



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – ESTOMATOLOGIA

ANÁLISE DO CONTINGENTE DE MASTÓCITOS EM LESÕES INFLAMATÓRIAS
BUCAIS

Kariza Vargens Diniz Correia

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Alena Peixoto Medrado

SALVADOR

2012

KARIZA VARGENS DINIZ CORREIA

**ANÁLISE DO CONTINGENTE DE MASTÓCITOS EM LESÕES INFLAMATÓRIAS
BUCAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito para obtenção do título de Mestre em Estomatologia.

**Orientadora: Prof^a Dr^a Alena Peixoto
Medrado**

SALVADOR – BA

2012

KARIZA VARGENS DINIZ CORREIA

ANÁLISE DO CONTINGENTE DE MASTÓCITOS EM LESÕES INFLAMATÓRIAS
BUCAIS

Comissão Examinadora

Membros titulares

Dr^a Marcia Maria Souza

Pesquisadora Visitante do Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Pesquisa
Gonçalo Moniz-FIOCRUZ

Doutora em Patologia Humana

Dr^a Gabriela Botelho Martins

Professora Adjunto do Departamento de Biofunção do Instituto de Ciências da Saúde - UFBA

Doutora em Estomatologia Clínica

Dr^a. Silvia Regina de Almeida Reis

Professora Adjunto do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Doutora em Patologia Humana

Membro Suplente

Dr. Antônio Márcio Marchionni

Professor Adjunto do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Doutor em Laser

**SALVADOR
2012**

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

O projeto foi desenvolvido nas dependências da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública e para a realização da técnica de imuno-histoquímica, contou-se com a colaboração do Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ).

**À minha mãe,
minha incentivadora.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente na minha caminhada me concedendo força para esta conquista, sem esta força nada disso seria possível.

À minha mãe, pelo apoio e incentivo para vencer mais esta etapa, meu exemplo de vida, meu estímulo constante, minha fonte de energia, compartilhando meus altos e baixos.

Aos meus irmãos Kênia e Esdras, pela confiança transmitida e pelo apoio fraterno.

Aos meus tios Marcos e Maritê pelo acolhimento, apoio e disponibilidade.

À orientadora, Prof^a. Dr^a Alena, pelos ensinamentos passados, pelo carinho, pela amizade. Sua compreensão ultrapassou a Kariza orientanda, atingiu a aluna, a profissional, a filha, a amiga... Verdadeiramente, Obrigada.

À co-orientadora, Dr^a Silvia Reis, pela paciência e apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia por ter me acolhido como aluna e a todos os funcionários da instituição por ter suportado às minhas queixas.

Ao Prof^o Urbino Tunes pela atenção e disposição em me escutar sempre que eu precisei.

Ao Prof^o Miguel Setúbal que se disponibilizou e contribuiu para a realização da pesquisa.

À Prof^a Gabriela Martins pela amizade, compreensão e principalmente pelo estímulo em um momento de fraqueza minha.

Ao Prof^o Arlei Cerqueira que se tornou meu “orientador amigo”, sempre com sua calma e paciência.

A todos os professores da Bahiana pelo carinho.

Ao Dr^o Zilton Andrade, por ter aberto as portas do Laboratório de Patologia Experimental - FIOCRUZ e me acolhido.

A todos os funcionários do Lapex pelo acolhimento e alegria na condução dos experimentos, obrigada a vocês meus novos amigos Tininha, Sr^o Antônio, Leninha, Manuela, Prof^a Marcia.

À minha turma de mestrado que foi única e especial por todos os momentos de riso e choro, com cada uma dessas novas amigas aprendi, compartilhei, vivi... Começamos nossa amizade neste mestrado e ela vai perdurar para além!

Aos amigos e colegas de profissão de Vitória da Conquista pelo convívio, pela ajuda e compreensão da minha ausência.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu êxito profissional.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bFGF: fator de crescimento fibroblástico básico

EBMSP: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

ELISA: Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

HE: hematoxilina-eosina

ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1

IL: interleucina

MC: mastócito

PCR: reação em cadeia da polimerase

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

PAR-2: receptor de ativação da protease

TGF β : fator de crescimento transformador beta

TNF α : fator de necrose tumoral alfa

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

	Página
INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS.....	iii
DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vi
INTRODUÇÃO GERAL.....	8
MANUSCRITO 1.....	9
MANUSCRITO 2.....	23
ANEXO I.....	44
ANEXO II.....	45

INTRODUÇÃO GERAL

Tem sido relatada a participação de mastócitos em reações de hipersensibilidade, alterações vasculares presentes no processo inflamatório a exemplo da vasodilatação e angiogênese, formação do tecido de granulação e biossíntese do colágeno durante a cicatrização de ferimentos, entre outros processos patológicos^{R2, R6} ¹. Ademais, a interação fibroblasto/mastócito descrita na literatura possibilita a estas células desempenharem um papel-chave na deposição de colágeno no interstício, em particular, nas lesões inflamatórias da mucosa oral e em outras patologias de natureza inflamatória^{R2, R19}.

Uma alta prevalência de lesões inflamatórias bucais tem sido observada entre as quais destacam-se a hiperplasia fibrosa e o granuloma piogênico em tecidos moles e o granuloma periapical e o cisto radicular como lesões intra-ósseas. No entanto, procede a escassez de trabalhos científicos que contemplem a participação dos mastócitos nos fenômenos vasculares e no processo de fibroplasia normalmente visualizado nestas patologias. Sendo assim, o presente estudo intenciona avaliar a população de mastócitos presentes no tecido conjuntivo das lesões citadas e correlacionar o seu quantitativo com o grau de colágeno presente no interstício e com a expressão de VEGF, importante fator de crescimento do endotélio. As lesões foram selecionadas devido à sua alta prevalência observada nos laudos histopatológicos do Serviço de Patologia Oral da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), oferecendo assim, não apenas material para a pesquisa, como também uma amostra representativa da realidade clínica.

Neste trabalho são apresentados dois manuscritos. O primeiro trata-se de uma revisão de literatura sobre a participação dos mastócitos no reparo tecidual e lesões inflamatórias bucais. O segundo manuscrito avaliará quantitativamente a população de mastócitos no interstício de quatro lesões inflamatórias bucais, sendo duas de tecido mole, hiperplasia e granuloma piogênico, e duas de tecido duro, granuloma periapical e cisto radicular, e a correlacionará este contingente com os processos de fibroplasia e possível angiogênese.

¹ As citações das referências do manuscrito 1 serão precedidas pela letra R e as citações das referências do manuscrito 2 serão precedidas pela letra P.

MANUSCRITO 1

**PARTICIPAÇÃO DOS MASTÓCITOS NO REPARO
TECIDUAL E EM LESÕES INFLAMATÓRIAS BUCAIS –
UMA REVISÃO DE LITERATURA**

RESUMO

Os mastócitos são células móveis que contêm grânulos, derivados da medula óssea e estão amplamente distribuídos nos tecidos conjuntivos participando ativamente das respostas imunológicas. O envolvimento destas células tem sido demonstrado nos processos de inflamação, angiogênese e fibrose, nos quais atuam por meio de seus produtos de secreção. O objetivo dessa revisão de literatura é abordar o envolvimento dos mastócitos nos fenômenos biológicos que integram o contexto do reparo tecidual, a exemplo da vasodilatação, angiogênese e fibrose, com ênfase na caracterização do perfil destas células em lesões inflamatórias bucais. Apesar de poucos estudos contemplarem a participação dos mastócitos em lesões orais, alguns trabalhos têm demonstrado que tais células estão envolvidas na patogênese de lesões periapicais, ulcerações aftosas recorrentes, cistos odontogênicos, entre outros. O avanço do conhecimento acerca do mecanismo de ação dessas células tem estimulado o desenvolvimento de terapias cujo alvo principal é a regulação dos mediadores químicos liberados pelos mastócitos. Logo, espera-se que através de novas investigações, as desordens inflamatórias da cavidade oral e outras patologias que exibam mastócitos em seu interstício, possam ser melhor compreendidas, em especial no que diz respeito ao papel biológico que estas células poderiam exercer nestas lesões.

Palavras-chaves: Mastócitos, Inflamação, Fibrose, Angiogênese.

1 INTRODUÇÃO

Os mastócitos (MCs) são células grandes derivadas da medula óssea que apresentam um grande número de grânulos citoplasmáticos contendo em seu interior substâncias como histamina, heparina e proteases neutras e exercem uma ação biológica decisiva nos mecanismos de lesão tecidual e defesa imunológica^{1, 2}. Embora sejam provenientes de células sanguíneas indiferenciadas, completam a sua maturação no tecido conjuntivo distribuído pelo organismo e em especial, nas mucosas. São encontrados em áreas perivasculares, bem como no sistema nervoso periférico e central³. Galli^{4, 5, 6}, relata a participação dos MCs na imunidade inata contra a infecção bacteriana e ainda a influência destas células em muitas outras respostas biológicas, incluindo a remodelação do tecido e angiogênese.

Tem sido relatada a participação de MCs em reações de hipersensibilidade, alterações vasculares presentes no processo inflamatório a exemplo da vasodilatação e angiogênese, formação do tecido de granulação e biossíntese do colágeno durante a cicatrização de ferimentos, entre outros processos patológicos^{1, 2}. A participação dessas células em reações anafiláticas relacionadas a alimentos, picadas de insetos ou drogas, faz com que elas degranulem e assim liberem mediadores como a histamina e os produtos da oxidação do ácido aracdônico³.

Os mastócitos produzem uma ampla variedade de mediadores químicos, os quais acham-se relacionados com a proliferação vascular e vasodilatação e são também capazes de modular a inflamação^{2, 7}. Além disso, a interação fibroblasto/mastócito descrita na literatura possibilita a estas células desempenharem um papel-chave na deposição de colágeno no interstício, em particular, nas lesões inflamatórias da mucosa oral e em outras patologias de natureza inflamatória¹. Corroborando esses dados descritos na literatura, Li e Baek⁸ demonstraram que os MCs podem afetar o comportamento funcional dos fibroblastos e, conseqüentemente, o processo de fibrose pela exocitose de mediadores pré-formados como as citocinas fibrogênicas a exemplo do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGFβ) e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF).

Há um papel fundamental dos MCs no desenvolvimento da inflamação na mucosa oral, tanto no início, com eventos vaso-indutivos, quanto na transição da inflamação aguda para crônica⁹. Murata *et al.*¹⁰ verificaram um aumento do número destas células no estágio inicial da epulís e produção de bFGF por tais elementos celulares durante o desenvolvimento da lesão. O melhor

desempenho dos MCs durante a neovascularização do tecido de granulação foi verificado, mas houve uma diminuição da quantidade de MCs quando o processo de fibrose estava acelerado e neste estágio eles estavam localizados somente na periferia do tecido fibroso.

A pluralidade de funções dos MCs, tais como as ações biológicas deflagradas pela liberação da quimase e da triptase que representam enzimas participantes da destruição da membrana basal⁹ e ao mesmo tempo, o seu papel protetor e anti-inflamatório na imunidade inata e adaptativa¹¹, desperta para o fato de que o conhecimento sobre essa célula polêmica precisa ser ampliado.

O objetivo dessa revisão de literatura é abordar o envolvimento dos MCs nos fenômenos biológicos que integram o contexto do reparo tecidual, a exemplo da vasodilatação, angiogênese e fibrose, com ênfase na caracterização do perfil destas células em lesões inflamatórias bucais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mediadores Químicos dos Mastócitos e Ações Biológicas

A diversidade de papéis exercidos pelos MCs se dá devido à sua capacidade de liberação de mediadores químicos. Essas substâncias podem ser agrupadas em três classes distintas como os mediadores pré-formados associados aos grânulos, os mediadores derivados de lipídios e as citocinas^{9, 12, 13}.

A histamina, a única amina vasoativa armazenada nos grânulos de mastócitos humanos, exerce um efeito vasodilatador predominantemente sobre os vasos sanguíneos finos, resultando em aumento da permeabilidade vascular, maior afluxo sanguíneo na microcirculação, queda da resistência periférica total e redução da pressão sanguínea. Adicionalmente, armazenados nos grânulos podem ser encontrados proteoglicanos a exemplo da heparina e proteases, como a quimase e a triptase^{14, 15}. A família das interleucinas é vasta em quantidade e em funções (IL-3, -4, -5, -6, -8, -10, -13 e -16), inclusive na influência na maturação dos próprios MCs¹⁵. O Quadro 1 ilustra a grande diversidade de mediadores químicos sintetizados pelos MCs e suas respectivas ações biológicas.

Adicionalmente, Santos et al.¹⁶ salientaram a relevância do desempenho dos mastócitos descrevendo o seu papel protetor na imunidade inata, e o seu papel pró-inflamatório. Estas ações biológicas, protetora e pró-inflamatória, parecem ser contraditórias. No entanto, esta aparente contradição é um importante fator a ser levado em conta, pois se constitui a principal preocupação de pesquisadores que buscam uma adequada abordagem terapêutica das lesões teciduais nas quais estas células se fazem presentes.

Por conta dos eventos da cascata da angiogênese dependerem de processos complexos que incluem interações célula-célula, várias vias de sinalização intracelular e microambiente extracelular apropriado, ainda é necessário identificar as circunstâncias nas quais os MCs representam uma fonte de fatores angiogênicos *in vivo*⁷. Além de produzir e lançar esses fatores, os MCs são recrutados aos sítios de angiogênese por meio de alguns deles como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), bFGF e outros¹⁷.

Quadro 1: Mediadores químicos encontrados nos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos

MEDIADORES DERIVADOS DE MASTÓCITOS			
Mediadores pré-formados	Aminas	Histamina	Aumento da permeabilidade; estímulo à contração das células da musculatura lisa
	Enzimas	Triptase; Quimase	Degradação da estrutura microbiana; dano/remodelação tecidual Mitógenas para fibroblastos; quimiotáticas para macrófagos
Mediadores produzidos na ativação	Lipídicos	Prostaglandinas	Vasodilatação, broncoconstrição, quimiotaxia de neutrófilos
		Leucotrienos	Broncoconstrição, secreção de muco, aumento de permeabilidade vascular
		Fator ativador de plaquetas	Broncoconstrição, quimiotaxia e ativação de leucócitos, aumento de permeabilidade vascular
	Citocinas	IL-3	Proliferação de mastócitos
		TNF- α	Reação tardia/inflamação
		IL-4, IL-3	Diferenciação de T _H 2
IL-5		Ativação e produção de eosinófilos	

Fonte: Adaptado de Abbas, 2000 e Robbins 2005

Mastócitos humanos expressam constitutivamente VEGF e bFGF, potentes fatores de crescimento angiogênico, os quais são localizados em 97% dos mastócitos triptase positivos no tecido de pulmão humano fibrótico¹⁸. A triptase de MCs é um mitógeno tanto para células epiteliais, estimulando a produção de IL-8 e a expressão de molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), como para células endoteliais microvasculares, induzindo angiogênese e formação de capilares sanguíneos¹⁹.

Ribatti *et al.*²⁰ sugeriram que um número crescente de MCs podem ser recrutados e ativados por mais células malignas do plasma em mieloma múltiplo ativo, e que a angiogênese nesta fase da doença pode ser mediada, ao menos em parte, por fatores angiogênicos contidos nos seus grânulos de secreção.

Os MCs têm sido implicados em várias doenças que exibem concomitantemente o processo de neovascularização e fibrose. A íntima relação anatômica entre MCs e a vasculatura e o aumento da taxa de aparecimento dessas células durante o crescimento tumoral, cicatrização e inflamação, processos que são acompanhados pela neovascularização, ratificam essa associação.

Grützkau *et al.*²¹ verificaram que tanto MCs humanos normais, como os constitutivamente presentes em leucemias expressam VEGF bioativos. Além disso, este estudo contribuiu para a compreensão do papel fisiológico das isoformas de heparina e VEGF, através de dados coletados por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), Western Blot e ELISA.

2.2 Participação de Mastócitos na Fibrose

Muitos estudos têm demonstrado a interação dos MCs com fibroblastos e sua contribuição para a síntese de colágeno em condições patológicas, a exemplo da esclerodermia, fibrose renal e cutânea^{14, 15}. Adicionalmente, os MCs também são encontrados no contexto de várias doenças humanas, tais como a fibrose pulmonar, cirrose hepática e quelóide. Mediadores dos MCs são citados como mitogênicos e quimiotáticos para fibroblastos. É citado na literatura um possível papel dos MCs em síntese aumentada de colágeno e de fibrose na pele induzida por radioterapia^{1, 22, 23, 24}.

Roberts e Brenchley¹⁵ constataram que um aumento do número de MCs é uma característica constante da fibrose renal, independentemente da patologia subjacente. Além disso, verificaram que o número de MCs se correlaciona com o grau de fibrose intersticial. Os autores avaliaram transplantes renais rejeitados e biópsias de pacientes com nefropatias. Foi observada pequena quantidade ou ausência de MCs em rins normais e uma grande quantidade destas células em biópsias de pacientes com nefropatias, sugerindo um possível papel dessas células no processo fibrótico. Resultados inversos foram descritos por Miyazawa *et al.*²⁵, os quais avaliaram o papel dos MCs na fibrose renal através da análise experimental de doença glomerular e constataram que os MCs não desempenharam um papel importante na patogênese da fibrose intersticial em nefrose.

O processo fibrótico pesquisado em rins é caracterizado por um infiltrado inflamatório crônico e pela proliferação de miofibroblastos no interstício. Este processo é conduzido por uma rede de citocinas que inclui fatores de crescimento para miofibroblastos, tais como PDGF, bFGF¹⁵.

Os fibroblastos desenvolvem um importante papel na promoção do crescimento de alguns tipos de células cancerígenas e existem relatos na literatura que abordam a influência de mediadores dos MCs sobre estas células. Por exemplo, Samoszuk *et al.*²⁶ sugeriram que os

MCs em regiões fibrosas de tumores produziriam heparina, a qual suprimiria o crescimento das células tumorais através de um mecanismo indireto envolvendo fibroblastos adjacentes.

2.3 Participação dos Mastócitos em Lesões Bucais

Natah *et al.*²⁷ encontraram MCs no infiltrado inflamatório de ulcerações aftosas recorrentes. Para os autores a presença de MCs na membrana basal dessas lesões não significa que estas células desenvolvam apenas um papel destrutivo. Os autores destacam, de forma semelhante a outros estudos já citados, que os MCs estariam envolvidos no processo de reparo final desse tipo de lesão.

Farahani *et al.*¹ analisando quatro lesões reativas orais (fibroma de irritação, hiperplasia fibrosa inflamatória, granuloma periférico de células gigantes e fibroma ossificante periférico) do arquivo do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia, Iazd - Irã, pesquisaram mastócitos por meio da coloração azul de toluidina e o grau de inflamação por meio de coloração com hematoxilina-eosina e encontraram um número de MCs aumentado nessas lesões em comparação ao tecido gengival normal, obtido em cirurgias de terceiro molar impactado. Além disso, foi observada uma significativa correlação entre o grau de inflamação e a presença destas células.

As lesões orais pesquisadas por Walsh *et al.*^{19, 28} incluíram líquen plano, gengivite, pulpite e inflamação periapical, nas quais também se observou que a presença de MCs representa uma característica histológica comum dessas lesões, sendo empregada a técnica de imunohistoquímica para pesquisa de triptase, quimase e E-seletina liberados quando da degranulação destas células.

Batista *et al.*²⁹ conduziram um trabalho para identificar e quantificar a presença de MCs nos diferentes estágios da doença periodontal em humanos e encontraram um número aumentado dessas células nas lesões de gengivite/periodontite crônicas. Concluiu-se que estas células podem participar tanto dos eventos destrutivos como dos mecanismos de defesa da doença periodontal, através de secreção de citocinas. Achado semelhante foi relatado por Drazic *et al.*³⁰, no estudo com lesões periapicais, no qual foram utilizadas as coloração de Giemsa e coloração imuno-histoquímica com o anticorpo anti-CD 117.

Além da quantificação dos MCs em fibroma de células gigantes e em hiperplasia fibrosa inflamatória, lesões de mucosa oral, Santos *et al.*³¹, pesquisaram o envolvimento dessas

células com a fibrose e a modulação das células endoteliais e verificaram uma possível associação positiva, embora sem significância estatística. Walsh *et al.*^{19, 28} descreveram a evidente participação de MCs na inflamação crônica através da síntese e liberação continuada de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por estas células podendo manter a migração leucocitária e promover cronicidade em lesões inflamatórias, como no líquen plano bucal. No entanto, resultado inverso foi encontrado em uma investigação de cistos odontogênicos, em que nenhuma associação foi obtida entre MCs e inflamação³².

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do observado na literatura, os MCs estão distribuídos nos tecidos conjuntivos de todo o corpo humano, na presença ou ausência de processos patológicos. A participação dessas células nos processos de angiogênese e de fibrose se dá através de mediadores produzidos e lançados por eles quando estimulados pelo microambiente no qual estão localizados. Os MCs desenvolvem importantes papéis em lesões inflamatórias e no reparo, estando, provavelmente, envolvidos na patogênese das lesões inflamatórias periapicais, ulcerações aftosas recorrentes, cistos odontogênicos, entre outros. Diante do exposto, percebe-se a ambiguidade da atividade funcional dos MCs em diferentes contextos, fato este que contribui para estimular o espírito investigativo acerca destas células. A elucidação dos mecanismos pelos quais os MCs verdadeiramente atuam no interstício representam ainda um desafio para a comunidade científica.

ABSTRACT

Mast cells (MCs) are mobile cells that contain granules, derived from bone marrow and are widely distributed in tissues actively participating in immune responses. The involvement of these cells has been demonstrated in the inflammation, fibrosis and angiogenesis, in which they act through their secretory products. The purpose of this literature review is to address the involvement of MCs in biological phenomena that comprise the context of tissue repair, such as vasodilation, angiogenesis and fibrosis, with emphasis on the characterization of the profile of these cells in inflammatory lesions mouth. Although few studies contemplate the participation of MCs in oral lesions, some others have shown that these cells are involved in the pathogenesis of periapical lesions, aphthous ulcers, odontogenic cysts, among others. The advancement of knowledge about the mechanism of action of these cells, has stimulated the development of therapies whose chief aim is the regulation of chemical mediators released by mast cells. Therefore, it is hoped that through further investigations, inflammatory disorders of the oral cavity and other conditions that display interstitial MCs, might be better understood, mainly concern to MCs biological behavior.

Key words: Mast Cell, Inflammation, Fibrosis, Angiogenesis.

REFERÊNCIAS

1. Farahani SS, Navabazam A, Ashkevari FS. Comparison of mast cells count in oral reactive lesions. *Pathology – Research and Practice* 2010; 206: 151–5.
2. Carrera M, Pinho CB, Medrado ARP, Andrade ZA, Reis SRA. Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2010; 98: 188-192.
3. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran – Patologia Bases Patológicas das Doenças. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
4. Galli SJ, Maurer M, Lantz CS. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 1999; 11: 53-9.
5. Galli SJ. Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol*. 2000; 7: 32–9.
6. Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol*. 2008; 9(11): 1215–23.
7. Levi-Schaffer F, Pe'er J. Mast cell and angiogenesis. *Clin.Exp. Allergy* 2001; 31: 521-4.
8. Li CY, Baek JY. Mastocytosis and Fibrosis: Role of Cytokines. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127: 123–6.
9. Walsh LJ. Mast cells and oral inflammation. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med*. 2003; 14: 188–98.
10. Murata M, Hara K, Saku T. Dynamic distribution of basic fibroblast growth factor during epulis formation: an immunohistochemical study in an enhanced healing process of the gingival. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 224-32.
11. Kinet JP. The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. *Immunological Reviews* 2007; 217: 5-7.
12. Gordon JR, Burd PR, Galli SJ. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunology Today* 1990; 11(12): 458-64.
13. Lorentz A, Schwengberg S, Sellge G, Manns MP, Bischoff SC. Human Intestinal Mast Cells Are Capable of Producing Different Cytokine Profiles: Role of IgE Receptor Cross-Linking and IL-4. *J Immunol* 2000;164: 43-8.
14. Wang H-W, Tedla N, Hunt JE, Wakefield D, McNeil HP. Mast cell accumulation and cytokine expression in the tight skin mouse model of scleroderma. *Exp Dermatol* 2005; 14: 295–302.
15. Roberts ISD, Brenchley PEC. Mast cells: the forgotten cells of renal fibrosis. *J Clin Pathol* 2000; 53: 858–62.
16. Santos PPA, Freitas VS, Freitas RA, Pinto LP, Souza LB. Relação entre Mastócitos e Células T na Inflamação. *Odontol. Clín.-Cient*. 2010; 9(3): 215-7.

17. Gruber BL, Marchese MJ, Kew R. Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. *Blood*, 1995; 86(7): 2488-93.
18. Riekkilä R, Harvima IT, Jukkola A, Risteli J, Oikarinen A. The production of collagen and the activity of mast-cell chymase increase in human skin after irradiation therapy. *Exp Dermatol* 2004; 13: 364–71.
19. Walsh LJ, Savage NW, Ishii T, Seymour GJ. Immunopathogenesis of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990; 19: 389-96.
20. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Quondamatteo F, Ria R, Minischetti M, Marzullo A, Herken R, Roncali L, Dammacco F. Bone marrow angiogenesis and mast cell density increase simultaneously with progression of human multiple myeloma. *British Journal of Cancer* 1999; 79(3/4): 451–455.
21. Grützkau A, Krasagakes SK, Baumeister H, Schwarz C, Kögel H, Welker P, et al. Synthesis, Storage, and Release of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor (VEGF/VPF) by Human Mast Cells: Implications for the Biological Significance of VEGF. *Molecular Biology of the Cell*. 1998; 9: 875–84.
22. Oliveira-Neto HH, Leite AF, Costa NL, Alencar RC, Lara VS, Silva TA, *et al.* Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: Possible failure in the migration of these cells. *Oral Oncol*. 2007; 43: 484–90.
23. Parizi ACG, Barbosa RL, Parizi JLS, Nai GA. Comparação entre a concentração de mastócitos em carcinomas espinocelulares da pele e da cavidade oral. *An Bras Dermatol*. 2010; 85(6): 811-18.
24. Carrera M. Influência dos mastócitos na resposta vascular em ferimentos cutâneos submetidos à biomodulação laser. Salvador (Ba): Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública; 2008.
25. Miyazawa S, Hotta C, Doi N, Natori Y, Nishikawa K, Natori Y, Role of mast cells in the development of renal fibrosis: use of mast cell-deficient rats. *Kidney Int*. 2004; 65: 2228–37.
26. Samoszuk M, Kanakubo E, Chan JK. Degranulating mast cells in fibrotic regions of human tumors and evidence that mast cell heparin interferes with the growth of tumor cells through a mechanism involving fibroblasts. *BMC Cancer*. 2005, 5: 121.
27. Natah SS, Häyrynen-Immonen R, Malmström M, Kontinen YT. Quantitative assessment of mast cell in recurrent aphthous ulcers (RAU). *J Oral Pathol Med*. 1998; 27: 124-29.
28. Walsh LJ, Davis MF, Xu LJ, Savage NW: Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. *J Oral Pathol Med*. 1995; 24: 266-72.
29. Batista AC, Rodini CO, Lara VS. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. *Oral Diseases*. 2005; 11: 249–54.
30. Drazic R, Sopta J, Minic AJ. Mast cells in periapical lesions: potential role in their pathogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2010; 39: 257–62.

31. Santos PPA, Nonaka CFW, Pinto LP, Souza LB. Immunohistochemical expression of mast cell tryptase in giant cell fibroma and inflammatory fibrous hyperplasia of the oral mucosa. *Archives of oral biology*. 2011; 56: 231–7.
32. Smith G, Smith AJ, Basu MK. Mast cells in human odontogenic cysts. *J Oral Pathol Med*. 1989; 18: 274-8.

MANUSCRITO 2

**ANÁLISE DO CONTINGENTE DE MASTÓCITOS EM
LESÕES INFLAMATÓRIAS BUCAIS**

RESUMO

Os mastócitos (MCs) são células que contêm grânulos de secreção e acham-se distribuídos no tecido conjuntivo e nas mucosas, especialmente em áreas perivasculares e preferencialmente sobre o leito microvascular na mucosa oral. Objetivou-se quantificar a população de mastócitos intactos e degranulados em lesões inflamatórias bucais através da coloração com azul de toluidina. A análise dos graus de edema e infiltrado linfo-plasmocitário foi realizada em secções coradas com Hematoxilina-Eosina, assim como a expressão de colágeno em secções coradas com sítius vermelho. Foi usado o anticorpo anti-VEGF na técnica de imunohistoquímica para avaliar a expressão deste fator de crescimento em células endoteliais e correlacioná-la com o contingente de mastócitos. Neste estudo de corte transversal, foram utilizadas 40 amostras de hiperplasia fibrosa inflamatória, granuloma piogênico, granuloma periapical, cisto radicular (10/ cada caso), alocadas dos arquivos do Serviço de Patologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Para o controle, foram utilizadas seis amostras de mucosa gengival normal. As secções histológicas coradas foram submetidas a análise morfométrica e os dados coletados demonstraram que embora o número absoluto de mastócitos intactos tenha sido maior nas lesões inflamatórias bucais do que aquele observado nas secções de mucosa oral, estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p=0,214$). Foi observada uma associação positiva entre o número de mastócitos e o grau de inflamação ($p<0,05$), porém similar correlação não foi observada quando comparou-se a expressão de colágeno e de VEGF com o contingente de MCs ($p>0,05$). Logo, foi observada a participação dos MCs na patogênese de lesões inflamatórias bucais, embora estas células pareçam não ter contribuído para a expressão de colágeno na matriz extracelular das lesões estudadas.

Palavras-chaves: Mastócitos, Inflamação, Lesões orais.

1 INTRODUÇÃO

Mastócitos (MCs) são células móveis, derivadas da medula óssea, que contêm grânulos. Eles circulam no sangue periférico e as formas maduras são encontradas em todos os ambientes do tecido conjuntivo e das mucosas, especialmente em áreas perivasculares¹. Essas células produzem e liberam uma ampla gama de mediadores químicos que estão relacionados a processos biológicos diversos a exemplo da proliferação vascular e vasodilatação no microambiente da lesão e reparo tecidual, alergias e mecanismos de defesa do hospedeiro^{2, 3}. Além disso, há evidências de que MCs desempenham um papel essencial na formação da matriz colagênica e do tecido de granulação, durante a cicatrização. Os MCs exercem um papel crítico no desenvolvimento da inflamação na mucosa oral, tanto no início, quanto na transição do processo inflamatório agudo para o crônico¹.

No contexto dos processos reativos de caráter inflamatório que acometem a mucosa oral, nos quais os MCs podem estar representados, sabe-se que a hiperplasia representa um distúrbio do crescimento celular que pode ou não estar associado ao uso de próteses mal adaptadas⁴. Outra lesão que pode ser enquadrada nesta categoria é o granuloma piogênico cuja etiologia, acredita-se representar uma resposta tecidual a uma irritação local ou trauma⁴. Além das lesões observadas na mucosa oral, procedem lesões de caráter inflamatório intra-ósseas. Por exemplo, o granuloma periapical refere-se a uma massa de tecido de granulação cronicamente inflamado, no ápice de um dente não vital⁴. Ademais, o epitélio radicular de um dente não vital presumivelmente pode ser estimulado pela inflamação para formar um cisto verdadeiramente revestido por epitélio ou o cisto radicular⁴. Em cada uma dessas lesões tem sido documentada a presença de MCs, embora ainda não esteja plenamente compreendido o seu papel nestes diferentes contextos.

O objetivo geral deste estudo foi avaliar quantitativamente a população de MCs intactos e degranulados em lesões inflamatórias bucais, as quais são hiperplasia fibrosa inflamatória, granuloma piogênico, cisto radicular e granuloma periapical, através de secções teciduais coradas com azul de toluidina. Adicionalmente, o contingente de MCs das diferentes lesões e aquele observado nas secções de mucosa oral normal foram comparados e foi avaliada a correlação do número de MCs com a área de colágeno analisada morfometricamente em secções coradas com sítius vermelho e com o número de células endoteliais imunomarcadas com o anticorpo anti-VEGF.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados neste projeto estão de acordo com as normas e diretrizes do Comitê de Ética em Humanos da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, aprovados através do parecer número 017/2011 (Anexo 1).

Neste estudo transversal, todos os casos diagnosticados como hiperplasia fibrosa inflamatória, granuloma piogênico, granuloma periapical e cisto radicular foram obtidos a partir do arquivo do Departamento de Patologia do Curso de Odontologia, da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Bahia, Brasil, durante um período de 5 anos, de 2006 a 2010.

Os casos foram selecionados a partir da avaliação dos prontuários. Após essa avaliação foram encontrados 111 casos de hiperplasia, 25 de granuloma piogênico, 24 de granuloma periapical e 49 de cisto radicular. De acordo com os critérios de inclusão no estudo, foram utilizados os prontuários totalmente completos com dados clínicos e os casos que apresentavam blocos de parafina apropriados para o preparo de novas seções. Os casos que se enquadraram nesses critérios foram 54 hiperplasias, 19 granulomas piogênicos, 13 granulomas periapicais e 22 cistos radiculares. Assim, desta amostra escolheu-se aleatoriamente 40 casos de lesões inflamatórias bucais, sendo 10 representantes de cada lesão. Os dados clínicos de cada lesão descritos nos prontuários incluíram sexo, idade e localização da lesão.

Esses números são indicativos da alta prevalência dessas lesões nos ambulatórios da instituição pesquisada. Justificando a escolha lesões como representativas da clínica odontológica.

Para o grupo controle foram utilizados tecidos gengivais clinicamente saudáveis obtidos de pacientes submetidos a cirurgia de terceiro molar impactado. Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

2.1 Histologia

Quatro seções de cada bloco selecionado, com 4 µm de espessura, foram cortadas em micrótomo digital e preparadas para cada caso. Em 3 seções utilizou-se os seguintes processos de coloração: azul de toluidina para a detecção de MCs, Hematoxilina-eosina para descrição do grau de inflamação da lesão e sítius vermelho para verificar a expressão de colágeno. Uma seção foi submetida à técnica de imuno-histoquímica com o anticorpo anti-

VEGF para avaliação de células endoteliais que estivessem expressando este fator de crescimento.

2.2 Técnica de imuno-histoquímica

Em lâminas tratadas previamente com solução de organo-silano (A 3648 - Sigma) foram obtidas seções teciduais a partir dos blocos de parafina acima descritos.

Procedeu-se a desparafinização dos cortes histológicos, submetendo as lâminas a três banhos de 10' com xilol, seguidos de dois banhos de 5' em solução de álcool absoluto e posterior lavagem em água corrente e destilada. A recuperação antigênica para as lâminas tratadas com o anticorpo anti-VEGF foi realizada com tampão citrato 10 mM, pH 6.0, em banho maria, a aproximadamente 96°C, por 30'. Após este procedimento as lâminas resfriaram em temperatura ambiente e foram banhadas em água destilada. Em seguida, estas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena com Peroxidase Block (DAKO, K4007), por 30', em temperatura ambiente. Depois desse tempo, foi realizada lavagem com água destilada e três banhos com PBS, com duração de 3' cada. Foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas através do reagente Protein Block Serum-Free (DAKO, X0909) em temperatura ambiente, por 30'. Os tecidos foram incubados com o anticorpo primário anti-VEGF (A-20, K1004, rabbit policlonal IgG, Santa Cruz Biotechnology), preparados na diluição preconizada através de um diluente com agente redutor de background (DAKO, Antibody Diluent, S0809). O anticorpo foi aplicado com auxílio de pipetas de precisão em cada corte histológico, com um volume de 80 µl e incubados por uma noite em câmara úmida a 4°C.

No dia seguinte, após equilibrar as lâminas à temperatura ambiente por 50', foram realizadas três lavagens com PBS de 3' cada e secagem com gaze. Foi utilizado o polímero HRP (DAKO, K4011) por 30'. Após esse período as lâminas foram rinsadas com água destilada e banhadas três vezes com PBS por 4' cada banho. A revelação da reação foi feita com diaminobenzidina (Liquid DAB Substrate Chromogen System, DAKO, K3466). Posteriormente, as mesmas lâminas foram lavadas com água com o objetivo de bloquear a reação. As lâminas foram, então, contracoradas com hematoxilina de Meyer por quinze segundos, lavadas com água corrente e depois com água destilada. Por fim, os cortes foram desidratados duas vezes em solução de álcool absoluto, diafanizados em dois banhos de xilol e montados em Bálsamo do Canadá.

Para o controle positivo da reação foi utilizada uma secção de tecido de granulação. O controle negativo foi realizado utilizando-se PBS, com omissão do anticorpo primário.

O processamento dos tecidos do grupo controle (tecidos gengivais clinicamente saudáveis) foi o mesmo adotado para o grupo teste (lesões inflamatórias).

2.3 Análise dos dados

Realizou-se estudo semi-quantitativo dos cortes corados por HE analisando as variáveis do processo inflamatório como edema e infiltrado monomorfonuclear adotando os critérios de ausente (0), discreto (1), moderado (2) e intenso (3), com dois avaliadores calibrados. Utilizou-se microscópio de luz.

Para análise dos cortes histológicos utilizou-se microscópio MOTIC B5 Professional Series com câmara acoplada e interligada ao programa de computador Motic Image Advance 3.0. Antes de utilizar o programa, a calibração para cada objetiva foi conferida pela imagem padrão, capturada de uma lâmina de calibração fornecida pelo fabricante. As lâminas foram examinadas cuidadosamente selecionando randomicamente três áreas de 0,1 mm². Em seguida, cada área foi capturada no aumento de 40X e salva em formato JPEG.

O estudo morfométrico foi realizado nas secções teciduais coradas com azul de toluidina para contagem dos MCs intactos e degranulados, naquelas coradas com sítius vermelho para mensuração da área de colágeno e nos cortes submetidos à imuno-histoquímica para contagem de células endoteliais positivas para VEGF. Vasos com parede muscular não foram incluídos no estudo. Não houve restrição quanto ao tamanho dos vasos, assim como foram consideradas pequenas ilhas de células endoteliais, considerando-se as bifurcações e as secções longitudinais dos microvasos.

2.4 Análise estatística

Para a validação e comparação dos resultados observados nas diferentes lesões foram utilizados o teste não-paramétrico Exato de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste Exato de Mann-Whitney, com correção de Bonferroni. O nível de significância adotado para este trabalho foi de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 Achados clínicos

A média de idade dos pacientes com hiperplasia foi de 39,3 anos, sendo o sexo feminino mais acometido e com representatividade de 60%. Os casos de granuloma piogênico ocorreram 70% no sexo masculino e a média foi de idade de 37 anos. A maioria dos casos de granuloma periapical afetou mulheres (3 mulheres para cada 2 homens) e a média de idade foi 37 anos. Quanto aos casos de cisto radicular, foi constatado um maior número de lesões no sexo feminino em relação ao sexo masculino (3:2), com média de idade de 37,2 anos. Houve uma maior prevalência de granuloma piogênico e hiperplasia fibrosa inflamatória em rebordo alveolar, sendo o primeiro mais comum em mandíbula e a segunda, em maxila. Quanto às lesões intra-ósseas, observou-se localização variada, sendo os ápices radiculares de molares inferiores mais cometidos tanto pelo granuloma periapical quanto pelo cisto radicular.

3.2 Avaliação dos níveis de edema e células inflamatórias monomorfonucleares em secções coradas com hematoxilina-eosina

Em secções de tecido normal, obtidas a partir da remoção do capuz gengival associado aos terceiros molares inclusos, observou-se ausência de edema e presença de células linfoplasmocitárias esparsamente distribuídas em meio à lâmina própria (Figura 1).

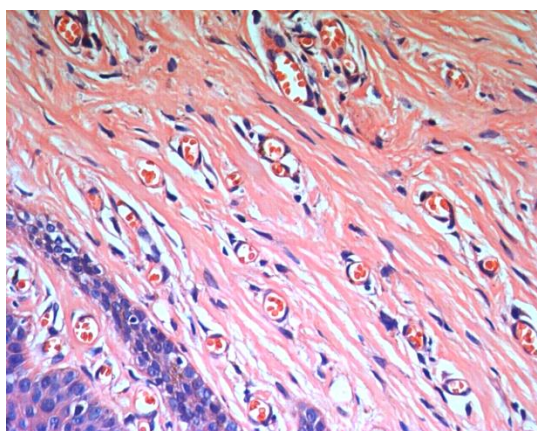


Figura 1: Secção de mucosa oral normal que evidencia células linfo-plasmocitárias esparsas na matriz extracelular. Hematoxilina-eosina, 400 X.

Todas as lesões inflamatórias estudadas apresentaram graus de edema e infiltrado monomorfonuclear que variaram de moderado a intenso, sendo estes valores estatisticamente significativos quando comparados às secções de mucosa normal ($p < 0,001$), a exceção daqueles relacionados ao infiltrado inflamatório presente nas secções de hiperplasia (Tabela 1). Diferenças significativas adicionais foram observadas quanto ao grau de edema presente nas secções de granuloma piogênico e cisto radicular e no que diz respeito ao infiltrado inflamatório encontrado no tecido conjuntivo dos casos de hiperplasia e granuloma piogênico ($p < 0,001$); (Tabela 1); (Figura 2 A, B).

Tabela 1. Avaliação dos níveis de edema e células inflamatórias em secções coradas com hematoxilina-eosina

Grupos de Estudo	Edema ¹		Infiltrado ²	
	Mediana	q1-q3	Mediana	q1-q3
Hiperplasia ^a	2,0	1,0-2,0	2,0	1,0-3,0
Granuloma Piogênico ^b	3,0	2,0-3,0	3,0	3,0-3,0
Granuloma Periapical ^c	1,5	1,0-2,0	3,0	2,0-3,0
Cisto Radicular ^d	2,0	1,0-2,0	2,5	2,0-3,0
Controle ^e	0,0	0,0-1,0	1,0	1,0-1,0
p-valor	<0,001		<0,001	

1. Kruskal Wallis com teste a posteriori de Mann-Whitney com correção de Bonferroni.

.(ae) ($p=0,002$) .(be) ($p < 0,001$) .(ce) ($p=0,004$) .(de) ($p=0,001$) .(bd) ($p=0,002$)

2. Kruskal Wallis com teste a posteriori de Mann-Whitney com correção de Bonferroni.

.(be) ($p < 0,001$) .(ce) ($p < 0,001$) .(de) ($p < 0,001$) .(ab) ($p=0,003$)

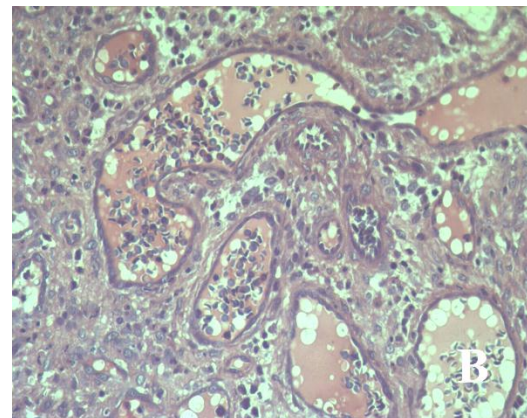
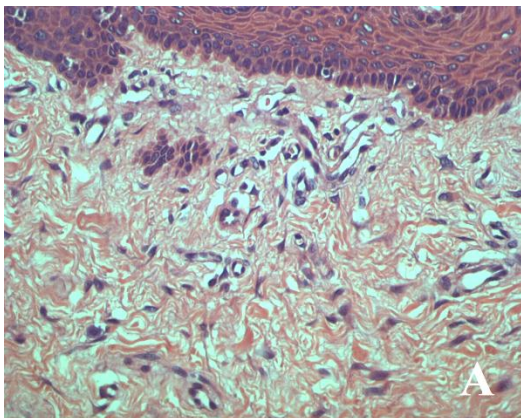


Figura 2: Infiltrado monomorfonuclear discreto presente na matriz extracelular de hiperplasia fibrosa inflamatória (A). Grau intenso de infiltrado linfo-plasmocitário em secção de granuloma piogênico. Hematoxilina-eosina, 400 X.

3.3 Análise de mastócitos nos diferentes grupos através da coloração com azul de toluidina

Em secções coradas com azul de toluidina os grânulos dos MCs exibiram evidente metacromasia (Figura 3 A, B). Contudo, embora o número absoluto de MCs intactos tenha sido maior nas lesões inflamatórias bucais do que aquele observado nas secções de mucosa oral sem inflamação, estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p=0,214$). Com relação ao contingente de MCs degranulados constatou-se os mesmos aspectos supracitados ($p=0,05$); (Tabela 2).

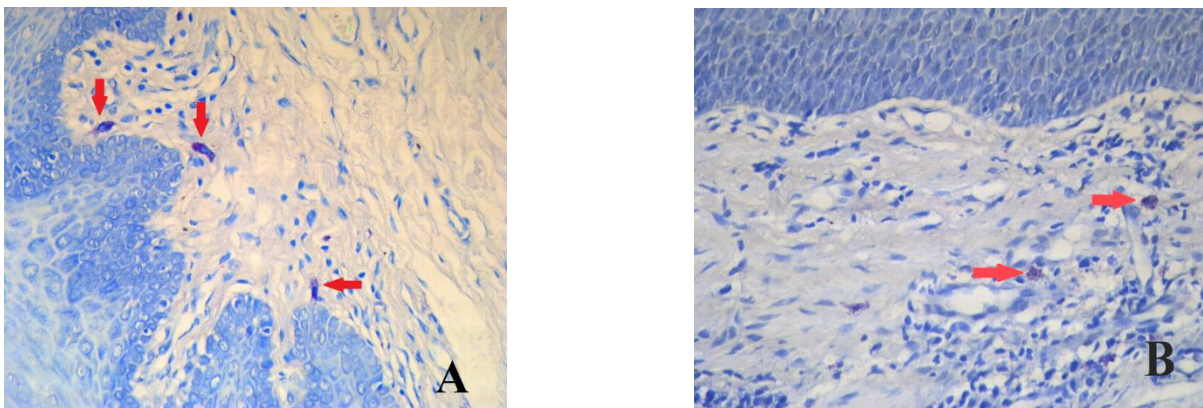


Figura 3: Presença de três mastócitos (setas) na lâmina própria evidenciando granulação metacromática, em lesão de hiperplasia fibrosa inflamatória (A). Mastócitos degranulados (setas), em mucosa oral normal, que exibem grânulos em cor púrpura localizados próximos ao núcleo (B). Azul de toluidina, 400X.

Tabela 2. Análise de mastócitos nos diferentes grupos através da coloração com azul de toluidina

Grupos de Estudo	Intactos		Degranulados	
	Mediana	q1-q3	Mediana	q1-q3
Hiperplasia ^a	5,5	2,8-14,3	5,5	2,8-9,3
Granuloma Piogênico ^b	9,0	1,8-13,0	8,0	3,5-10,5
Granuloma Periapical ^c	7,0	2,3-14,3	2,5	1,0-4,8
Cisto Radicular ^d	8,5	5,0-12,5	4,0	2,0-4,3
Controle ^e	2,5	0,8-3,5	3,0	0,8-6,0
p-valor	0,214		0,055	

3.4 Expressão de colágeno na matriz extracelular das lesões inflamatórias bucais e de mucosa normal em secções coradas com sÍrius vermelho

A área total de colágeno foi mensurada em todas as secções teciduais e a análise morfométrica indicou uma maior tendência de expressão desta proteína fibrilar nas lesões intra-ósseas, a exemplo do granuloma periapical e cisto radicular quando estas foram comparadas às secções de mucosa normal ($p < 0,05$); (Figura 4 A, B, C).

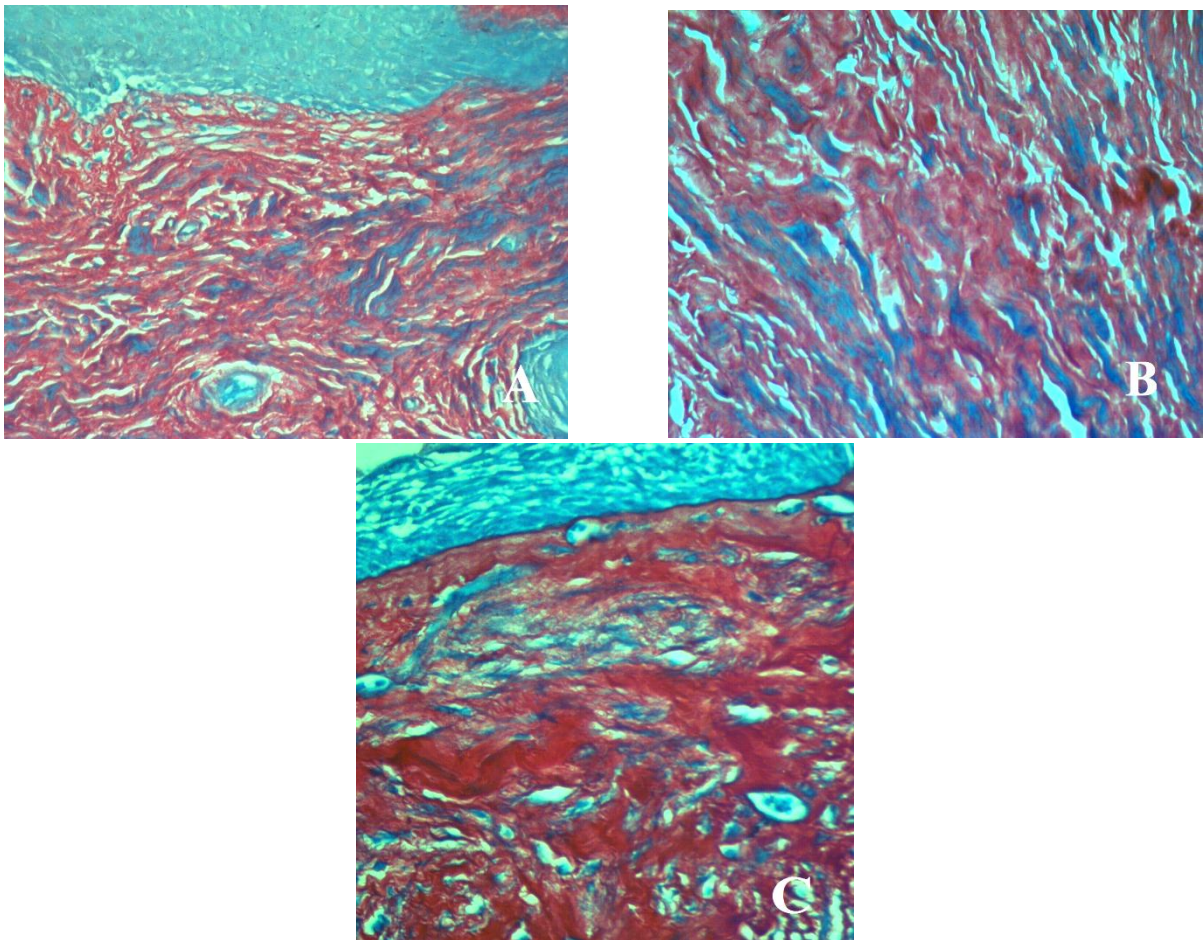


Figura 4: Expressão de colágeno organizado e com feixes espessos em lâmina própria de mucosa oral normal (A). Expressão da matriz colagênica bem modelada em granuloma periapical (B). Disposição das fibras colágenas em matriz conjuntiva de cisto radicular situada abaixo do revestimento epitelial cístico (C). SÍrius vermelho, 400X.

Embora as lesões inflamatórias de mucosa oral, tais como a hiperplasia e o granuloma piogênico também exibissem maiores valores indicativos da área total de colágeno, estas diferenças não foram significativas quando comparadas às secções controles ($p > 0,05$); (Tabela 3).

Tabela 3. Expressão de colágeno na matriz extracelular das lesões inflamatórias bucais e de mucosa normal em secções coradas com sítius vermelho

Grupos de Estudo	Área de Colágeno ¹	
	Mediana	q1-q3
Hiperplasia ^a	0,14	0,08-0,15
Granuloma Piogênico ^b	0,13	0,09-0,15
Granuloma Periapical ^c	0,16	0,14-0,17
Cisto Radicular ^d	0,16	0,14-0,17
Controle ^e	0,10	0,09-0,11
p-valor	0,002	

1. Kruskal Wallis com teste a posteriori de Mann-Whitney com correção de Bonferroni. .(ce) (p=0,001) .(de) (p<0,001)

3.5 Expressão de VEGF em células endoteliais nos diferentes grupos de lesões inflamatórias bucais e de mucosa oral

As células endoteliais nas diferentes lesões estudadas exibiram um padrão de marcação citoplasmática com o anticorpo anti-VEGF (Figura 5 A, B).

Nas lesões inflamatórias bucais o número de células endoteliais VEGF positivas presentes no revestimento endotelial de pequenos capilares sanguíneos foi maior quando comparado àquele observado nas secções de controle normal. No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas (p=0,153); (Tabela 4).

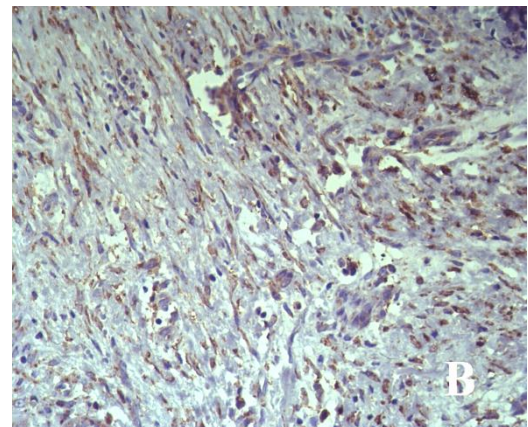
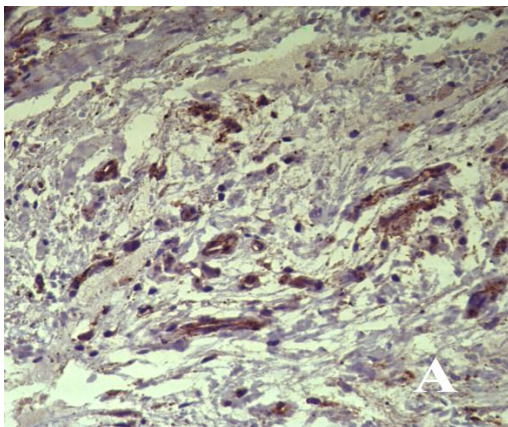


Figura 5: Expressão de células VEGF positivas no revestimento endotelial de pequenos capilares em secção de granuloma periapical (A). Expressão de células VEGF positivas localizadas ao redor da luz de pequenos capilares em secção de granuloma piogênico (B). Imuno-histoquímica, anti-VEGF, 400X.

Tabela 4. Expressão de VEGF em células endoteliais nos diferentes grupos de lesões inflamatórias bucais e de mucosa oral

Grupos de Estudo	VEGF	
	Mediana	q1-q3
Hiperplasia	17,0	16,0-30,0
Granuloma Piogênico	29,5	24,3-41,5
Granuloma Periapical	27,0	18,0-28,0
Cisto Radicular	19,0	11,0-53,5
Controle	10,0	8,0-14,0
p-valor	0,153	

3.6 Correlação do contingente de mastócitos com área de colágeno e VEGF

Não foi encontrada correlação positiva entre o contingente de MCs com área de colágeno e a expressão de VEGF nas diferentes lesões (Tabela 5).

Tabela 5. Correlação do contingente de MCs com a área de colágeno e expressão de VEGF

	MCs (intactos e degranulados)	
	Coefficiente de Correlação	p-valor
Área de Colágeno	-0,018	0,905
VEGF	-0,032	0,885

4 DISCUSSÃO

Os MCs são encontrados em órgãos e tecidos do corpo humano e são a principal fonte de histaminas, proteases e outros mediadores químicos importantes. Um dos principais componentes presentes nos seus grânulos é a triptase², uma enzima encontrada exclusivamente nestas células⁵. Os MCs têm sido descritos numa variedade de doenças inflamatórias e processos imunopatológicos. Desta forma, por ser um elemento celular central no desenvolvimento do processo inflamatório, foi eleito como objeto de análise deste estudo.

A presença de MCs em lesões inflamatórias e fibróticas é fartamente documentada na literatura^{1, 2, 6}. Por esta razão, optou-se por investigar a participação destas células em lesões inflamatórias bucais. Vários métodos de colorações histoquímicas têm sido utilizados com o objetivo de caracterizar estes elementos celulares, como por exemplo, o Astra azul⁶, o Giemsa^{7, 8}, Alcian-blue⁹, e também técnicas de imuno-histoquímica usando anticorpos monoclonais anti-triptase como marcadores enzimáticos^{2, 9, 10, 11}. Segundo Sharma e Saxena⁶ o corante Astra azul mostrou-se mais específico para MCs quando comparado ao Azul de toluidina. Em contrapartida, de acordo com Natah *et al.*¹² anticorpos anti-triptase são os indicadores mais confiáveis de atividade de degranulação de MCs. O presente estudo utilizou a técnica de coloração histoquímica com o corante Azul de toluidina para detecção dos MCs, sendo este método de coloração um dos mais utilizados para o estudo destas células^{1, 13, 14}.

Além dos processos inerentes à inflamação já citados, no presente trabalho, o contingente de MCs foi comparado entre as quatro lesões inflamatórias bucais e o tecido gengival coletado durante cirurgias de terceiros molares inclusos, com capuz gengival sem sinais clínicos de inflamação. O número de MCs nas lesões inflamatórias não diferiu estatisticamente em relação ao tecido normal, apesar do número de MCs intactos e degranulados ter sido maior nas lesões inflamatórias bucais do que no grupo controle. Farahani *et al.*¹ avaliaram lesões reativas orais e encontraram um número elevado dessas células nestas entidades clínicas. Todavia, um estudo realizado por Vahabi *et al.*¹⁵ sugeriu que em lesões com componente inflamatório muito exuberante, pode ser difícil detectar a presença de MCs em virtude da sua degranulação. Estes autores fizeram uma análise que avaliou o número de MCs em diferentes tipos de doença periodontal e verificaram contingente maior de MCs em periodontites crônicas em comparação à periodontite agressiva e a tecidos normais. Estudos anteriores também demonstraram aumento do número de MCs no estágio inicial da epulis¹⁶ e em cistos

periapicais comparados com granulomas periapicais⁶. Sendo assim, embora os resultados do presente estudo não corroborem estes trabalhos citados, algumas hipóteses devem ser consideradas numa tentativa de justificá-los. É muito difícil precisar o tempo de evolução das lesões estudadas. Sabe-se que agentes irritativos de longa duração e baixa intensidade são capazes de promover o desenvolvimento destas patologias e o contínuo remodelamento da sua matriz extracelular, conforme sugerido por Kamal *et al.*¹⁴. Desta forma, considerando o estado funcional do MC, seu número pode ser facilmente subestimado em virtude do processo de degranulação.

Em vista destas considerações, no presente estudo, foi realizada contagem de MCs intactos e degranulados. Embora tenha sido observado em todas as lesões estudadas um aumento do contingente de MCs em relação às secções de mucosa normal, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Tal fato pode ser justificado pelo tamanho da amostra utilizado neste estudo. Foram selecionados 10 casos representantes de cada lesão inflamatória bucal. Embora este mesmo número amostral tenha sido utilizado por outros autores^{2, 12}, provavelmente um maior número de secções histológicas provenientes de cada patologia e do tecido normal, permitiriam detectar as aparentes diferenças em relação não só ao contingente de MCs, mas também às outras variáveis analisadas.

Os resultados deste estudo demonstraram que os MCs encontraram-se em maior número no cisto radicular quando comparado ao granuloma periapical. Esta observação foi descrita na Tabela 2 e reflete tanto o número de MCs intactos, como o de degranulados. Comparando a contagem de MCs em granulomas periapicais e tecidos normais, Kamal *et al.*⁸ observaram um número aumentado dessas células na lesão. Todavia, Sharma e Saxena⁶ observaram, na comparação entre granulomas e cistos periapicais, que os cistos tinham mais MCs do que os granulomas. Os autores utilizaram secções coradas com azul de toluidina. O mesmo resultado foi encontrado por Rodini *et al.*¹⁷, através da utilização da técnica de imuno-histoquímica com o anticorpo anti-triptase. Estes mesmos autores justificaram este achado histológico em virtude do granuloma periapical poder representar uma lesão que precede o desenvolvimento do cisto radicular e desta forma a atividade funcional do MC e sua consequente degranulação estariam mais acentuados, tornando difícil a sua detecção.

Analisando-se separadamente as quantidades de MCs intactos e degranulados em cada lesão, constatou-se maior número destas células na mesma lesão – o granuloma piogênico. Tal fato

sugere que, nesta patologia, o grau de inflamação se mantém relativamente constante, pois foi observado que entre todas as lesões estudadas, o grau de edema e a presença de células inflamatórias linfo-plasmocitárias foi maior no granuloma piogênico. Isto parece indicar que a participação dos MCs é contribuinte e exerce um papel decisivo na patogênese do granuloma. Alguns autores tem demonstrado a relevância do processo de degranulação para o estabelecimento do caráter inflamatório da lesão. Walsh *et al.*¹⁸ encontraram MCs degranulados em vários tipos de lesões inflamatórias a exemplo de gengivite, granuloma periapical, pulpite, entre outras. O estudo avaliou a liberação de mediadores e presença de triptase e quimase na matriz extracelular. Os autores salientaram que a degranulação pode ser disparada por vários estímulos relacionados à inflamação. Em um estudo comparativo entre fibroma de células gigantes, hiperplasia fibrosa inflamatória e tecido normal, Santos *et al.*¹¹ encontraram maior percentagem de MCs degranulados no fibroma em relação aos outros grupos. Segundo os autores, esta observação não indica necessariamente um papel destrutivo, mas pode sugerir o envolvimento dessa célula no processo de reparo. Em adição a estes trabalhos citados na literatura, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas por Rakesh *et al.*¹³, ao avaliarem a contagem de MCs degranulados em secções de leucoplasia quando comparadas com mucosa oral normal. No presente estudo, uma significativa relação foi encontrada entre o número de MCs e o grau de inflamação nos casos de granuloma piogênico, granuloma periapical e cisto radicular. Isto ratifica a atividade dos MCs na inflamação^{9, 19}. Corroboram com o presente trabalho, os resultados de Farahani *et al.*¹. Estes autores também encontraram correlação entre a quantificação de MCs em fibroma irritativo e granuloma periférico de células gigantes e o grau de inflamação. Drazic *et al.*²⁰ encontraram MCs degranulados em meio ao infiltrado inflamatório e Montes *et al.*²¹, em áreas de infiltrado inflamatório crônico de lesões periapicais, sugerindo a participação dessas células na injúria e reparo de lesões que acometem os tecidos periapicais.

Tem sido demonstrado um crescente estímulo à proliferação fibroblástica e consequente síntese de colágeno decorrentes da liberação de enzimas, como a triptase e a quimase, pelos MCs no momento de sua degranulação¹⁰. No presente trabalho, encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e duas das lesões estudadas em relação à área de colágeno, indicando maior área no granuloma periapical e cisto radicular. No entanto, não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre o contingente de MCs e a área de colágeno nos resultados obtidos neste estudo. A associação dessas células com a intensidade da fibrose tem sido relatada em diversas condições como na fibrose renal^{9, 22} e em

tumores⁷. Apesar de Roberts e Brenchley⁹ encontrarem um número elevado de MCs em tecidos renais que mostraram fibrose em comparação com tecidos renais normais, os autores ressaltaram que algumas citocinas fibrogênicas dos MCs também são produzidas por outros tipos de células envolvidas na fibrose renal, tais como macrófagos e células epiteliais tubulares e isto dificultou a definição precisa do papel dos MCs no processo fibrótico. Miyazawa *et al.*²², encontraram resultados inversos quando avaliaram o papel dos MCs na fibrose renal e concluíram que estas células não desempenharam um papel importante na patogênese da fibrose intersticial em nefrose. Santos *et al.*¹¹ comparando o número total de MCs em áreas de fibrose, encontraram um maior número dessas células em hiperplasia fibrosa inflamatória e uma concentração mais baixa em áreas ricamente colagenizadas de mucosa normal. De acordo com alguns investigadores, a triptase secretada pelos MCs interage com o receptor de ativação da protease (PAR-2) e, assim, induz a proliferação de fibroblastos e consequentemente da fibrose^{23, 24}.

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é um dos mediadores químicos produzidos pelos MCs³. A liberação deste fator de crescimento pelos MCs pode ocorrer pela degranulação ou transferência entre células, processo conhecido como transgranulação²⁵. A típica localização dos MCs nas proximidades dos capilares sanguíneos parece indicar a ocorrência da transgranulação. Todavia, a indução da expressão de VEGF por parte das células endoteliais pode acontecer por outras vias de sinalização. Sabe-se que este fator de crescimento pode estimular a proliferação de células endoteliais, formação de novos capilares sanguíneos e posterior processo de fibroplasia⁹. Nonaka *et al.*²⁶ avaliaram lesões inflamatórias periapicais a exemplo do granuloma e cisto radicular e constataram alta expressão de VEGF nestas patologias, concluindo que a expressão desse fator pró-angiogênico estaria relacionada com a intensidade do infiltrado inflamatório presente na matriz extracelular destas lesões. Os resultados do trabalho de Gruber *et al.*²⁷ e Ribatti *et al.*²⁸ indicaram que entre os muitos fatores que atuam nas células endoteliais, o VEGF, além de estimular a neovascularização, contribui para o recrutamento de MCs ao sítio da lesão. Na presente investigação, o número de células endoteliais que exibiram um padrão de imunomarcagem citoplasmática para o anticorpo anti-VEGF, foi maior em todas as lesões estudadas quando comparadas às secções histológicas de mucosa normal, fato este que poderia sugerir a participação do endotélio no recrutamento de MCs para a matriz conjuntiva destas lesões. Contudo, estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Adicionalmente, não foi observada correlação

estatisticamente significativa entre a expressão de VEGF por parte de células endoteliais e o número de MCs.

Os resultados obtidos a partir deste trabalho sugerem fortemente a participação dos MCs na patogênese de lesões inflamatórias bucais, embora outros tipos celulares como os macrófagos e células endoteliais, por exemplo, também possam estar contribuindo para o desenvolvimento de fenômenos biológicos relevantes no contexto das lesões analisadas neste estudo. Faz-se necessário ampliar o número de casos relacionados às patologias que foram objeto desta investigação a fim de ratificar as diferenças observadas referentes às variáveis estudadas. A utilização de outros marcadores específicos para os MCs a exemplo do anticorpo anti-triptase¹², também poderá contribuir para o melhor entendimento do papel desempenhado por estas células nas lesões inflamatórias e fibróticas. Ademais, o conhecimento do comportamento dessas células pode levar ao desenvolvimento de possíveis drogas antifibróticas, ou inibidores de mediadores inflamatórios, complementando às atuais terapias cirúrgicas e/ou medicamentosas.

Os resultados obtidos a partir deste trabalho sugerem fortemente a participação dos MCs na patogênese de lesões inflamatórias bucais, apesar do número de MCs ter sido maior em todas as lesões estudadas, não houve diferença estatística. A expressão de colágeno foi maior nas lesões estudadas em relação aos tecidos gengivais normais e ainda não foi observada correlação positiva entre a expressão de VEGF e o número de MCs.

ABSTRACT

Mast cells (MCs) are cells that contain secretory granules and are distributed in the connective tissue and mucous membranes, especially in perivascular areas preferably on the microvascular bed in the oral mucosa. The objective was to quantify the population of MCs degranulados intact and in oral inflammatory lesions by staining with toluidine blue. The analysis of the degree of edema and lymphoplasmacytic infiltrate was performed on sections stained with hematoxylin-eosin, as well as the expression of collagen in sections stained with Sirius Red. We used the anti-VEGF antibody in immunohistochemical technique to evaluate the expression of this growth factor in endothelial cells and correlate it with the number of mast cells. In this cross-sectional study, we used 40 samples of inflammatory fibrous hyperplasia, pyogenic granuloma, periapical granuloma, radicular cyst (10 / each), allocated from the files of the Pathology Service of Bahia School of Medicine and Public Health. For the control samples were used six normal gingival mucosa. The histological sections were stained and subjected to morphometric analysis of the collected data showed that although the absolute number of intact mast cells was higher in oral inflammatory lesions than that observed in sections of oral mucosa, these differences were not statistically significant ($p = 0.214$). We observed a positive association between the number of mast cells and the degree of inflammation ($p < 0.05$), but similar correlation was not observed when we compared the expression of VEGF with collagen and the number of MCs ($p > 0.05$) Soon, we observed the involvement of MCs in the pathogenesis of inflammatory oral lesions, although these cells appear to have contributed to the expression of collagen in the extracellular matrix of the lesion.

Keywords: Mast Cells, Inflammation, Oral lesions.

REFERÊNCIAS

1. Farahani SS, Navabazam A, Ashkevari FS. Comparison of mast cells count in oral reactive lesions. *Pathology – Research and Practice* 2010; 206: 151–5.
2. Batista AC, Rodini CO, Lara VS. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. *Oral Diseases*. 2005; 11: 249–54.
3. Carrera M, Pinho CB, Medrado ARP, Andrade ZA, Reis SRA. Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2010; 98: 188-92.
4. Neville BW, Damm DD, Allem CM, Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
5. Weller CL, Collington SJ, Williams T, Lamb JR. Mast cell in health and disease. *Clin Sci*. 2011; 120: 473-84.
6. Sharma R, Saxena S. Comparative study of the mast cell in periapical granulomas and periapical cysts by toluidine blue and astra blue: possible role of mast cell in the course of human periapical lesions. *Int J Oral-Med Sci* 2010; 9 (1): 17-25.
7. Samoszuk M, Kanakubo E, Chan JK. Degranulating mast cells in fibrotic regions of human tumors and evidence that mast cell heparin interferes with the growth of tumor cells through a mechanism involving fibroblasts. *BMC Cancer*. 2005, 5: 121.
8. Drazic R, Sopta J, Minic AJ. Mast cells in periapical lesions: potential role in their pathogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2010; 39: 257–62.
9. Roberts ISD, Brenchley PEC. Mast cells: the forgotten cells of renal fibrosis. *J Clin Pathol* 2000; 53: 858–862.
10. Riekkari R, Harvima IT, Jukkola A, Risteli J, Oikarinen A. The production of collagen and the activity of mast-cell chymase increase in human skin after irradiation therapy. *Exp Dermatol* 2004; 13: 364–71.
11. Santos PPA, Nonaka CFW, Pinto LP, Souza LB. Immunohistochemical expression of mast cell tryptase in giant cell fibroma and inflammatory fibrous hyperplasia of the oral mucosa. *Archives of oral biology*. 2011; 56: 231–37.
12. Natah SS, Häyrinen-Immonen R, Malmström M, Kontinen YT. Quantitative assessment of mast cell in recurrent aphthous ulcers (RAU). *J Oral Pathol Med*. 1998; 27: 124-29.
13. Rakesh S, Vidya M, Janardhanan M, Vinodkumar RB, Savithri V. Analysis of mast cell counts in oral leukoplakia. *Ora Max Path J*. 2012; 3 (1): 181-5.
14. Kamal R, Dahiya P, Palaskar S, Shetty VP. Comparative analysis of mast cell count in normal oral mucosa and oral pyogenic granuloma. *J Clin Exp Dent*. 2011; 3(1): 1-4.

15. Vahabi S, Rezazadeh F, Movaghar SH, Nazemisalman B. Correlation of mast cell numbers and different periodontal disease. *Res. J. Biol. Sci.* 2010; 5 (4): 340-4.
16. Murata M, Hara K, Saku T. Dynamic distribution of basic fibroblast growth factor during epulis formation: an immunohistochemical study in an enhanced healing process of the gingival. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 224-32.
17. Rodini CO, Batista AC, Soares V. 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* 2004; 97: 59-63.
18. Walsh LJ, Davis MF, Xu LJ, Savage NW: Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. *J Oral Pathol Med.* 1995; 24: 266-72.
19. Walsh LJ. Mast cells and oral inflammation. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 2003; 14:188–98.
20. Drazic R, Sopta J, Minic AJ. Mast cells in periapical lesions: potential role in their pathogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39: 257–62.
21. Montes CL, Ortíz MG, García GR, Guerrero JCH. Importance of mast cell in human periapical inflammatory lesions. *J End.* 2004; 30(12): 855-9.
22. Miyazawa S, Hotta C, Doi N, Natori Y, Nishikawa K, Natori Y, Role of mast cells in the development of renal fibrosis: use of mast cell-deficient rats. *Kidney Int.* 2004; 65: 2228–37.
23. Akers IA, Parsons M, Hill MR, Hollenberg MD, Sanjar S, Laurent GJ, et al. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278: 193–201.
24. Asano-Kato N, Fukagawa K, Okada N, Dogru M, Tsubota K, Fujishima H. Tryptase increases proliferative activity of human conjunctival fibroblasts through protease-activated receptor-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 4622–6.
25. Grützkau A, Krasagakes SK, Baumeister H, Schwarz C, Kögel H, Welker P, et al. Synthesis, Storage, and Release of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor (VEGF/VPF) by Human Mast Cells: Implications for the Biological Significance of VEGF. *Molecular Biology of the Cell.* 1998; 9: 875–84.
26. Nonaka CFW, Maia AP, Nascimento GJF, Freitas RA, Souza LB, Galvão HC. Immunoexpression of vascular endothelial growth factor in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106: 896-902.
27. Gruber BL, Marchese MJ, Kew R. Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. *Blood,* 1995; 86 (7): 2488-93.

28. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Quondamatteo F, Ria R, Minischetti M, Marzullo A, Herken R, Roncali L, Dammacco F. Bone marrow angiogenesis and mast cell density increase simultaneously with progression of human multiple myeloma. *British Journal of Cancer* 1999; 79 (3/4): 451–455.

ANEXO 1



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício n 099/2011
Salvador, 16 de maio de 2011.

Referente ao prot. de pesquisa Nº. 017/2011.
Pesquisador Responsável: Alena Ribeiro Alves Peixoto

Título: Análise de contingente de mastócitos em lesões inflamatórias bucais

Objetivo Geral: Avaliar a população de mastócitos em lesões inflamatórias bucais;
Objetivos Específicos – Caracterizar quantitativamente a expressão de mastócitos, através da coloração azul de toluidina, nos granulomas piogênico e periapical, na hiperplasia fibrosa inflamatória e no cisto radicular;

- Comparar o contingente de mastócitos das diferentes lesões e aquele observado nas secções de mucosa oral normal;
- Co-relacionar o número de mastócitos com a área de colágeno analisada morfometricamente em secções coradas com Sírius vermelho;
- Avaliar o processo de angiogênese nas lesões selecionadas, através da técnica de imunohistoquímica;
- Co-relacionar o número de mastócitos com o contingente de vasos neoformados em secções histológicas que exibirem células CD-31 e Fator VIII positivas.

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências, após análise do ponto de vista bioético das respostas de pendência do Protocolo acima citado considera que o protocolo atende aos princípios éticos em Pesquisa em Seres Humanos, segundo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP-CNS-MS).

Diante do exposto julga o protocolo supracitado **APROVADO**

Lembramos a necessidade do envio de relatório anual do andamento da pesquisa, dentro do cronograma citado no mesmo protocolo.


Prof. Roseny Santos Ferreira
Coordenadora de CEP/EBMS/FBDC

Ima. Sa. Profa. Dra. Alena Ribeiro Alves Peixoto
Rua: Rodolfo Coelho Cavalcante, 90 Aptº 502.
CEP- 41750-166

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Análise do Contingente de Mastócitos em Lesões Inflamatórias Bucais

Instituição: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

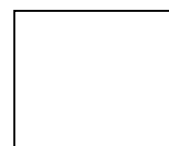
O(A) Sr^(a) está sendo convidado a participar da pesquisa “Análise do Contingente de Mastócitos em Lesões Inflamatórias Bucais”, com objetivo de estudar uma célula da inflamação. O tema é importante, pois ampliará o conhecimento sobre o processo de inflamação e cura das feridas bucais. Os participantes desta pesquisa responderão a questões concernentes a idade e sexo. Será removido um pequeno pedaço da gengiva que está recobrimdo o dente incluso que será extraído, antes da remoção do dente. Os resultados desta pesquisa serão divulgados em congressos e revistas científicas. Os pesquisadores garantem guardar sigilo em relação à identidade dos participantes e estes têm a garantia de esclarecimento em relação a qualquer dúvida, antes e durante o curso da pesquisa, estando livres para recusar-se a participar da pesquisa, assim como retirar este consentimento a qualquer momento, sem penalização ou prejuízo ao seu cuidado. Não haverá remuneração aos participantes.

O pesquisador responsável é a Prof^a Dr^a Alena Medrado, endereço: R.. Rodolfo Coelho Cavalcante, 90, apt 502, Salvador, Ba. Tel.(71) 8838 0218. Este termo é composto de duas vias de igual conteúdo, sendo a primeira para arquivamento pelo pesquisador e a segunda para o paciente ou seu representante legal.

Eu,.....dou meu consentimento para participar desta pesquisa, após ter lido, recebido esclarecimentos e compreendido.

Salvador, ____/____/____

Assinatura do Participante



Assinatura do (a) pesquisador (a)

Local para impressão digital

Assinatura da testemunha

Em caso de dúvida ou denúncia contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública – Av. D. João VI, 274 – Brotas - CEP. 40.285-01-Salvador-Ba. Tel.: (71) 2101-1900