2006; NURMENNIEMI, 2006; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2007). A elevação das taxas de proliferação do tecido epitelial observada no tecido gengival sob ação de medicação pode ocorrer devido a estímulos provenientes do tecido conjuntivo (CASTRO, 2006). Estes estímulos podem atuar sobre o crescimento dos queratinócitos e poderiam estar relacionados aos mediadores químicos presentes nos grânulos dos MCs: heparina, triptase, quimase, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, TGF- β , FGF-2, FGF-5, FGF-7, FGF-10, EGF, lipídios, leucotrienos B4, C4 e D4, PDGF e carboxipeptidase A (GRIMBALDESTON *et al.*, 2006).

Adicionalmente, o aumento da densidade de colágeno observado no tecido conjuntivo sob ação de BCC e imunodepressores pode estar relacionado a alguns mediadores presentes nos grânulos dos MCs, como as proteinases (quimase e triptase) associadas à molécula de heparina. Estes mediadores poderiam interferir na degradação da matriz extracelular, resultando no acúmulo do colágeno observado nos tecidos gengivais sob ação de imunodepressores (ASAHARA *et al.*, 2000; NURMENNIEMI *et al.*, 2004). Devido à sua localização próxima aos vasos,

sugere-se que os MCs possam participar também da angiogênese, através de mediadores como: histamina, FGF, TGF- β , TNF- α , triptase e heparina (GRIMBALDESTON *et al.*, 2006; NURMENNIEMI, 2006). Logo, há indícios de que os MCs estejam envolvidos nas alterações teciduais observadas no CG induzido por medicação.

Entretanto, nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa no grau de colagenização do tecido conjuntivo do grupo nifedipina, quando comparado ao grupo controle ($P=0,6$, teste de Tukey). Apesar destes resultados, a análise qualitativa mostrou que o colágeno é mais intenso no grupo nifedipina, quando comparado ao grupo controle. A avaliação do colágeno pela técnica de picrosirius mostrou intensa marcação do colágeno subjacente à camada epitelial do grupo nifedipina, quando comparado ao grupo controle. Chamou a atenção, a presença de um epitélio hiperplásico no grupo controle, com presença de infiltrado inflamatório associado a menor intensidade do colágeno. Logo, nossa análise qualitativa sugere que a inflamação esteja relacionada ao colágeno degradado, sendo que o grupo controle teve maior predominância de infiltrado inflamatório associado às áreas de degradação do colágeno. Nossos resultados corroboram com o estudo anterior de Bonnaure-Mallet *et al.* (1995), no qual também não foram encontradas diferenças na porcentagem de área ocupada pelo colágeno entre os grupos nifedipina e controle, exceto para a fibronectina ($P<0,05$, Teste de Wilcoxon).

Observamos também densidade variada de vasos sangüíneos CD31+, nos tecidos gengivais sob ação da nifedipina. Esta densidade não mostrou diferença significativa quando comparado ao grupo controle, representado por tecido gengival clinicamente saudável ($P=0,5$, Mann-Whitney). Esta diferença irrelevante

na densidade dos vasos pode estar relacionada à sensibilidade da técnica imunohistoquímica para anticorpo anti-CD31, uma vez que observamos que a maioria dos tecidos do grupo nifedipina apresentou uma imunomarcacão leve que poderia estar relacionada às condições do tecido conjuntivo. De modo geral, este se apresentou destacado do tecido epitelial e pouco preservado, o que dificultou a contagem dos pequenos vasos. Diferentemente, o grupo controle apresentou tecido conjuntivo íntegro e com boa imunomarcacão. A análise qualitativa sugere maior densidade de microvasos no grupo nifedipina, quando comparado ao grupo controle. Este apresentou prevalência de vasos maiores. Sendo assim, devemos considerar que a fraca expressão de microvasos CD31+ nas nossas amostras do grupo nifedipina, pode representar uma falha técnica, resultando em microvasos fracamente marcados. Como não foram considerados imunomarcacões verdadeiras na contagem, devemos considerar que a densidade dos vasos sangüíneos nos tecidos gengivais sob efeito da nifedipina tende a ser maior que os valores encontrados em nosso estudo. Estes resultados diferem daqueles observados no estudo de Bonnaure-Mallet *et al.* (1995), no qual foi encontrada uma área ocupada por vasos significativamente maior no grupo nifedipina ($P < 0,05$, Teste de Wilcoxon).

O presente estudo corrobora com os achados de Dummett *et al.* (1961) que constataram também que não havia correlacão entre a densidade de MCs e o grau de vascularizacão. Entretanto, contrastam com os resultados dos estudos de Tuna *et al.* (2006) e de Ribatti *et al.* (2007); apesar destes estudos terem sido realizados com amostras teciduais totalmente diferentes, de carcinoma renal e mioma, respectivamente. Tuna *et al.* (2006) mostraram correlacão significativa entre a densidade de MCs e a densidade de vasos ($P = 0,034$, correlacão de

Pearson). Apesar da amostra ser maior (n=71) e ter trabalhado com carcinomas celulares renais, seus resultados sugerem que os MCs possam ter uma importante participação na angiogênese. Por outro lado, Ribatti *et al.* (2007) estudaram uma amostra pequena (n=14) assim como nosso estudo (n=13); entretanto, foram significantes apenas as comparações das densidades de MCs ou de vasos entre o grupo mioma e o grupo controle. Diferentemente, não verificamos correlação entre o número de MC e o número de vasos sanguíneos nas amostras do grupo nifedipina (P=0,4, correlação de Pearson).

De acordo com nossos resultados, podemos sugerir que o aumento da densidade de MCs não se relaciona com o aumento da angiogênese no CG induzido pela nifedipina. Infelizmente, não foram avaliados os mediadores químicos que participam da angiogênese (histamina, FGF, TGF- β , TNF- α , heparina), embora tenhamos observado um aumento na proporção dos MCs e predominância de vasos congestos nos tecidos do grupo nifedipina. Talvez a maior densidade dos MCs possa contribuir para uma maior concentração dos mediadores químicos que regulam a angiogênese.

Também não verificamos correlação entre o número de MCs e o grau de colagenização dos tecidos gengivais do grupo nifedipina (P=0,3, teste de Spearman). Considerando que o tecido conjuntivo do grupo controle e nifedipina apresentaram-se bem colagenizados, nossos resultados não permitem inferir associação dos MCs com as alterações na colagenização. Entretanto, nossa análise qualitativa sugere uma intensidade maior do colágeno no grupo nifedipina. Nossos resultados também não mostraram correlação entre a densidade aumentada dos MCs com a dose de nifedipina (P=0,3, correlação de Pearson) e

com a duração da terapia ($P=0,08$, correlação de Pearson). Estes resultados são semelhantes àqueles observados por Dummett *et al.* (1961).

O aumento na densidade dos MCs observado em nossos estudo difere dos demais estudos. Nossos resultados sugerem que diferenças metodológicas, medicações diferentes e duração da terapia possam alterar a densidade das populações celulares e dos mediadores químicos nos tecidos gengivais. (BRESCHI *et al.*, 2000; KATAOKA *et al.*, 2001; LINDEN *et al.*, 2001; BULUT *et al.*, 2006).

A diferença de metodologia entre o estudo atual e os estudos prévios de Asahara *et al.* (2000) e Nurmenniemi *et al.* (2004) pode ser uma explicação para as diferenças encontradas por nós e estes autores. Um questionamento observado inicialmente foi com relação à metodologia utilizada em cada estudo para identificar os MCs. Nosso estudo empregou uma técnica imunistoquímica do tipo imunoperoxidase. Por se tratar de uma técnica sensível e específica, suas etapas exigem critério metodológico. (BATISTA *et al.*, 2005).

Asahara *et al.* (2000) utilizaram a técnica histoquímica com azul de toluidina para identificar os MCs nos tecidos gengivais de camundongos; diferentemente de Numernniemi *et al.* (2004) e de nosso estudo onde utilizamos uma técnica imunistoquímica com marcação por anticorpo anti-triptase. A primeira técnica utilizada, tem menor sensibilidade, quando comparada à técnica imunistoquímica com anticorpo anti-triptase (NURMENNIEMI *et al.*, 2004). Conseqüentemente, a técnica imunistoquímica, por ser mais específica, resulta em contagens mais facilitadas, mais rápidas e precisas (BATISTA *et al.*, 2005).

Há um consenso na literatura quanto à etiopatogênese multifatorial do CG, este é um processo complexo que se relaciona a diversos fatores (ISHIDA *et al.*, 1995; ASAHARA *et al.*, 2000; CORREA, 2004). Ishida *et al.* (1995), *apud* Correa

(2004), relatam que o CG induzido pela nifedipina em ratos pode ser influenciado pelas seguintes variáveis: idade, concentração da droga administrada na dieta, nível da droga no soro, tempo de administração da droga e sexo. Sendo assim, os resultados obtidos em experimentos com animais apresentam muitas dificuldades quando se deseja reproduzir de modo apropriado o CG induzido por medicação, o que torna complicado confrontar os resultados.

Asahara *et al.* (2000) utilizaram 60 camundongos (30 machos e 30 fêmeas), com 3 semanas de vida. Estes camundongos foram divididos em 30 animais deficientes em MCs e 30 normais. Os animais foram subdivididos em 5 grupos (0, 300, 400, 500, e 600 mg de ciclosporina/kg na dieta) constituídos por 6 animais cada (3 machos e 3 fêmeas). Após 30 dias, todos os animais foram sacrificados. Os grupos 0, 300, 400 e 500 mg de ciclosporina/kg não apresentaram CG aparente, sugerindo que o nível da droga no soro não foi suficiente para induzir o CG. Em contraste, os grupos que receberam 600mg/kg de ciclosporina na dieta mostraram sinais aparentes de CG. Independente do grupo avaliado, não se observou diferença quantitativa dos MCs. Entretanto, observou-se que o estudo do CG em camundongos é mais difícil quando comparado ao estudo do CG em ratos, devido ao rápido metabolismo e à necessidade de triplicar a quantidade da ciclosporina para induzir o CG.

Considerando ainda a diferença entre os experimentos, o estudo em animal somente pode ser confrontado com o experimento em humanos, quando há uma adequação direta da dose da medicação entre animais e humanos, visando atingir uma mesma concentração plasmática. Esta adequação não foi realizada por Asahara *et al.* (2000) e ainda que fosse feita uma apropriada dosagem dos níveis plasmáticos da droga em humanos e camundongos, haveria

a diferença do metabolismo entre eles. Os camundongos apresentam alto metabolismo, logo, necessitam de uma dose bem maior da droga para que esta possa induzir o CG.

Outra explicação para a diferença nos resultados pode estar relacionada à ação de cada tipo de medicação e à duração do tratamento medicamentoso. Considerando-se que as alterações nos tecidos gengivais de pacientes sob terapia medicamentosa (anticonvulsivantes, imunodepressores e BCC) estão associadas aos efeitos respectivos de cada droga sobre o tecido periodontal de proteção, Ellis *et al.* (1999) sugerem que, apesar do mecanismo etiopatogênico do CG ser multifatorial, a interação célula-droga pode ser o pivô na etiopatogenia deste efeito.

Quando avaliada a ação da droga sobre os tecidos gengivais, observa-se diferença sobre a população de MCs. No presente estudo, analisando o efeito da nifedipina sobre os tecidos gengivais, notou-se um significativo aumento no número de MCs em relação ao tecido gengival saudável. O estudo de Asahara *et al.* (2000) foi realizado em camundongos, os quais não mostraram alteração na densidade MCs sob efeito da ciclosporina por 30 dias. Em contrapartida, Nurmenniemi *et al.* (2004) verificaram diminuição numérica dos MCs em tecido gengival sob ação da ciclosporina (duração da terapia ≥ 30 meses). Uma vez que o CG induzido por medicação é um processo multifatorial, drogas com mecanismos de ação diferentes possuem diferentes efeitos sobre as populações de MCs, justificando os resultados contraditórios.

Quanto à ação da nifedipina nos tecidos gengivais, nossos dados demonstram que este BCC está associado ao aumento da população de MCs. Provavelmente este aumento resulta em uma maior concentração dos

mediadores químicos liberados pelos MCs. Observamos na nossa análise microscópica, maior predominância de MCs fusiformes, com grânulos evidentes no meio extracelular, sugerindo desgranulação. Esta maior atividade parece estar relacionada a um possível efeito da nifedipina, levando a um aumento da liberação de citocinas e mediadores químicos que atuam no crescimento dos queratinócitos, na fibrose e na angiogênese (GRIMBALDESTON *et al.*, 2006).

Corroborando com nossos dados, Ellis *et al.* (1999) sugerem que o perfil físico-químico da nifedipina aumenta a interação célula-droga nos tecidos gengivais, o que poderia explicar a prevalência do CG ser maior nos usuários de nifedipina entre as drogas BCC.

Quando avaliada a duração do tratamento medicamentoso com a nifedipina, os resultados também produziram conclusões divergentes em relação à duração. Nosso estudo avaliou os MCs em tecidos sob terapia crônica com nifedipina durante 50 meses, em média. Nurmenniemi *et al.* (2004) avaliaram pacientes sob terapia com nifedipina (duração da terapia=18 meses), pacientes sob terapia com ciclosporina (duração da terapia= 30 meses) e pacientes sob terapia associada com nifedipina e ciclosporina (duração da terapia= 47 meses). Os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as subpopulações de MCs no grupo sob terapia com nifedipina, no entanto foi descrita diminuição numérica dos MCs no grupo sob uso da ciclosporina. Esta diferença observada no grupo sob uso de ciclosporina, pode estar relacionada ao maior período de duração da terapia medicamentosa. Da mesma forma, o resultado negativo observado no grupo sob uso da nifedipina foi atribuído pelos autores, à pequena duração de tempo no uso deste BCC. Entretanto, nosso estudo mostrou aumento significativo da densidade de MCs no grupo nifedipina

($P=0,02$, Mann-Whitney), mesmo se observando correlação significativa entre o aumento da densidade dos MCs e a duração da terapia com nifedipina ($P=0,08$, correlação de Pearson), o que nos leva a inferir que a duração do tratamento medicamentoso não é um fator crucial no desencadeamento das alterações nas populações de MCs no CG.

Em resumo, nossos resultados demonstram que o número de MCs é mais elevado nos tecidos gengivais sob ação da nifedipina do que no tecido gengival clinicamente saudável; no entanto, a maior densidade destas células não está correlacionada com maior grau de colagenização, com um aumento da angiogênese, com a dose e nem com a duração da terapia com nifedipina.

Tendo como base nossos resultados e os estudos prévios, podemos sugerir que o aumento na densidade de MCs, nos tecidos gengivais de pacientes sob terapia com nifedipina, pode representar um possível efeito da medicação antihipertensiva sobre a ativação destas células, contribuindo para a progressão do crescimento gengival.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- O uso crônico de nifedipina está associado a alterações subclínicas no tecido gengival: cristas epiteliais alongadas, áreas com grande quantidade de colágeno e presença de vasos sanguíneos congestos.
- Houve aumento significativo na densidade de mastócitos no grupo nifedipina, quando comparado ao grupo controle.
- Não houve correlação entre o aumento na densidade de mastócitos e o grau de colagenização e de vascularização, no grupo nifedipina.
- Não foi observada correlação entre a densidade de mastócitos e a dose ou a duração do tratamento com nifedipina.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allanore, Y.; Borderie, D. & Lemaréchal, H. (2004) Nifedipine decreases sVCAM-1 concentrations and oxidative stress in systemic sclerosis but does not affect the concentrations of vascular endothelial growth factor or its soluble receptor 1. *Arthritis Res. Ther.* 6:R309-R314.
- Angelopoulos, A. P. (1973). Studies of mast cells in the human gingiva. *J. Periodont. Res.* 8:28-36.
- Artuc, M.; Steckelings, M. & Henz, B. M. (2002) Mast cell-fibroblast interactions: human mast cells as source and inducers of fibroblast and epithelial growth factors. *J. Invest. Dermatol.* 118:391-395.
- Asahara, Y.; Nishimura, F. & Yamada, H. (2000). Mast cells are not involved in the development of cyclosporin A-induced gingival hyperplasia: A study with mast cell-deficient mice. *J Periodontol.* 71:1117-1120.
- Bacal, F.; Lima, M. G. & Manrique, R. (1999). Rejeição. *Arq. Bras. Cardiol.* 73:suplemento V.
- Barnett, M. L. (1973a) The fine structure of human epithelial mast cells in periodontal disease. *J. Periodont. Res.* 8:371-380.
- Barnett, M. J. (1973b) The fine structure of human connective tissue mast cells in periodontal disease. *J. Periodont. Res.* 9:84-91.
- Batista, A. C.; Rodini, C. O. & Lara, V. S. (2005). Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. *Oral Dis.* 11:249-254.
- Bellini, B. S. (2003) Tratamento de hiperplasia gengival com laser de CO₂: conceitos e técnica conservadora. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. 138 p.

- Benitez-Bribiesca, L.; Wong A. & Utrera, D. (2001). The role of mast cell tryptase in neoangiogenesis of premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *J. Histochem Cytochem.* 49:1061-1062.
- Bonnaure-Mallet, M.; Tricot-Doleux, S. & Godeau, G. J. (1995). Changes in extracellular matrix macromolecules in human gingiva after treatment with drugs inducing gingival overgrowth. *Archs. Oral. Biol.* 40:393-400.
- Breschi, L.; Montebugnoli, L. & Bernardi, F. (2000). Cyclosporin A upregulates phospholipase C β 1 in fibroblasts from gingival overgrowth. *J Peridontol.* 71:1722-1728.
- Brito, A. N. M.; Andrade, M. O. & Pereira, T. M. M. (2005). A importância das proteínas fosfatases nos linfócitos humanos. *NewsLab.* 69:102-108.
- Bulut, S.; Uslu, H. & Özdemir, B. H. (2006). Analysis of proliferative activity in oral gingival epithelium in immunosuppressive medication induced gingival overgrowth. *Head & Face Med.* 2:13. Acesso em: 02/07/2007. Disponível em: <http://www.head-face-med.com./content/2/1/13>
- Castro, L. A. (2006). Análise microscópica e da imunoexpressão dos marcadores de proliferação celular ki-67 e ciclina B1 no epitélio gengival de pacientes sob terapia com nifedipina. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás. 78p.
- Chugunova, E. (2004). Biological function of mast cell chymase mMCP-4. *In vitro* and *in vivo* studies: a thorny pathway. Tese de Doutorado, Universidade Sueca de Ciências Agrícolas. 51p.
- Clocheret, K.; Dekeyser, C. & Carels, C. (2003). Idiopathic gingival hyperplasia and orthodontic treatment: a case report. *J. Orth.* 30:13-19.

- Correa, F. O. B. (2004). Influência do diltiazem sobre o tecido gengival. Estudo histológico e histométrico em ratos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista. 131p.
- Das, S. J. & Olsen, I. (2000). Keratinocyte growth factor is upregulated by the hyperplasia-inducing drug nifedipine. *Cyt.* 13:1566-1569.
- Djemileva, T.; Yanchev, I. & Boliarova, T. (1999). Nifedipine-induced gingival hyperplasia – pathohistological studies. *Exper. Pathol. Parasit.* 3:49-54.
- Duarte, M. E. L.; Peixoto, A. L. P. & Pacheco, A. (1999). Hiperplasia de mastócitos na oxalose óssea. *Rev. Ass. Med. Brasil.* 45:95-98.
- Dummett, C. O.; Bolden, T. E. & Ashhurst, J. C. (1961). Mast-cell density in diphenylhydantoin sodium gingival hyperplasia. *J. D. Res.* 40:921-928.
- Ellis, J. S.; Seymour, R. A. & Steele, J. G. (1999). Prevalence of gingival overgrowth induced by calcium channel blockers: a community-based study. *J Periodontol.* 70:63-67.
- Eslami, M.; Baghali, F. & Jalayer, N. N. (2004). An investigation on gingival hyperplasia induced by nifedipine. *J. Dent.* 1:33-37.
- Ferreira, G. L. S.; Minco, J. R. & Oliveira, J. G. (2004). *Toxoplasma gondii* and mast cell interactions *in vivo* and *in vitro*: experimental infection approaches in *Calomys callosus*. *Mic. and Inf.* 6:172-181.
- Figueiredo, M. C. & Parra, S. L. N. (2002). Aspectos normais da membrana periodontal e osso alveolar. Acesso em: 20/06/2007. Disponível em: <http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=205>
- Flynn, J. C.; Henderson, J. S. & Johnson, R. B. (2006). Synergism between nifedipine and cyclosporine A on the incorporation of (³⁵S)sulfate into human gingival fibroblast cultures *in vitro*. *J. Periodont. Res.* 41:316-321.

- Fujimori, Y.; Maeda, S. & Sacki, M. (2001). Inhibition by nifedipine of adherence- and activated macrophage-induced death of human gingival fibroblasts. *Europ. J. Pharmacol.* 415:95-103.
- Glickman, I. & Dines, M. M. (1963). Effect of increased ascorbic acid blood levels in the ascorbic acid level in treated and non-treated gingiva. *J. Dent. Res.* 42:1152-1158.
- Gnoatto, N. (2005). Expressão de proteoglicanos sulfato de superfície celular no crescimento gengival induzido pela ciclosporina-A em humanos. Tese de Doutorado, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo. 117p.
- Grimbaldeston, M. A.; Finlay-Jones, J. & Hart, P. H. (2006). Mast cells in photodamaged skin: what is their role in skin cancer? *Photochem. Photobiol. Sci.*,5:177-183.
- Groover, V; Kapoor, A & Marya, C. M. (2007). Amlodipine induced gingival hyperplasia. *J. Oral. Health. Comm. Dent.* 1:19-22.
- Günhan, M.; Bostanci, H. & Günhan, Ö. (1991). Mast cells in periodontal disease. *Ann. Dent.* 50:25-29.
- Hassel, T. M.; Page, R. C. & Narayanan, A. S. (1976). Diphenylhydantoin (Dilantin) gingival hyperplasia: Drug-induced abnormality of connective tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:2909-2912.
- Hassell, T. M. & Hefti, A F. (1991). Drug-induced gingival overgrowth: old problem, new problem. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 2:103-137.
- Hattori, T. & Wang, P. L. (2004). Inhibition by tranilast of nifedipine-induced proliferation of cultured human gingival fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.* 498:79-81.
- Ishida, H. *et al.* (1995). Factors influencing nifedipine – induced gingival overgrowth in rats. *J. Periodontol.* 66:345-350. *apud* Correa, F. O. B. (2004).

Influência do diltiazem sobre o tecido gengival. Estudo histológico e histométrico em ratos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista. 131p.

James, J. A.; Marley, J. J. & Jamal, S. (2000). The calcium channel blocker used with cyclosporin has no effect on gingival overgrowth. *J. Clin. Periodontol.* 27:109-115.

Johnson, R. B. (2003). Synergistic enhancement of collagenous protein synthesis by human gingival fibroblasts exposed to nifedipine and TNF-alpha *in vitro*. *J. Oral. Pathol. Med.* 32:408-413.

Kankkunen, J. *et al.* (1997). Quantitative analysis of tryptase and chymase containing mast cells in benign and malignant breast lesions. *Int J Câncer.* 72:385-388. *apud* Benitez-Bribiesca, L.; Wong A. & Utrera, D. (2001). The role of mast cell tryptase in neoangiogenesis of premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *J. Histochem Cytochem.* 49:1061-1062.

Kanno, C. M. (2006). Efeitos da ciclosporina, fenitoína e nifedipina sobre a síntese e degradação de colágeno da gengiva de macacosprego (*cebus apella*). Estudo histoquímico e através de RT-PCR. Tese de Doutorado, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 75p.

Kataoka, M.; Shimizu, Y. & Kunikiyo, K. (2001). Nifedipine induces gingival overgrowth in rats through a reduction in collagen phagocytosis by gingival fibroblasts. *J. Periodontol.* 72:1078-1083.

Kataoka, M.; Kido, J. I. & Shinohara, Y. (2005). Drug-induced gingival overgrowth – a review. *Biol. Pharm. Bull.* 28:1817-1821.

- Kennett, C. N.; Cox, S. W. & Eley, B. M. (1993). Comparative histochemical and biochemical studies of mast cell tryptase in human gingiva. *J. Periodontol.* 64:870-877.
- Kimball, O. P. (1939). The treatment of epilepsy with sodium diphenylhydantoinate. *JAMA.* 112:1244-5. *apud* Ramalho, V. L. C.; Ramalho, H. J. & Cipullo, J. P. (2003). Hiperplasia gengival induzida por ciclosporina A. *Rev Assoc Med Bras.* 49:210-3.
- Kondo, S.; Kagami, S. & Kido, H. (2001).. Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12:1668-1676.
- Lederman, D. *et al.* (1984). Gingival hyperplasia associated with nifedipine therapy. *Oral. Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 57:620-622. *apud* Marshall, R. I. & Bartold, P. M. (1998). Medication induced gingival overgrowth. *Oral. Dis.* 4:130-151.
- Leggott, P. J.; Robertson, P. B. & Jacob, R. A. (1991). *J. Dent. Res.* 70:1531-1536.
- Linden, G. J.; Haworth, S. E. & Maxwell, P. (2001). The influence of transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms on the severity of gingival overgrowth associated with concomitant use of cyclosporin A and a calcium channel blocker. *J. Periodontol.* 72:808-814.
- Lins, R. D. A. U.; Maciel, M. N. C. & Cruz, J. G. G. (2005a). Crescimento gengival induzido por drogas. Parte I: etiopatogenia- conceitos atuais. *RBPO.* 4. Acesso em: 02/07/2007. Disponível em:<http://www.patologiaoral.com.br/texto86.asp>.
- Lins, R. D. A. U.; Maciel, M. N. C. & Cruz, J. G. G. (2005b). Crescimento gengival induzido por drogas. Parte II: aspectos clínicos e histopatológicos – uma revisão.

RBPO. 4. Acesso em 02/07/2007. Disponível em:

<http://www.patologiaoral.com.br/texto110.asp>.

Marshall, R. I. & Bartold, P. M. (1998). Medication induced gingival overgrowth. Oral. Dis. 4:130-151.

Martelli-Junior, H.; Bolzani, G. & Graner, E. (2000). Comparação microscópica e proliferativa de fibroblastos gengivais de pacientes com gengiva normal e com fibromatose gengival hereditária. Pesq Odont Bras. 14:123-129.

Mason, G. J.; Hamburger, J. & Mathews, J. B. (2000). Mast cells, extracellular matrix components, TGF β isoforms and TGF β receptor expression in labial salivary glands in systemic sclerosis. Ann. Rheum. Dis. 59:183-189.

Meisel, P.; Giebel, J. & Kunert-Keil, C. (2006). MDR1 gene polymorphisms and risk of gingival hyperplasia induced by calcium antagonists. Clin. Pharmacol. Ther. 79:62-71.

Meraw, S. J. & Sheridan, P. J. (1998). Medically induced gingival hyperplasia. Mayo Clin Proc. 73:1196-1199.

Miranda, J.; Brunet, L. & Roset, P. (2001). Prevalence and risk of gingival enlargement in patients treated with nifedipine. J Periodontol. 72:605-611.

Morisaki, I.; Fukui, N. & Fujimori, Y. (2000). Effects of combined oral treatments with cyclosporine A and nifedipine or diltiazem on drug-induced gingival overgrowth in rats. J. Periodontol. 71:438-443.

Nishida, M.; Grossi, S. G. & Dunford, R. G. (2000). Dietary vitamin C and risk for periodontol disease. J. Periodontol. 71:1212-1223.

Nishimura, F.; Naruishi, H. & Naruishi, K. (2002).. Cathepsin-L, a Key molecule in the pathogenesis of drug-induced and I-cell disease-mediated gingival overgrowth. Am. J. Pathol. 161:2047-2052.

- Nurmenniemi, P. K.; Pernu, H. & Laukkanen, P. (1999). Density of CD 1a-labeled Langerhans cells in normal human gingiva and in nifedipine- and immunosuppressive medication-induced gingival overgrowth. *J Periodontol.* 70:752-756.
- Nurmenniemi, P. K.; Pernu, H. E. & Knuutila, M. L. E. (2001). Mitotic activity of keratinocytes in nifedipine- and immunosuppressive medication- induced gingival overgrowth. *J Periodontol.* 72:167-173.
- Nurmenniemi, P. K.; Pernu, H. E. & Laukkanen, P. (2002). Macrophage subpopulations in gingival overgrowth induced by nifedipine and immunosuppressive medication. *J Periodontol.* 73:1323-1330.
- Nurmenniemi, P. K.; Pernu, H. E. & Laukkanen, P. (2004). Mast cell subpopulations in gingival overgrowth induced by immunosuppressive and nifedipine medication. *J. Periodontol.* 75:933-8.
- Nurmenniemi, P. (2006). Inflammatory cells and mitotic activity of keratinocytes in gingival overgrowth induced by immunosuppressive-and nifedipine medication. *Acta Univ. Oul. D.* 869:77.
- Ogino, M.; Kido, J. & Bando, M. (2005). $\alpha 2$ Integrin +807 polymorphism in drug-induced gingival overgrowth. *J. Dent. Res.* 84:1183-1186.
- Oliveira-Neto, H. H.; Leite, A. F.& Costa, N. L. (2007). Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: possible failure in the migration of these cells. *Oral Oncol.* 43:484-490.
- Ozaki, Y.; Kunimatsu, K. & Tajiri, K. (1998). Role of medullasin in nifedipine-induced gingival overgrowth in rats. *Arc. Oral Biol.* 43:801-810.

- Patella, V.; Marinò, I. & Arbustini, E. (1998). Stem cell factor in mast cells and increased mast cell density in idiopathic and ischemic cardiomyopathy. *Circ.* 97:971-978.
- Pernu, H. E. & Knuutila, M. L. E. (2001). Macrophages and lymphocyte subpopulations in nifedipine- and cyclosporin A- associated human gingival overgrowth. *J Periodontol.* 72:160-166.
- Pinheiro, S. W. (2006). Avaliação comparativa do número de mastócitos na musculatura circular do esôfago e do cólon de chagásicos crônicos com e sem mega. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Triângulo Mineiro. 82p.
- Queiroga, F. & Lopes, C. (2002). Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. *RPCV.* 97:119-127.
- Ramalho, V. L. C.; Ramalho, H. J. & Cipullo, J. P. (2003). Hiperplasia gengival induzida por ciclosporina A. *Rev Assoc Med Bras.* 49:210-3.
- Rateitschak-Pluss, E. M. *et al.* (1983). Initial observation that cyclosporine therapy. *J Clin Periodontol.* 10:237-246. *apud* Ramalho, V. L. C.; Ramalho, H. J. & Cipullo, J. P. (2003). Hiperplasia gengival induzida por ciclosporina A. *Rev Assoc Med Bras.* 49:210-3.
- Resende, M. M. & Mill, J. G. (2002). Vias alternativas de produção de angiotensina II e sua importância em condições fisiológicas ou fisiopatológicas. *Arq Bras Cardiol.* 78:425-31.
- Ribatti, D.; Finato, N. & Crivellato, E. (2005). Neovascularization and mast cells with tryptase activity increase simultaneously with pathologic progression in human endometrial câncer. *Am. J. Obs. Gyn.* 193:1961-1965.

- Ribatti, D.; Belloni, A. & Nico, B. (2007). Tryptase- and leptin-positive mast cells correlate with vascular density in uterine leiomyomas. *Am. J. Obs. Gyn.* 196:470-477.
- Rodini, C. O.; Batista, A. C. & Lara, V. S. (2004). Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 97:59-63.
- Rodini, C. O. (2005). Doença periodontal inflamatória induzida por ligadura: caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteinases -2 e -9. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 165p.
- Romito, O, G. A. (2000). Associação entre crescimento gengival e a condição clínica e microbiológica de pacientes transplantados cardíacos submetidos à terapia com ciclosporina-A. Estudo transversal. Dissertação de Doutorado, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo. 87p.
- Saito, K.; Mori, S. & Tanda, N. (1999). Expression of p53 protein and ki-67 antigen in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J Periodontol.* 70:581-586.
- Saito, K. *et al.* (1996). Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta, basic fibroblastic growth factor and heparan sulfate glycosaminoglycan in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J. Periodontol Res.* 31:545-555. *apud* Saito, K.; Mori, S. & Tanda, N. (1999). Expression of p53 protein and ki-67 antigen in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J Periodontol.* 70:581-586.

- Saito, K.; Mori, S. & Tanda, N. (2000). Immunolocalization of c-Myc and bcl-2 proto-oncogene products in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J. Periodontol.* 71:44-49.
- Sato, N.; Matsumoto, H. & Akimoto, Y. (2005). The effect of IL-1 α and nifedipine of cell proliferation and DNA synthesis in cultured human gingival fibroblasts. *J. Oral Sci.* 47:105-110.
- Shimizu, Y.; Kataoka, M. & Seto, H. (2002). Nifedipine induces gingival epithelial hyperplasia in rats through inhibition of apoptosis. *J Periodontol.* 73:861-867.
- Sköld, C. M.; Liu, X. & Umino, T. (1999). Human neutrophil elastase augments fibroblast-mediated contraction of released collagen gels. *Am. J. Respi. Crit. Care Med.* 159:1138-1146.
- Soory, M. & Suchak, A. (2001). The effects of human mast-cell products and of phenytoin on androgen 5 α -reductase expression in human gingival fibroblasts. *Ar. Oral Biol.* 46:847-855.
- Sousa, C. P. (2002). Avaliação clínica do crescimento gengival em pacientes sob terapia com nifedipina. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista. 96p.
- Takeshita, K.; Hayashi, M. & Lino, S. (2004). Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cardiomyocytes contributes to cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Am. J. Pathol.* 164:449-456.
- Tanizaki, Y.; Komagoc, H. & Sudo, M. (1983). Inhibitory effect of the CA²⁺ antagonist nifedipine on histamine release from rat peritoneal mast cells. *Acta Med. Okayama.* 37:207-211.
- Taylor, A. C. (1971). Collagenolysis in cultured tissue: II. Role of mast cells. *J. Dent. Res.* 50:1301-1306.

- Todaro, F. (1938). Osservazioni sulla presenza e sulle variazioni delle Mastzellen nella gengiva con dente sano e con dente cariato. Atti. Accad. Peloritana Messina. 40:292-296, *apud* Angelopoulos, A. P. (1973). Studies of mast cells in the human gingiva. J. Periodont. Res. 8:28-36.
- Trackman, P. C. & Kantarci, A. (2004). Connective tissue metabolism and gingival overgrowth. Crit Rev Oral Biol Med. 15:165-175.
- Trautmann, A.; Krohne, G. & Bröcker, E. R. (1998). Human mast cells augment fibroblast proliferation by heterotypic cell-cell adhesion and action of IL-4. J. Imm. 160:5053-5057.
- Tuna, B.; Yorukoglu, K. & Unlu, M. (2006). Association of mast cells with microvessel density in renal cell carcinomas. Eur. Ass. Uro. 50:530-534.
- Ueda, E. K. M. (2006). Prolactina humana pseudofosforilada (S179D-hPRL) é um potente fator angiogênico *in vitro* e *in vivo*. Tese de Doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. 152p.
- Walls, A.; Jones, D. B. & Williams, J. H. (1990). Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase. J. Pathol. 162:119-126.
- Walsh, L. J.; Xu, L. J. & Savage, N. W. (1995). Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. J. Oral. Pathol. Med. 24:266-272.
- Walsh, L.J. (2003). Mast cells and oral inflammation. Crit Rev Oral Biol Med, 14:188-198.
- Wilcox, E. & Grimes, M. (1963). Gingivitis-ascorbic acid deficiency in the Navajo. I. Ascorbic acid in with cell-platelet fraction of blood. J. Am. Diet Assoc. 43:331-335.

APÊNDICES

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

Você está sendo convocado como voluntário para uma nova pesquisa. Para tanto, é necessário que você autorize a utilização das amostras de sua gengiva obtidas a partir de uma pesquisa anterior em que você foi voluntário. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste novo estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás pelos telefones 3227-1071.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Avaliação da densidade de mastócitos em tecido gengival de pacientes sob terapia com nifedipina: possível relação destas células com a angiogênese e com a colagenização

Pesquisador Responsável: Annelise Carrilho Corrêa de Castro

Telefone para contato: 32813001

Orientadora: Dra Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer - UCG

Co-Orientadores: Dr Elismauro Francisco de Mendonça – FO/UFG

Dra Aline Carvalho Batista – FO/UFG

Telefones para contato:32812929

OBJETIVOS: Esta pesquisa tem por objetivo analisar através de exames de laboratório, as alterações que ocorrem dentro do tecido gengival das pessoas que usam nifedipina. O objetivo final é contribuir para o esclarecimento sobre o efeito das medicações na gengiva, e, conseqüentemente, trazer mais informações que possam ajudar no desenvolvimento de novas alternativas de tratamento.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO: Se concordar em participar da pesquisa, não haverá de forma alguma procedimento cirúrgico. Para a realização deste estudo, será necessária apenas sua autorização para a utilização das amostras de gengiva obtidas pelo pesquisador Luciano Alberto de Castro, quando da sua participação como sujeito em 2005/6 na pesquisa “Análise imunoistoquímica da expressão dos marcadores ki 67 e ciclina B1 no epitélio gengival de pacientes sob terapia com nifedipina”. A utilização da amostra da sua gengiva nesta pesquisa será unicamente para este estudo.

RISCOS E DESCONFORTOS: Este estudo não causará nenhum risco previsível à sua saúde, ou desconforto. Você não será submetido a nenhuma cirurgia bucal, nem será removido nenhum pedaço da sua gengiva.

BENEFÍCIOS: Em decorrência da sua participação na pesquisa, você estará contribuindo para o avanço técnico-científico, uma vez que a sua participação através do consentimento do uso da gengiva retirada anteriormente, vai permitir o desenvolvimento deste novo estudo, contribuindo assim para o entendimento de como o crescimento gengival se inicia e, conseqüentemente, a melhoria de novas formas de tratamento para esta complicação funcional e estética.

CUSTO E REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE: Os voluntários da pesquisa não irão arcar com nenhum gasto decorrente da sua participação. Da mesma forma, a participação na pesquisa não irá implicar em hipótese alguma em qualquer espécie de reembolso ou gratificação.

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: Os voluntários participantes da pesquisa terão garantia de sigilo, assegurando a privacidade de cada indivíduo quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa, ficando claro que serão divulgados somente os dados diretamente relacionados aos objetivos da pesquisa.

Assinatura do pesquisador:

Data: ____/____/____

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG
no _____ CPF no _____ no de
prontuário _____ no de matrícula _____, abaixo
assinado, concordo em participar da pesquisa, Avaliação da densidade de
mastócitos em tecido gengival de pacientes sob terapia com nifedipina: possível
relação destas células com a angiogênese e com a colagenização, como sujeito.
Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Annelise Carrilho
Corrêa de Castro sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim
como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me
garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que
isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu
acompanhamento/assistência/tratamento.

Goiânia, _____ de _____ de _____

Nome do sujeito: _____

Assinatura do sujeito: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa
e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas:

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____

ANEXO II

INFORMAÇÕES GERAIS CONTIDAS NAS FICHAS CLÍNICAS

Quadro 2. Dados referentes aos pacientes usuários de nifedipina (grupo nifedipina)

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Dose diária (mg)	Duração (meses)
Nifedipina 1	M	44	20	30
Nifedipina 2	F	69	40	24
Nifedipina 3	F	67	40	60
Nifedipina 4	F	67	20	72
Nifedipina 5	F	39	40	24
Nifedipina 6	F	41	40	24
Nifedipina 7	F	62	40	36
Nifedipina 8	F	56	40	144
Nifedipina 9	M	57	40	12
Nifedipina 10	M	71	20	96
Nifedipina 11	F	64	40	72
Nifedipina 12	F	37	40	36
Nifedipina 13	F	48	10	15
Nifedipina 14	M	64	40	60
Controle 1	M	47	-	-
Controle 2	M	50	-	-
Controle 3	M	35	-	-
Controle 4	F	33	-	-
Controle 5	F	28	-	-
Controle 6	F	24	-	-
Controle 7	M	48	-	-
Controle 8	M	51	-	-
Controle 9	F	44	-	-

ANEXO III

Solução de Picrosírius ou Normat

Produto	Quantidade
Vermelho da Síria	1 g
Água Destilada	100 ml
Ácido Pícrico Saturado	$\pm 1,29\%$

ANEXO IV

Solução de TBS (Receita FO/USP), pH 7,2-7,4

Produto	Quantidade
Água Destilada	2 L
TRIS	11,7g
NaCl	17g
Triton X-100	2 gotas

ANEXO V

Tampão Citrato (Receita FO/USP), pH 6,0

Produto	Quantidade
Ácido Cítrico	1,152 g
Água Destilada	600 mL