



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA E SAÚDE

**DISTRIBUIÇÃO DE MASTÓCITOS E SUA RELAÇÃO COM A
DEGRADAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS EM TECIDOS PERIODONTAIS:
ESTUDO DE CASO-CONTROLE**

LÍVIA SILVA FIGUEIREDO E RIBEIRO

Salvador
2016

LÍVIA SILVA FIGUEIREDO E RIBEIRO

**DISTRIBUIÇÃO DE MASTÓCITOS E SUA RELAÇÃO COM A
DEGRADAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS EM TECIDOS PERIODONTAIS:
ESTUDO DE CASO-CONTROLE**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do Título de Mestre.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Patricia Ramos Cury

Co-orientador (a): Prof^o Dr^o Jean Nunes dos Santos

Salvador
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,
Sistema de Bibliotecas da UFBA

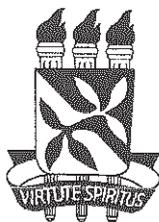
R484 Ribeiro, Lívia Silva Figueiredo e,
Distribuição de mastócitos e sua relação com a degradação das
fibras colágenas em tecidos periodontais: estudo de caso-controle /
Lívia Silva Figueiredo e Ribeiro. - Salvador, 2016.
80 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Ramos Cury.
Coorientador: Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia,
Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em
Odontologia e Saúde, 2016.

1. Mastócitos. 2. Periodontite. 3. Gengivite. 4. Colágeno. 5.
Estudo de casos e controles. I. Cury, Patrícia Ramos. II. Santos,
Jean Nunes dos. III. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de
Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia e
Saúde. IV. Título.

CDU: 616.314.17-002



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA E SAÚDE

TERMO DE APROVAÇÃO

C.D. LIVIA SILVA FIGUEIREDO E RIBEIRO

**“AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE MASTÓCITOS E
SUA RELAÇÃO COM A MATURAÇÃO DAS FIBRAS
COLÁGENAS EM TECIDOS PERIODONTAIS: ESTUDO DE
CASO-CONTROLE”**

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Patrícia Ramos Cury (Orientadora)
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos (Examinador Interno)
Professor da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Profa. Dra. Roberta Santos Tunes (Examinador Externo)
Professora da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda minha família e amigos; a todos que de alguma forma me apoiaram e me conduziram a este momento, em especial aos meus Pais: pessoas ao mesmo tempo tão diferentes, mas comuns na essência dos valores! Sei que estão todos orgulhosos desta minha evolução profissional e pessoal.

*“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso cante, dance,
ria e VIVA intensamente antes que a cortina se feche e a peça termine sem
aplausos.”*

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade da Vida, minha e dos meus entes queridos.

À minha mãe Ana Maria, sem dúvida merecedora de todos os meus esforços, por você quero ir mais além. Agradeço pelo seu amor incondicional.

À meu pai Danton Wilson, grande incentivador desta trajetória, que demonstra de modo particular todo seu amor. Agradeço pela segurança que você sempre nos proporcionou e pelo seu exemplo de bondade e honestidade.

À tia Carminha, pelo carinho e acolhida constantes, por ouvir algumas vezes de você que “a educação é libertadora”- fonte de inspiração para renovar e aprimorar o saber.

Aos meus irmãos, Leila, Maine e Dan, pela amizade, incentivo e momentos de descontração! Juntos, formamos o melhor time possível: nossa Família! A meu cunhado e meus sobrinhos, pelos momentos de riso fácil. Aos Ribeiro's e aos Silva, todos especiais!

À Mateus, meu confidente e incentivador. Obrigada por todos os momentos compartilhados, por deixar meus dias mais doces e alegres; pelos momentos de compreensão e conforto, por acreditar e confiar em mim, às vezes mais do que eu mesma. Carinho estendido a todos os Caponi.

De forma especial agradeço à professora Dr^a Patricia Ramos Cury, minha orientadora de algum tempo! Tenho respeito e admiração pelo seu trabalho e só tenho a dizer obrigada pelo constante aprendizado, estímulo, confiança e amizade que desenvolvemos ao longo dos anos. Não chegaria até aqui sem você.

Ao professor Dr Jean Nunes dos Santos, fundamental em etapas importantes deste trabalho; e aos demais professores do curso de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde, pelos conhecimentos transmitidos e por serem exemplo a serem seguidos.

À professora Elizabeth Maria Costa de Carvalho, por todo incentivo e por sempre lembrar-se de mim nos estágios e atividades extracurriculares.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Periodontia, em especial à Jorge Filho, por ouvir minhas dúvidas e ajudar a resolvê-las de forma simples e amigável; e a todos os colegas da Pós-Graduação, em especial à Anne, Dani, Mônica, Lu: amizade criada que levarei para sempre!

Aos funcionários de toda Universidade Federal da Bahia, especialmente aos da Faculdade de Odontologia (FO-UFBA): Edilson Amancio e Taila Pereira, pela ajuda nos laboratórios.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de Mestrado, investimento fornecido em prol da Ciência e do meu crescimento profissional.

RIBEIRO, Livia Silva Figueiredo e. Distribuição de mastócitos e sua relação com a degradação das fibras colágenas em tecidos periodontais: estudo de caso-controle, 80f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a relação entre a distribuição e degranulação de mastócitos (MCs) em tecidos periodontais em casos de periodontite, com a degradação do colágeno e com parâmetros clínicos de profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e distância da junção cimento-esmalte à margem gengival.

Materiais e métodos: Trinta e quatro amostras foram selecionadas, sendo 16 de periodontite (grupo caso) e 18 de saúde ou gengivite (grupo controle). Imunohistoquímica foi feita para identificação de MCs e coloração de Picrosirius para avaliar as fibras colágenas. O número de MCs foi determinado por mm^2 no epitélio oral, epitélio juncional e na lâmina própria em microscopia de luz convencional e a avaliação da degranulação de MCs e do colágeno foram feitas no tecido conjuntivo. Teste t e qui-quadrado ($p < 0,05$) foram feitos para comparar os dois grupos e a correlação de Pearson foi feita para analisar a relação dos MCs e os parâmetros clínicos periodontais. **Resultados:** A quantidade de mastócitos foi significativamente maior ($p = 0,04$) no grupo caso ($339,01 \pm 188,94 \text{ MCs/mm}^2$) comparada ao grupo controle ($211,14 \pm 131,13 \text{ MCs/mm}^2$) no tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório. Não houve relação entre a degradação do colágeno entre os grupos, nem da degranulação e o diagnóstico periodontal e nem entre a degranulação e degradação das fibras colágenas ($p \geq 0,30$). No grupo controle houve relação entre maior número de MCs no tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório e a degradação de colágeno ($p = 0,001$). Houve correlação significativa entre o número de MCs e a profundidade de sondagem ($p = 0,04$). **Conclusão:** Os mastócitos estão envolvidos na patogênese das doenças periodontais, independente do estágio da doença e podem estar associados à degradação das fibras colágenas do tecido conjuntivo gengival na saúde periodontal e nos estágios iniciais das doenças periodontais.

Palavras chaves: Mastócitos, periodontite, gengivite, colágeno, caso-controle.

RIBEIRO, Livia Silva Figueiredo e. Distribution of mast cells and its relationship with the degradation of collagen fibers in periodontal tissue: case-control, 80f. Thesis (Master's Degree). School of Dentistry, Federal University of Bahia, Salvador, 2016.

ABSTRACT

Aim: To evaluate the relationship between the distribution and degranulation of mast cells (MCs) in periodontal tissues in cases of periodontitis, with the degradation of collagen and clinical parameters of probing depth, clinical attachment level and distance from the cemento-enamel junction to gingival margin. **Methods:** Thirty-four cases were selected, 16 of periodontitis (case group) and 18 health or gingivitis (control group). Immunohistochemistry was performed to identify MCs and picosirius staining to assess the collagen fibers. The number of MCs was determined by mm^2 in oral epithelium, junctional epithelium and lamina propria in conventional light microscopy and evaluation of degranulation of MCs were made in collagen connective tissue. Chi-square test and t test ($p < 0.05$) were made to compare the two groups and Pearson correlation was made to examine the relationship of MCs and periodontal clinical parameters. **Results:** The number of mast cells was significantly higher ($p = 0.04$) in the case group (339.01 ± 188.94 MCs/ mm^2) compared to the control group (211.14 ± 131.13 MCs/ mm^2) in the connective tissue with inflammatory infiltrate. There was no significant relationship between collagen degradation and groups, or degranulation and periodontal diagnosis or between degranulation and collagen fibers degradation ($p \geq 0.30$). In the control group there was a relationship between more MCs in connective tissue without inflammatory infiltrate and collagen degradation ($p = 0.001$). There was a significant correlation between the number of MCs and probing depth ($p = 0.04$). **Conclusion:** Mast cells are involved in the pathogenesis of periodontal diseases, regardless of the stage of the disease and can be associated to the collagen degradation in health periodontal tissue and in early stages of periodontal diseases.

Key words: Mast cells, periodontitis, gingivitis, collagen, case-control

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático do corte histológico da anatomia periodontal.	19
Figura 2. Modelo da Etiopatogênese da Doença Periodontal de humanos.	23
Figura 3. Origem dos mastócitos a partir de células hematopoiéticas pluripotentes da medula óssea.	24
Figura 4. Mastócitos ativados degranulam e liberam no meio extracelular seus grânulos ou mediadores bioativos.	26
Figura 5. Fotomicrografia de Imunohistoquímica nos grupos caso e controle.	56
Figura 6. Fotomicrografia de Picrosirius nos grupos caso e controle.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificidade, clone, tratamento para recuperação antigênica, diluição e controle dos anticorpos primários utilizados no estudo imunohistoquímico.	49
Tabela 2. Médias e desvios padrões do número de mastócitos por mm ² por região histológica nos grupos caso e controle.	54
Tabela 3. Degranulação de mastócitos no tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório e no tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório nos grupos caso e controle.	55
Tabela 4. Degradação do colágeno no tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório e no tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório nos grupos caso e controle.	57
Tabela 5. Relação entre a degradação das fibras colágenas no tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório e no tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório e a degranulação de mastócitos nos grupos caso e controle.	59
Tabela 6. Relação das médias e desvios padrões do número de mastócitos por mm ² nas regiões histológicas e a degradação das fibras colágenas do tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório no grupo controle.	60
Tabela 7. Relação das médias e desvios padrões do número de mastócitos por mm ² nas regiões histológicas e a degradação das fibras colágenas do tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório no grupo caso.	61
Tabela 8. Média ± Desvio padrão dos parâmetros clínicos periodontais (mm) nos grupos caso e controle.	62
Tabela 9. Correlação do número de mastócitos por mm ² de cada região histológica com os parâmetros clínicos periodontais.	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ac – Anticorpo
Ag – Antígeno
BSA – Proteína albumina sérica bovina
CA – Califórnia
CD4 – Cluster of Differentiation 4, do inglês
CD8 – Cluster of Differentiation 8, do inglês
CD34 – Cluster of Differentiation 34, do inglês
CP – Periodontite Crônica
DP – Doença Periodontal
DPIG – Gengivite induzida por placa
EJ – Epitélio Juncional
ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, do inglês
EO – Epitélio oral
EOS – Epitélio oral do sulco
et al. – E colaboradores
GM-CSF – Fator estimulador de granulócitos e macrófagos
HE – Hematoxilina-eosina
HIV– Vírus da imunodeficiência humana
HAART – Tratamento anti-retroviral
ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1
IgE – Imunoglobulina E
IgG₂ – Imunoglobulina G₂
IgG₄ – Imunoglobulina G₄
ELAM-1 – Molécula de adesão leucócito-endotélio 1
IL – Interleucina
IL- 2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
IL-6 – Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
IL-1 β – Interleucina 1-beta
INF- γ – Interferon Gama
JCE – Junção cimento-esmalte
LCP – Periodontite crônica localizada

LPS – Lipopolissacarídeo
LTC₄ – Leucotrieno C₄
MC – Mastócito
MC_{TC} – Mastócito de tecido conjuntivo
MC_T – Mastócito de mucosa
MG – Margem gengival
mm – Milímetro
mm² – Milímetros quadrados
MMPs – Metaloproteinases da matriz
NIC – Nível clínico de inserção
NO – Óxido nítrico
p – Probabilidade de erro
PAF – Fator estimulador de plaquetas
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGD₂ – Prostaglandina D₂
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PMN – Polimorfosnucleares
PS – Profundidade de sondagem
RNAm – RNA mensageiro
SS – Sangramento à sondagem
TC – Tecido conjuntivo
TCI – Tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório
TCSI – Tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório
TGF-β – Fator transformador de crescimento Beta
Th – Célula T *helper*
Th1 – Célula T *helper* 1
Th2 – Célula T *helper* 2
TIMP – Inibidor de metaloproteinase
TNF-α – Fator de Necrose Tumoral Alfa
USA – Estados Unidos da América
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
% – Porcentagem
® – Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Tecidos Periodontais	16
2.1.1 O Tecido Gengival	16
2.2 Etiopatogênese da Doença Periodontal	19
2.3 Mastócitos	23
2.4 Mastócitos nos Tecidos Periodontais	28
2.5 Relação entre Mastócitos e Fibras Colágenas	39
3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos Específicos	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Considerações Éticas	48
4.2 Amostra	48
4.3 Processamento da amostra	49
4.4 Análise Microscópica	51
4.5 Análise Estatística	52
5 RESULTADOS	54
5.1 Degranulação de Mastócitos	55
5.2 Degradação das Fibras Colágenas	57
5.3 Relação entre degranulação de Mastócitos e Degradação das Fibras Colágenas	59
5.4 Relação entre o número de Mastócitos e Degradação das Fibras Colágenas	60
5.5 Correlação entre o número de Mastócitos e Parâmetros Periodontais	62
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXO	80

1 INTRODUÇÃO

A saúde periodontal ocorre na cavidade bucal quando existe um estado de equilíbrio entre os microorganismos periodontopatogênicos e o hospedeiro, não resultando em danos aos tecidos periodontais (GENCO, 1992). A periodontite é uma infecção inflamatória crônica caracterizada pela interação entre bactérias periodontopatogênicas e a resposta inflamatória do hospedeiro, resultando na liberação de mediadores químicos pró-inflamatórios que levam à destruição dos tecidos periodontais e conseqüentemente, à perda óssea alveolar. Em sítios doentes, o desafio microbiano resulta em alterações no mecanismo normal de defesa inata no periodonto (DARVEAU, 2010) ocorrendo alterações significantes nas proporções de populações de células específicas, incluindo fibroblastos, mastócitos, macrófagos e células inflamatórias (CHO & GARANT, 2000).

Os mastócitos são tidos como efetores cruciais em condições inflamatórias crônicas como, artrite reumatóide (LEE et al., 2002), arteriosclerose (HANSSON, 1999) e periodontite (GEMMELL et al., 2004a; STEINSVOLL et al., 2004). Nos tecidos periodontais eles estão presentes dentro e abaixo do epitélio gengival (ZACHRISSON & SCHULTZ-HAUDT, 1968; STEINSVOLL et al., 1999) e são encontrados em tecidos gengivais saudáveis e doentes, (LINDHE et al., 2008). Quando ativados por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos podem liberar mediadores químicos pró-inflamatórios, diversas citocinas, proteínas séricas e metaloproteinases da matriz (MMP) (BEFUS et al., 1987; BEFUS et al., 1999; NAESSER et al., 2003). O papel dos mastócitos nas doenças periodontais é tema diverso. Em tecidos gengivais inflamados e em cicatrização, alguns autores encontraram

elevação da quantidade destas células (SHARPIRO et al., 1969; KENNETT et al., 1993; BATISTA et al., 2005; LAGDIVE et al., 2013; HUANG et al. 2013) e outros observaram redução do número de mastócitos (SHELTON, 1968; ROBINSON & DE MARCO, 1972; GEMMELL et al., 2004a).

Além dos mastócitos, outra célula abundante no tecido periodontal é o fibroblasto. Eles sintetizam as proteínas de colágeno e elastina (CAIRNS & WALLS, 1997). A ativação de mastócitos é uma característica de inflamação crônica, condição que pode conduzir à fibrose tecidual como resultado do aumento da síntese de colágeno pelos fibroblastos (CAIRNS & WALLS, 1997) ou à degeneração das fibras colágenas (GOLIJANIN et al. 2015). Evidências apontam para uma estreita interação entre mastócitos e fibroblastos, que pode ser crucial na patogênese de diversas doenças, como doença pulmonar fibrótica, formação de quelóide, doença crônica do enxerto versus hospedeiro, no reparo de feridas e outras condições crônicas (ATKINS, 1987; ROUSS & CAUGHEY, 1995; CASTRO et al., 2014). A absorção de grânulos de mastócitos degranulados por fibroblastos sugere que componentes granulares dos mastócitos possam modular a função das células do tecido conjuntivo (ATKINS, 1985).

Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a distribuição dos mastócitos nos tecidos periodontais e sua relação com a degradação do colágeno nestes mesmos tecidos, clinicamente normais ou inflamados, bem como avaliar a relação entre a distribuição de mastócitos e os parâmetros clínicos periodontais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecidos Periodontais

O periodonto corresponde a todos os tecidos de suporte dos dentes, formado pela gengiva, ligamento periodontal, cimento radicular e osso alveolar. Cada componente periodontal é formado por estruturas especializadas e suas características estruturais estão diretamente relacionadas às suas funções. Além disso, o bom funcionamento do periodonto só é conseguido através da integridade e pela interação entre os seus componentes (NANCI & BOSSHAEDT, 2006).

O periodonto de proteção compreende toda a extensão da gengiva. Clinicamente ela é a parte da mucosa oral que reveste o osso alveolar e circunda a parte cervical dos dentes (CHO & GARANT, 2000) enquanto que microscopicamente a gengiva é composta pelo epitélio oral (EO), epitélio juncional (EJ) e tecido conjuntivo (TC) subjacente, também chamado de lâmina própria (NANCI & BOSSHAEDT, 2006; LINDHE et al., 2008).

2.1.1 O Tecido Gengival

O tecido gengival é formado por tecidos epiteliais e tecido conjuntivo. O componente epitelial da gengiva apresenta variações morfológicas que refletem a adaptação deste tecido ao dente e ao osso alveolar. Estas variações incluem o Epitélio Oral do Sulco, Epitélio Oral e o Epitélio Juncional (CHO E GARANT, 2000).

O *epitélio sulcular ou epitélio oral do sulco (EOS)* fica voltado para o dente, porém não entra em contato com a superfície dental (LINDHE et al., 2008).

O *epitélio oral (EO)* é um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado e o principal tipo celular é o queratinócito, correspondendo a cerca de 90% da população total de células epiteliais e sua taxa de renovação acontece a cada 9-12 dias (CHO & GARANT, 2000). Quando o dente está irrompendo há uma aproximação do epitélio oral com epitélio reduzido do órgão do esmalte e posteriormente, essa confluência origina o epitélio juncional (CHO & GARANT, 2000; NANJI & BOSSHAEDT, 2006).

O *epitélio juncional (EJ)* consiste de um epitélio escamoso estratificado que está firmemente aderido à superfície dental, formando uma barreira epitelial contra o biofilme bacteriano, localizado na junção cimento-esmalte em tecido periodontal saudável (CHO & GARANT, 2000). As células do epitélio juncional apresentam uma rápida taxa de renovação celular, acontecendo em média a cada 4-6 dias, significativamente maior que no epitélio oral e favorece um rápido reparo ao dano tecidual (CHO & GARANT, 2000; NANJI & BOSSHAEDT, 2006). Espaços cheios de líquido ocorrem normalmente entre as células do EJ e contêm leucócitos polimorfonucleares e monócitos, que passam a partir do tecido conjuntivo em direção ao sulco gengival (NANJI & BOSSHAEDT, 2006).

O *tecido conjuntivo (TC)* ou lâmina própria é o componente tecidual predominante da gengiva, suporta e está imediatamente subjacente ao epitélio juncional. Os principais componentes do tecido conjuntivo gengival são os fibroblastos, fibras colágenas, vasos, nervos e matriz extracelular (LINDHE et al., 2008) e este tecido apresenta alta taxa de renovação celular, favorecendo à uma boa capacidade regenerativa e de cicatrização. A matriz de colágeno é organizada em feixes de fibras, que constituem o aparelho de fibras colágenas

gengivais e apresenta uma extensiva rede vascular (CHO & GARANT, 2000; NANCI & BOSSHAEDT, 2006). Fisiologicamente, diversos tipos celulares (macrófagos, neutrófilos, linfócitos, mastócitos) continuamente extravasam de capilares e migram em direção ao epitélio juncional e epitélio sulcular, eventualmente para o fluido da cavidade bucal, não resultando em nenhuma alteração tecidual. Assim, mesmo em condições clínicas normais, a lâmina própria apresenta células componentes do infiltrado inflamatório, apresentando um estado inflamatório subclínico (NANCI & BOSSHAEDT, 2006). Os feixes de colágeno estão ancorados nas fibras extrínsecas do cemento acelular, abaixo do ponto terminal do epitélio juncional e formam a inserção de tecido conjuntivo, o qual suporta o epitélio juncional (NANCI & BOSSHAEDT, 2006). A estabilidade desta inserção do tecido conjuntivo é um fator essencial na limitação da migração do epitélio juncional (CHO & GARANT, 2000) e manutenção da saúde periodontal. O colágeno tipo I é o principal tipo encontrado, representando cerca de 85% das fibras colágenas gengivais e o colágeno tipo III pode ser encontrado em menores proporções (PAGE & SHROEDER, 1976).

Além das células inflamatórias, os mastócitos (MCs) também são encontrados nos tecidos periodontais tanto em condições de saúde quanto de doenças periodontais, especialmente próximos aos vasos sanguíneos do tecido conjuntivo (PAGE & SHROEDER, 1976; LINDHE et al., 2008). Em casos de doenças periodontais a inflamação predomina devido à ativação de inúmeras células, como linfócitos, macrófagos, fibroblastos, mastócitos e liberação de mediadores pró-inflamatórios. Alterações nos tecidos gengivais na condição de

doença incluem a degradação de colágeno e perda de função dos tecidos (GOLINJANIN et al.,2015).

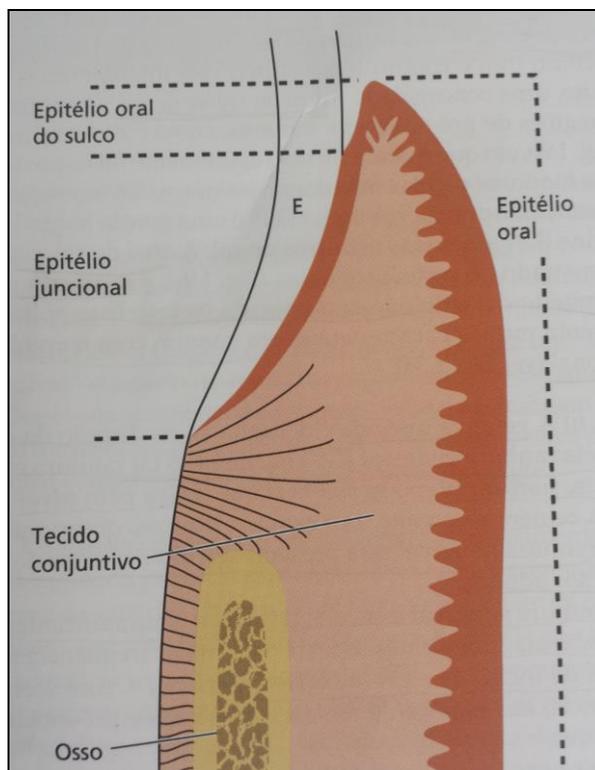


Figura 1. Desenho esquemático do corte histológico da anatomia periodontal. Fonte: Lindhe et al., 2008; 5ª ed.

2.2 Etiopatogênese da Doença Periodontal

A saúde periodontal ocorre no microambiente bucal quando existe um estado de equilíbrio entre os microorganismos periodontopatogênicos e o hospedeiro, não resultando em danos aos tecidos periodontais (GENCO, 1992). Gengivite e Periodontite são doenças infecciosas e inflamatórias que acometem os tecidos periodontais de uma grande porcentagem da população mundial, inclusive dos mais jovens (NANCI & BOSSHAEDT, 2006).

O agente etiológico destas doenças é o biofilme bacteriano colonizado por bactérias. Entretanto, sabe-se que apenas a presença de bactérias patogênicas é insuficiente para o desenvolvimento da doença (GEMMELL et

al., 2002) e admite-se que a resposta imunológica e inflamatória do hospedeiro ao desafio bacteriano desempenhe um papel importante tanto para a iniciação quanto progressão da doença (HUANG et al., 2013). O avanço da doença ocorre devido a uma combinação de fatores, incluindo a presença de bactérias periodontopatogênicas, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, metaloproteinases da matriz (MMPs), prostaglandina E₂ (PGE₂) e baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias, incluindo a interleucina-10 (IL-10) (GEMMELL & SAYMOUR, 2004b).

Inicialmente o biofilme é formado de bactérias gram-positivas, presentes na superfície dos dentes e do sulco gengival (PAGE & KONMAN, 1997). Esta organização em biofilme confere condições favoráveis para o desenvolvimento microbiano já que retêm substâncias produzidas pelas próprias bactérias e ao mesmo tempo as protege de elementos de defesa do hospedeiro e de agentes antimicrobianos. Células fagocitárias como neutrófilos e macrófagos constituem a primeira linha de defesa contra infecções bacterianas, sendo responsáveis pela resposta imunológica inata. Neutrófilos podem ser encontrados dentro do sulco gengival e migram através do epitélio juncional em todos os estágios da doença periodontal para tentar conter a infecção (GEMMEL & SAYMOUR, 2004b). Neste momento ocorre aumento da permeabilidade dos capilares gengivais, aumento da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, ELAM-1), ativação de componentes do sistema complemento e de enzimas, como as metaloproteinases da matriz (MMPs) (GENCO, 1992; GEMMEL & SAYMOUR, 2004b; DARVEOU, 2010) que perpetuam a resposta inflamatória. Microscopicamente as alterações teciduais observadas incluem a proliferação do epitélio juncional, levando à migração celular, vasculite dos vasos

sanguíneos, destruição das fibras colágenas e aumento progressivo do infiltrado inflamatório (PAGE & SHOROEDER, 1976). A persistência bacteriana em proximidade aos tecidos periodontais humanos torna a resposta inflamatória inicialmente aguda, com predomínio de alterações vasculo-exsudativas e degradação de colágeno, em uma lesão crônica, com formação de bolsa periodontal e neste momento os mecanismos efetores desta primeira linha de defesa podem ser insuficientes para eliminar o patógeno, visto que algumas bactérias, principalmente as gram-negativas (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* entre outras), são capazes de evadir a resposta imune inata do hospedeiro, inibindo a migração de neutrófilos e a produção de citocinas pelas células epiteliais (GEMMEL & SEYMOUR, 2004b).

A resposta imune adaptativa é então ativada e o balanço desta resposta imune à infecção é regulado pelas citocinas produzidas pelas células T *helper* (Th), tanto das células Th1 quanto das células Th2 (GEMMEL & SEYMOUR, 2004b). Ambas as células Th1 e Th2 expressam o marcador CD4⁺, mas são distintas umas das outras por sua produção de citocinas. As células Th1 produzem principalmente IL-2, IFN- γ e TNF- α enquanto que as células Th2 produzem IL-4 e IL-6 (GEMMEL & SEYMOUR, 2004b). Todas estas citocinas tem várias funções e podem ativar outras células T, incluindo as células T citotóxicas, que expressam o marcador CD8⁺ (LINDHE et al., 2008). Outra grande quantidade de antígenos que ocorrem no ambiente periodontal requer envolvimento de elementos do sistema imune do hospedeiro diferente daqueles envolvidos na imunidade mediada por células. Anticorpos específicos são produzidos por plasmócitos, que representam o estágio final das células B, e

estão presentes no fluido do sulco gengival. Tem a capacidade de se ligarem a antígenos e caracterizam a imunidade humoral do hospedeiro (GEMMEL & SEYMOUR, 1998). A ativação e diferenciação das células B requerem a presença de algumas citocinas, principalmente as produzidas pelas células Th2 (GEMMEL & SEYMOUR, 1998).

Vários estudos tendem a confirmar que há uma alteração na população celular do periodonto em casos de doença periodontal. Uma mudança de gengivite para periodontite envolveria a substituição de uma lesão predominantemente composta por células T para uma lesão abundante em células B / plasmócitos (GEMMEL et al., 2002; GEMMEL & SEYMOUR, 2004b; GEMMEL et al., 2004a). Citocinas das células Th1 podem ser o principal mediador inflamatório presente na lesão periodontal inicial e estável, onde a produção de IFN- γ pode aumentar a atividade fagocitária de neutrófilos e macrófagos e conseqüentemente conter a infecção (GEMMEL & SEYMOUR, 2004b). Já na doença avançada, o predomínio de células B pode sugerir o papel das células Th2 na patogênese das doenças periodontais (GEMMEL & SEYMOUR, 2004b). Dados sugerem que lesões de periodontite são reguladas por células Th1 e Th2 (GEMMEL & SEYMOUR 2004b; LINDHE et al., 2008).

Estímulo de mastócitos e subsequente produção de IL-4 pode favorecer a resposta Th2, ativação de células B e produção de anticorpos, podendo contribuir na modulação de eventos celulares e humorais dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas (GEMMEL & SEYMOUR 2004b, VILLA et al., 2001, WELLE et al., 1997), conferindo provavelmente a participação dos mastócitos na patogênese de condições inflamatórias crônicas, como a doença periodontal.

Todos estes eventos ainda sofrem influência de diversos modificadores genéticos e ambientais ou adquiridos (PAGE & KORNMAN, 1997), como hábito de fumar, estresse psicológico e doenças sistêmicas como diabetes. Estes fatores modificam a resposta do hospedeiro e os mecanismos patológicos pelos quais as bactérias causam inflamação, interferindo na progressão e gravidade das doenças periodontais bem como podem responder à enorme variação da suscetibilidade entre os indivíduos quanto ao desenvolvimento das doenças periodontais (PAGE et al., 1997).

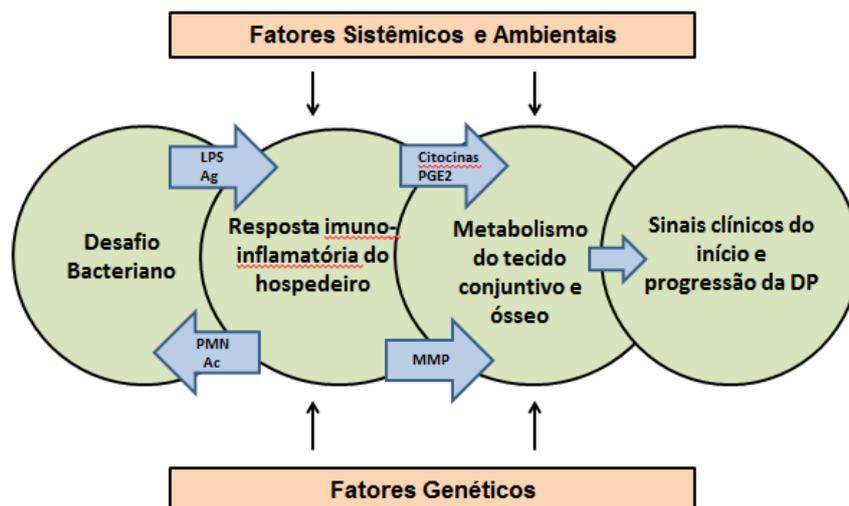


Figura 2. Modelo da Etiopatogênese da Doença Periodontal de humanos. *LPS*: Lipopolissacarídeo; *Ag*: Antígeno; *PMN*: Polimorfosnucléares; *Ac*: Anticorpo; *PGE₂*: Prostaglandina E₂; *MMP*: Metaloproteinase de matriz. Adaptado de Page & Kornman, 1997.

2.3 Mastócitos

Os mastócitos (MCs) são células globosas, grandes, com núcleo esférico e central, o qual se apresenta geralmente encoberto pela granulação basófila que ocupa seu citoplasma, principalmente grânulos de histamina, serotonina, heparina e proteases. São derivadas de progenitores

hematopoiéticos CD34⁺ da medula óssea e, em geral, não são encontrados na circulação sanguínea (STEINSVOLL et al., 2004; CURVINEL et al., 2010). Da medula óssea, os progenitores migram para os tecidos periféricos como células imaturas e se diferenciam em MCs *in situ*, de acordo com as características particulares do microambiente em que estão (STEINSVOLL et al., 2004; HALLGREN & PJLER, 2006). São 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 ou apresentam o fenótipo de mucosa (MC_T), expressando apenas triptase (WALSH et al., 1995), figura 3.

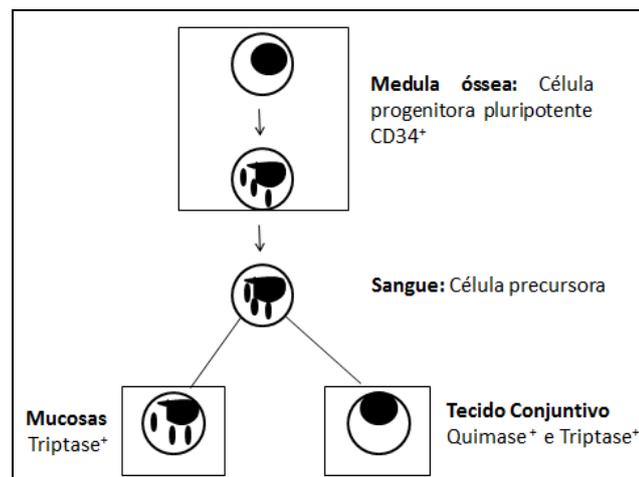


Figura 3. Origem dos mastócitos a partir de células hematopoiéticas pluripotentes da medula óssea. Se diferenciam na medula, em seguida vão para corrente sanguínea e completam sua diferenciação no microambiente em que se encontram. (Adaptado de Steinsvoll et al., 2004).

Os mastócitos estão presentes em praticamente todos os tecidos humanos (GALLI et al., 1999), distribuindo-se estrategicamente nos tecidos vascularizados, epitélio e próximo de vasos, nervos, células musculares, vias aéreas, trato gastro-intestinal, sendo particularmente abundantes em áreas de

contato com o meio ambiente e desempenham papel primordial nas reações inflamatórias (METCALFE et al., 1997; GALLI et al., 2005).

A membrana dos mastócitos apresentam receptores de alta afinidade para as moléculas de IgE, e são ativados pelo reconhecimento de antígenos multivalentes pelas IgEs. Estímulos como produtos da ativação do sistema complemento, venenos de animais, neuropeptídeos e diversos agentes físicos (trauma mecânico, calor, frio) podem ativar mastócitos, independentemente da ligação de IgE (CURVINEL et al., 2010). Quando ativados, os mastócitos degranulam e diversas substâncias pré-formadas são liberadas no espaço extracelular seguidas pela liberação de mediadores neoformados (CURVINEL et al., 2010). A quantidade e a qualidade da degranulação depende da natureza e intensidade do estímulo, bem como do pH e da temperatura do meio (METCALFE et al., 1997).

Os mediadores produzidos e liberados pelos mastócitos possuem diferentes atividades biológicas (RECH & GRAÇA, 2006), sendo que um mediador pode ter múltiplas funções, bem como vários deles podem ter funções similares (METCALFE et al., 1997), sendo importantes principalmente tanto nas respostas inflamatórias quanto nas respostas alérgicas (RODINI et al., 2004).

Os mastócitos ativados podem ainda sintetizar novos mediadores vasoativos, como por exemplo, fator ativador de plaquetas (PAF), mediadores quimiotáticos, fator estimulador de crescimento de colônias de macrófagos (GM-CSF), fator de necrose tumoral α (TNF- α), fator transformador de crescimento β (TGF- β), fatores de crescimento e de angiogênese (VEGF e PDGF), derivados do ácido araquidônico (leucotrienos e prostaglandinas) e

uma série de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN- γ (CHARTEJJE et al., 2008; WALSH, 2003). Além disso, estas células são uma rica fonte de enzimas proteolíticas, tais como triptase, quimase e o ácido hialurônico, que participam na degradação do tecido conjuntivo (BARNETT, 1973a; MARSHALL, 2004; CHATTERJEE et al., 2008), figura 4.

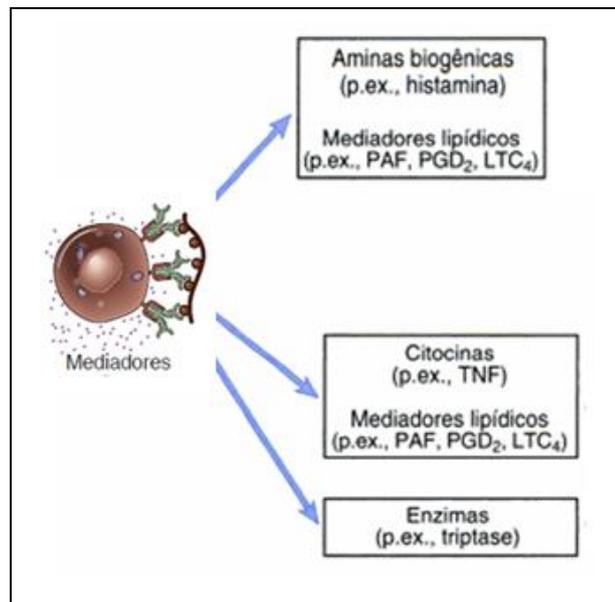


Figura 4. Mastócitos ativados degranulam e liberam no meio extracelular seus grânulos ou mediadores bioativos. PAF: Fator ativador de plaquetas; PGD₂: Prostaglandina D₂; LTC₄: Leucotrieno C₄. (Adaptado de Abbas *et al.*, 6ª edição, 2008).

Esta ampla variedade de mediadores liberados pelos mastócitos altera o microambiente em que estão e permite desenvolver e modular diversos processos fisiológicos e patológicos. São amplamente considerados como células efetoras importantes nas respostas inflamatórias de hipersensibilidade imediata e tardia e na patogênese da inflamação crônica, contribuindo para a iniciação e amplificação dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas (RODINI et al., 2004). Embora a participação dos mastócitos na fagocitose e/ou apresentação de antígenos seja, em muitos

casos, pequena (em comparação com outros tipos de células) não há dúvida de que eles são extremamente eficientes em iniciar a inflamação (GALLI et al., 1999).

WALSH et al. (1995) evidenciaram que os mastócitos apresentam também o potencial de influenciar as células vizinhas, através do conteúdo de seus grânulos, resultando em efeito inibitório, tóxico ou estimulador. Também são capazes de ativar os linfócitos T *naïve* em células efectoras, assim como respostas de anticorpos à antígenos específicos (RODINI et al., 2004).

PINHEIRO (2006) relata os possíveis mecanismos para a participação dos mastócitos através de seus mediadores, no processo de colagenização. Os fibroblastos são estimulados pela histamina liberada pelos MCs e aumentam a síntese de colágeno *in vitro* e *in vivo*. O crescimento dos fibroblastos e o aumento na síntese de colágeno também sofrem influencia da heparina. A triptase dos mastócitos induz a proliferação de fibroblastos *in vitro*, além de ser um fator fibrogênico capaz de estimular a síntese de RNAm e quimiotaxia.

Os métodos histoquímicos mais eficientes para marcação dos MCs são o azul de toluidina em pH baixo e técnicas imunohistoquímicas para detectar especificamente triptase ou quimase (METCALFE et al., 1997; JOLLY et al., 1999). Nas técnicas imunohistoquímicas utilizam-se anticorpos monoclonais contra triptase e quimase, ou contra receptores de superfície dos MCs (JOLLY et al., 1999; RAMIREZ-ROMERO et al., 2000). As proteases são o melhor marcador específico para MCs (METCALFE et al., 1997).

2.4 Mastócitos nos Tecidos Periodontais

Os mastócitos (MCs) são encontrados em todos os tecidos da cavidade bucal, sendo encontrados nos tecidos periodontais tanto em condições de saúde quanto de doença (WALSH et al., 1995). O número de mastócitos detectados é diferente para os diferentes tecidos periodontais (STEINSVOLL et al., 2004; BATISTA et al., 2005) e ainda não está claro se há uma real mudança na população de mastócitos nos tecidos gengivais durante a inflamação (BATISTA et al., 2005).

Embora exista uma significativa contribuição dos mastócitos e seus mediadores para a destruição tecidual e propagação da resposta inflamatória, fazendo com que esse tipo celular em atividade potencialize o dano tecidual (VAN DYKE & KORNMAN, 2008), a contribuição dos mastócitos na progressão da doença periodontal ainda não está bem estabelecida (BATISTA et al., 2005). Entre os mediadores derivados dos MCs, a heparina, histamina, óxido nítrico (NO) e citocinas, como o TNF- α , provavelmente contribuem para a destruição tecidual periodontal e reabsorção óssea alveolar, com objetivo de eliminar os produtos bacterianos (BATISTA et al., 2005). Já se sabe que a liberação de histamina, principal mediador liberado pelos MCs, aumenta a permeabilidade capilar, o edema e favorece diretamente a migração de células inflamatórias para a área que estão (VEHABI et al., 2010) e estas mudanças representam a principal característica histopatológica das doenças periodontais (AESCHLIMANN et al., 1980). Presume-se que os MCs presentes no tecido gengival são a principal fonte de histamina e por esta razão, variações na população de MCs podem estar relacionadas aos diferentes níveis de saúde periodontal (AESCHLIMANN et al., 1980).

CARRANZA & CABRINI (1955) foram os primeiros a pesquisar a presença de mastócitos em casos de doença periodontal humana. Eles observaram um grande número de MCs tanto em tecido gengival normal quanto em casos de gengivite.

SANTOS (1961) estudou a presença de MCs nas doenças periodontais humanas, suas características morfológicas e localização. Foi notado aumento proporcional de MCs com aumento de células do infiltrado inflamatório.

SHAPIRO et al. (1969) realizaram um estudo com objetivo de determinar se há aumento de MCs em casos de doença periodontal crônica. Biópsias da região de pré-molar superior foram obtidas de 35 indivíduos (14-50 anos) com doença periodontal crônica apresentando bolsas periodontais variando de 4 a 6 mm de profundidade e estes indivíduos representavam o grupo caso (grupo I). O controle (grupo II) foi composto por 13 indivíduos (15-64 anos) com gengiva clinicamente saudável e as biópsias também foram feitas na região de pré-molar superior. Os fragmentos foram processados com coloração de hematoxilina-eosina (HE) e azul de toluidina e os MCs foram contados em microscopia de luz, 400x, por um único examinador que não tinha informação sobre o diagnóstico clínico dos espécimes. A média do número de MCs encontrada no grupo I foi de 4,7, enquanto que a média do grupo controle foi de 2,7 MCs. O número médio de MCs por campo microscópio no grupo I variou entre 0,7 a 13,4, enquanto no grupo II, a variação foi de 0,4 a 6,8 células. Além disso, no grupo controle, 11 dos 13 cortes (84,6%) apresentaram menos de 4 MCs por campo analisado e no grupo caso, 19 dos 35 cortes (71,4%) mostraram média de 2 a 6 MCs por campo analisado. Os dados foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$) e mostraram maior número de MCs no

grupo caso do que nos indivíduos clinicamente saudáveis. Os autores concluíram que a reabsorção óssea alveolar pode então estar relacionada com o aumento da quantidade de mastócitos nos tecidos gengivais.

BARNETT (1973a, 1973b) descreveu várias diferenças entre os MCs no tecido epitelial e conjuntivo vistos na doença periodontal e na saúde. Os MCs epiteliais vistos em gengiva saudável apresentavam grânulos numerosos e distribuídos por toda célula, degranulação vista ocasionalmente e o núcleo nem sempre podia ser visto. Os MCs epiteliais da bolsa periodontal apresentaram características indicativas de maior atividade celular, com nucléolo proeminente sugestivo de maior síntese protéica e degranulação próxima aos queratinócitos. A partir dessas observações morfológicas, BARNETT (1973a) sugeriu que os MCs epiteliais poderiam migrar da lâmina própria para o epitélio sulcular da bolsa e assim participar da etiopatogenia de algumas doenças bucais. Na patogênese da doença periodontal, os MCs atuariam através de suas proteases, aumentando a permeabilidade tecidual e o tamanho dos espaços inter-celulares, favorecendo a migração de bactérias e suas toxinas, leucócitos e anticorpos da corrente sanguínea para o foco de infecção, resultando nas alterações teciduais observadas na gengivite.

AESCHLIMANN et al. (1980) analisaram se há efeito da terapia periodontal sobre a população de MCs. Oito indivíduos (20-58 anos) sistemicamente saudáveis e com periodontite crônica participaram do estudo. Durante a fase inicial de terapia, uma pequena biópsia de tecido gengival foi feita imediatamente antes da raspagem radicular. Foi realizado todo procedimento de raspagem supra e subgengival associado às orientações de higiene bucal. Após 4 semanas foi feita uma segunda biópsia e a cirurgia

periodontal. Depois de 4 meses uma terceira biópsia foi realizada e o espécime foi processado para avaliação histológica sob coloração de azul de toluidina para determinar a população de MCs. As médias de MCs por mm^2 no epitélio oral foi de 101,6; 99,3 e 115,6 ($p < 0,001$) na primeira, segunda e terceira análise respectivamente. As análises mostraram que o número de MCs não mudou significativamente no EO após 4 semanas de realizada a raspagem periodontal. Entretanto, a média de MCs aumentou significativamente após os 4 meses de realizada a cirurgia periodontal comparada com a média após as 4 semanas. Histologicamente a aparência tecidual não melhorou após as 4 semanas de realizada a raspagem e o infiltrado inflamatório era muito similar ao encontrado na biópsia inicial. Contudo, a análise feita após a cirurgia periodontal evidenciou quase que o total de ausência de células inflamatórias e um aumento de fibroblastos e fibras colágenas com reparo do estroma do TC, bem como um aumento do número de mastócitos. Essa melhora histológica do tecido gengival deveu-se ao fato de que durante a cirurgia periodontal, o epitélio inflamado foi removido. Concluiu-se que o número de mastócitos encontrados foi inversamente proporcional ao grau de inflamação.

ASARO et al. (1983) reportaram que fenômenos de hipersensibilidade imediata e/ou tardia possam ser um dos mecanismos imunológicos ativos na doença periodontal humana, já que todos os componentes necessários para estas reações têm sido identificados em tecido gengivais, sugerindo ainda um potencial de interação entre MCs e outros componentes do sistema imune. Esta interação contribuiria para a modulação dos eventos celulares e humorais dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas,

inclusive participando na patogênese de condições inflamatórias tais como a doença periodontal inflamatória.

WALSH et al. (1995) avaliaram a relação entre a degranulação dos MCs e a inflamação na cavidade bucal. Fragmentos de tecidos foram removidos da mucosa bucal normal (n=15), de líquen plano oral (n=29), de gengivite experimental após 07 dias sem higiene bucal (n=10), de lesão periapical (n=48) e da polpa dental (n=12). Os tecidos foram submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-TNF, anti-E-selectina, anti-IgG, anti-histamina, anti-quimase e anti-triptase. Foi observada degranulação dos MCs em todas as lesões inflamatórias, porém não houve diferença na proporção da população celular entre as diferentes lesões. A densidade (MCs/mm²) de MCs no tecido foi relacionada ao nível de expressão de E-selectina, uma molécula de adesão endotelial que é conhecida por ser induzida pelo TNF derivado da degranulação de MCs. Assim, estímulos podem levar à degranulação de MCs, os quais irão liberar no meio extracelular seus diversos mediadores pré-formados e estes mediadores podem atuar nos eventos inflamatórios da cavidade bucal, contribuindo também para as alterações gengivais.

ZHAO et al. (2001) descreveram uma análise rápida e de baixo custo para determinar a liberação de histamina pelos MCs gengivais humanos a partir de estímulos imunológicos e não-imunológicos. A análise consistiu do acoplamento da histamina com uma substância (OPT-o-ftaladeído) em um pH altamente alcalino, formando um produto fluorescente. Usando essa análise eles examinaram a liberação de histamina a partir de uma linhagem de MCs que exhibe as características dos MCs gengivais humanos. Dez amostras de tecidos gengivais humanos saudáveis foram obtidas de indivíduos que foram

submetidos à cirurgia de aumento de coroa e estimuladas com substância P, anti-IgE ou ionóforo de cálcio. Os MCs foram identificados com azul de toluidina. O ionóforo de cálcio aumentou significativamente a liberação de histamina pelos MCs gengivais ($p < 0,05$) enquanto que a substância P e o anti-IgE não ($p > 0,05$).

GEMMEL et al. (2004a) realizaram um estudo com objetivo de determinar a relação entre MCs e a resposta Th1 / Th2 na doença periodontal humana. Fragmentos de tecido gengival foram obtidos de 53 participantes: 22 no grupo saúde periodontal/gengivite e 31 no grupo de periodontite crônica. Imunohistoquímica foi realizada utilizando o anticorpo humano anti-triptase + e c-kit + para MCs e IgG₂⁺ e IgG₄⁺. Os resultados mostraram que os MCs estavam dispersos por todo tecido conjuntivo e ocasionalmente no epitélio subjacente. Também sugeriu em alguns casos que os MCs apareceram em contato com linfócitos, sugerindo uma possível apresentação de antígeno ou algum tipo de comunicação intercelular. O número de MCs diminuiu no grupo de periodontite crônica, comparado ao grupo de saúde/gengivite. Houve aumento das células IgG₄⁺ com aumento da inflamação comparado com IgG₂⁺ no grupo periodontite, indicando predominância da resposta Th2 na periodontite.

BATISTA et al. (2005) analisaram variações e alterações da densidade de MCs humanos a partir de amostras teciduais de indivíduos com gengivite induzida por placa (DPIG) e periodontite crônica localizada (LCP), quantificados por duas técnicas distintas: histoquímica (azul de toluidina) e imunohistoquímica (anticorpo anti-triptase). Um total de 20 casos de LCP, 20 de DPIG e 20 casos de saúde gengival (controle) participaram do estudo.

Casos de saúde foram obtidos a partir de demandas de exodontias por razões ortodônticas e os grupos de doenças foram obtidos a partir de indivíduos submetidos à cirurgia periodontal. As amostras de doenças periodontais apresentaram intenso infiltrado inflamatório (macrófagos, polimorfonucleares, linfócitos e MCs). A análise de MCs por mm^2 com azul de toluidina não apresentou diferença estatística entre os três grupos examinados. Entretanto, com a técnica da imunohistoquímica houve diferença significativa no número de MCs/ mm^2 entre o grupo PCL comparado ao grupo controle e entre o grupo GIPB quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença estatística entre grupos DPIG e LCP. Assim, houve diferença no número de MCs apenas entre os grupos de doença comparados ao grupo controle, enquanto não houve diferença significativa entre os dois diferentes estágios de doença periodontal. Além disso, o número de MCs triptase+ foi significativamente maior que o número de MCs identificados pelo azul de toluidina, evidenciando que embora ambas as técnicas sejam capazes de evidenciar MCs, a imunohistoquímica representou ser uma técnica mais sensível. Foi sugerido um aumento na densidade dos MCs na PCL e na DPIG em relação ao grupo saudável, podendo assim ser indicativo da participação dos MCs nos diferentes estágios da doença periodontal.

VAHABI et al. (2010) avaliaram a correlação do número de MCs nas diferentes doenças periodontais. Biópsias de tecido gengival foram obtidas de 20 indivíduos com periodontite crônica moderada à grave, 19 de periodontite agressiva e 18 de saúde/gengivite (controle). Todos os espécimes foram processados com azul de toluidina para contagem de MCs e HE para mensurar inflamação. Os MCs foram contados abaixo do epitélio. Houve maior

quantidade de MCs no grupo de periodontite cônica comparado aos grupos de periodontite agressiva e saúde/gengivite ($p=0,000$), porém o grupo periodontite agressiva não mostrou maior número de MCs comparado ao grupo saúde/gengivite ($p>0,05$). Também não houve relação entre o número de mastócitos e inflamação nos 3 grupos. Este estudo sugere que o número de MCs pode estar associado com periodontite, especialmente com a periodontite crônica e pode indicar certo envolvimento dos MCs na degradação de tecido periodontal.

SEGUNDO et al. (2013), com objetivo de comparar a densidade de MCs em casos de doença periodontal em indivíduos com HIV sob tratamento anti-retroviral (HAART, por 5-13 anos) e sem HIV, avaliaram se a densidade de MCs pode influenciar no infiltrado inflamatório de indivíduos em HAART e se nestes indivíduos HIV+ a densidade de MCs pode influenciar os níveis de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e a carga viral. A amostra foi de 25 participantes sem HIV e 25 participantes com HIV (30-60 anos). Ambos os grupos apresentavam indivíduos com periodontite crônica (CP, n=15) ou gengivite (CG, n=10). As amostras de tecido gengival foram obtidas a partir de extrações dentárias por razões protéticas ou ortodônticas. Níveis de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e carga viral foram obtidas a partir de dados médicos dos indivíduos HIV dois meses antes da biopsia gengival. As amostras foram processadas conforme protocolo da imunohistoquímica e os MCs foram marcados com anti-c-kit e anti-triptase. Embora indivíduos com HIV apresentassem maiores densidades de c-kit ou triptase nos casos de CG ou CP que os indivíduos sem HIV, não foi observada significância estatística entre os grupos. Apenas a relação entre MCs e linfócito T CD8⁺ pôde ser observada. Indivíduos com HIV e passando pela HAART,

comparados com indivíduos sem HIV não apresentaram diferenças estatisticamente significantes na densidade de MCs nos tecidos gengivais.

LAGDIVE et al. (2013) avaliaram a correlação de MCs nas doenças periodontais. Os autores quantificaram os MCs em casos de saúde e doença periodontal, se há relação com inflamação e com as características clínicas do periodonto. Dez casos de periodontite crônica (CP), 10 casos de gengivite induzida por placa (DPIG) e 10 casos de saúde periodontal foram selecionados. Amostras foram obtidas a partir de pacientes submetidos à cirurgia periodontal para grupos de CP e DPIG e o grupo de saúde, incluídos indivíduos para extração de terceiro molar. Azul de toluidina foi a coloração escolhida para identificação dos MCs, analisados por mm^2 . A média de MCs/ mm^2 no grupo de saúde foi entre $5,8 - 9,5 \pm 1,67 - 5,45$; enquanto que no grupo gengivite foi de $11,2 - 9,2 \pm 4,45 - 5,16$ células/ mm^2 ($p < 0,01$). Comparando-se a densidade de MCs entre grupo saúde e CP, observou-se que a média do grupo saudável variou de $5,8 - 9,5 \pm 1,67 - 5,45$ MCs/ mm^2 , enquanto o valor do grupo CP variou de $19,2 - 26,8 \pm 5,14 - 6,14$ MCs/ mm^2 , ($p < 0,01$). E por fim, a quantificação de MCs nos grupos de DPIG e CP: a média de MCs/ mm^2 no grupo DPIG foi $11,2 - 19,2 \pm 4,45 - 5,16$ MCs/ mm^2 e no grupo CP foi de $19,2 - 26,8 \pm 5,14 - 6,14$ MCs/ mm^2 . Neste estudo, casos de CP apresentaram maior contagem de MCs comparados a gengivite ou sítios em saúde. Aumento da densidade de MCs nos sítios de doença periodontal pode ser indicativo da importância dessas células na progressão da doença periodontal.

HUANG et al. (2013) analisaram a relação entre a degranulação de MCs e a progressão da doença periodontal. Um total de 50 espécimes de tecido

gingival, incluindo periodontite moderada (n=17), periodontite grave (n=18) e saúde periodontal (controle, n=15). As amostras de tecido saudável foram obtidas a partir de dentes submetidos a extrações dentárias por razões ortodônticas, os casos de periodontite moderada a partir de indivíduos indicados à cirurgia periodontal e amostras do grupo de periodontite grave a partir de dentes indicados à extração devido severa perda de inserção e destruição óssea alveolar. Azul de toluidina e imunohistoquímica foram utilizados para identificar os MCs. A degranulação dos MCs foi determinada no microscópio de luz com magnificação de 100x. Com azul de toluidina foi vista discreta degranulação no grupo de saúde periodontal, maior densidade e evidente degranulação no grupo de periodontite moderada ($p<0,01$) e densidade significativamente maior no total de MCs degranulado e intensa degranulação no grupo de periodontite grave ($p<0,01$). Na imunohistoquímica para coloração de triptase, a densidade de MCs foi maior quando comparadas ao azul de toluidina, e maiores tanto a densidade do total de células e quanto de MCs desgranulados nos grupos de periodontite moderada ($p<0,01$) e grave ($p<0,01$). Um maior número de MCs degranulados e de grânulos de MCs triptase-positivas foram observados no grupo grave. A degranulação dos MCs era predominantemente localizada no infiltrado inflamatório de ambos os grupos de periodontite. Assim, o aumento da densidade do total de MCs e de MCs degranulados foi encontrado e observado nos espécimes e estes resultados sugerem um importante papel dos MCs na progressão da doença periodontal em humanos. Demonstraram também que os MCs não devem ser investigados apenas usando o azul de toluidina, principalmente quando se investiga se as células estão degranuladas.

Um estudo recente, de POPOVICI et al. (2014) avaliou a distribuição, densidade e relação dos MCs com os diferentes estágios de inflamação no tecido gengival obtido a partir de indivíduos com doença periodontal. Trinta e nove casos de doença periodontal (15 com inflamação leve, 16 com infiltrado inflamatório moderado e 8 com intensa inflamação tecidual) e doze casos sem alterações significativas do tecido gengival constituíram a amostra. A biópsia de tecido gengival foi obtida e as amostras foram submetidas à análise de HE e imunohistoquímica, utilizando anticorpo anti-triptase. Na gengiva normal, não foram vistas alterações significantes do infiltrado inflamatório e os MCs foram encontrados na lâmina própria e próximo aos vasos sanguíneos, raros no epitélio e a média de MCs foi de 20,12. Nos casos de inflamação leve, observaram aumento da densidade de MCs, difusamente distribuídos na lâmina própria, não estavam restritos ao espaço perivascular e exibiram maior quantidade de degranulação. Pouca quantidade observada próxima ao epitélio ou intraepitelial. A média foi de 44,08 MCs. No grupo de inflamação moderada a média foi de 63,87 MCs, estando concentrados em áreas com denso infiltrado inflamatório. E por fim no grupo de inflamação intensa encontraram diminuição da densidade de MCs, 33,81, em comparação com grupos moderado ($p < 0,0001$) e leve ($p < 0,023$) e localizados entre a lâmina própria e epitélio, já com maior número de MCs intraepitelial. Os autores sugerem que os MCs são um importante componente celular nos diferentes casos de doença periodontal e demonstraram aumento da densidade de MCs nos casos de inflamação moderada e diminuição nos casos de inflamação intensa.

HUANG et al. (2014) quantificaram a triptase-TIM-3 positiva para mastócitos na periodontite crônica humana. Total de 83 espécimes de tecido

gingival foi obtido, sendo 25 periodontalmente saudáveis, 28 indivíduos com periodontite moderada e 30 de periodontite grave. Azul de toluidina foi utilizado para identificar MCs. Poucos MCs degranulados foram vistos nas amostras de tecido saudável, aumentando a degranulação das células nas amostras de periodontite moderada e intensa degranulação nos casos de periodontite grave. Concluíram que comparados com o grupo saudável, houve significativo aumento da densidade (MCs/mm²) de MCs no grupo de periodontite moderada ($p = 0,011$) e ainda maior significância de maior densidade de MCs no grupo periodontite severa ($p < 0,0001$). Além disso, a densidade de MCs do grupo periodontite severa foi significativamente maior que a do grupo periodontite moderada ($p=0,011$). A densidade de triptase TIM-3 no grupo periodontite grave foi significativamente maior que no grupo periodontite moderada.

2.5 Relação entre Mastócitos e Fibras colágenas

O colágeno é o principal componente entre as várias macromoléculas que formam a matriz extracelular da gengiva, representando um papel fundamental na sua arquitetura (SEGUIER et al., 2000; ELIJEL et al., 2003) tanto em casos de tecido gengival saudável quanto doente (ALMEIDA et al., 2015) e sua produção é feita por fibroblastos do tecido conjuntivo gengival (CAIRNS & WALLS, 1997).

A remodelação tecidual é uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal e sua principal característica é a deposição de colágeno (SILVA, 2014). Foi evidenciado que em muitos casos os MCs são encontrados próximos aos fibroblastos e que interações direta ou indiretamente entre MCs e

fibroblastos promovem a inflamação e remodelação tecidual (RIKKIE et al., 2004, ABEL & VLIAGOFTIS, 2008).

Entretanto, a relação dos MCs com as fibras colágenas ainda não é bem definida. Alguns autores relatam que os MCs possam influenciar a degradação do colágeno (BARNETT, 1973b) e outros estudos evidenciam que os MCs podem estimular a fibrose tecidual, com formação excessiva de fibras colágenas pelos fibroblastos (LEVI SCHAFFER & RUBINCHIK, 1995; CAIRNS & WALLS, 1997; CASTRO et al., 2014).

Produtos liberados por bactérias levam à destruição dos tecidos periodontais e o dinamismo destas alterações em termos qualitativos e quantitativos pode causar heterogeneidade do conteúdo de colágeno em diferentes fases da doença (GOLIJANIN et al., 2015). Em resposta às agressões bacterianas, células residentes e inflamatórias dos tecidos liberam diversas moléculas, como citocinas e proteases que destroem os tecidos de suporte (LORENCINI, et al., 2009). Essa liberação desequilibrada de substâncias bacterianas e do hospedeiro resultam em degradação da matriz extracelular de colágeno (OKADA & MUKARAMI, 1998). Durante a doença periodontal, a presença do infiltrado de células inflamatórias nos tecidos gengivais e da degradação do tecido conjuntivo, principalmente de colágeno são bem documentadas (SEGUIER et al., 2001; LORENCINI et al.; 2009, GOLIJANIN *et al.*, 2015), e sua degradação é apontada como o principal marcador da progressão da doença periodontal (LORENCINI *et al.*, 2009). Entre as endopeptidases consideradas essenciais para degradação tecidual estão as metaloproteinases da matriz (MMPs), as quais são produzidas por células inflamatórias residentes dos tecidos (EJEIL et al., 2003) e também

pelos MCs (NAESSE et al., 2003; LAGDIVE et al., 2013). Foi demonstrado que durante a periodontite, o colágeno gengival perdido foi significativamente correlacionado com aumento de células inflamatórias e que a diminuição do colágeno foi associada às MMPs (SEGUIER et al., 2001).

Outra razão que pode sugerir o papel dos MCs na degradação dos tecidos é o fato de a histamina, principal mediador dos MCs, favorecer o dano tecidual por promover edema e facilitar a penetração de células inflamatórias no tecido (LAGDIVE et al., 2013). Além disso, a triptase, enzima proteolítica que está confinada aos grânulos dos MCs, pode clivar componentes do colágeno e ativar a colagenase, a qual pode participar da destruição dos tecidos em casos de periodontite (LAGDIVE et al., 2013).

BARNETT (1973b) selecionou biópsias gengivais para avaliar os MCs e o tecido conjuntivo na doença periodontal. Amostra de cinco pacientes do gênero feminino (20-73 anos) foi rotineiramente processada e analisada em microscopia eletrônica com citrato de chumbo e acetato de uranila. Observou-se a distribuição difusa de MCs por todo o tecido conjuntivo, próximos aos vasos sanguíneos, grânulos próximos à periferia, além de íntima relação destas células com fibras colágenas. Considerou-se que a heparina liberada pelos MCs ativou as colagenases e resultou na degradação das fibras colágenas. A partir desta análise descritiva, sugeriu-se que os MCs teriam um papel relevante na degradação do colágeno.

ATKINS et al. (1985) avaliaram as interações entre MCs, fibroblastos e componentes do tecido conjuntivo. Através de microscopia eles observaram que os grânulos liberados pelos MCs ativados parecem ser fagocitados pelos fibroblastos e por outras células fagocíticas que estejam presentes no local da

degranulação. Os autores sugeriram que os mediadores liberados pelos MCs modularam de alguma forma as funções das células do TC.

Em um estudo de cultura de MCs com fibroblastos demonstrou-se que a ativação de MCs sob certas condições, pode aumentar significativamente a proliferação de fibroblasto e a produção de colágeno, indicando um envolvimento dos MCs nos processos fibróticos (LEVI-SCHAFFER & RUBINCHIK, 1995).

NAESSE et al. (2003) mostraram que os MCs gengivais expressam MMP-1 e MMP-8 e pouco MMP-2 e TIMP-1. Estas observações classificam os MCs entre células chave na patogênese da periodontite: MMPs podem ser liberadas e causar uma rápida degradação da matriz extracelular e destruição do tecido periodontal.

EJEIL et al. (2003) investigou a área ocupada pelas fibras colágenas no tecido gengival saudável e doente e a possível relação entre diversas citocinas (IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α) e a degradação de colágeno durante a doença periodontal. Amostras de tecido gengival da região vestibular foram obtidas a partir de 24 indivíduos (11-40 anos) submetidos à extração dentária. Dividiram-se os participantes em quatro grupos: Grupo 1 – gengiva normal (14-39 anos), Grupo 2 – inflamação gengival leve (11-40 anos), Grupo 3 – inflamação moderada (29-40 anos) e Grupo 4 – inflamação severa (25-40 anos). As citocinas foram quantificadas usando o teste imunoenzimático de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). As células inflamatórias foram avaliadas a partir da coloração de HE e as fibras colágenas a partir de picrosirius e observadas no microscópio de luz polarizada equipado com uma câmera de vídeo. No Grupo 1 a área ocupada pelas fibras colágenas foi maior

do que nos demais grupos ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os Grupos 3 e 4, nem entre o Grupo 2 e os Grupos 3 e 4. Além disso, comparando-se ao Grupo 1, as fibras do Grupo 2 apresentaram-se mais espaçadas e menos coradas; no Grupo 3 estavam bem espaçadas e rarefeitas e no Grupo 4 as fibras apresentaram-se destruídas. As citocinas IL-1 β e IL-4 foram intensamente correlacionadas com a perda de colágeno e sugeriu-se que essas duas citocinas podem ser marcadores clínicos da severidade da periodontite.

LORENCINI et al. (2009) investigaram a dinâmica da microbiota do tecido periodontal e a caracterização de alterações morfológicas qualitativas e quantitativas na matriz extracelular gengival a partir da remodelação e destruição das fibras colágenas do tecido conjuntivo gengival. Vinte e quatro ratos Wistar machos foram utilizados. A doença periodontal foi induzida e os animais foram sacrificados com 3, 5 e 7 dias após indução. Fragmentos gengivais foram removidos, processados pela técnica de imunohistoquímica convencional, coloração de picrosirius e de luz polarizada. Análise do DNA extraído de ligaduras foi feita para a avaliação da composição microbiota da placa bacteriana durante a progressão da doença periodontal. A progressão da DP foi relacionada com aumento da microbiota, tecidos saudáveis apresentaram completa organização gengival, exibindo regiões do epitélio sulcular, epitélio oral e epitélio juncional, além do tecido conjuntivo. Após 7 dias da indução da inflamação, os animais apresentaram redução de 35% da área ocupada pelas fibras colágenas comparadas ao grupo controle. A espessura e organização das fibras sofreram modificações durante a progressão da doença. O tecido controle foi caracterizado por fibras fina e grossas, uniformemente distribuídos no interior do tecido conjuntivo, sem orientação preferida. Após

cinco dias de inflamação, houve uma redução aparente em fibras totais. Os autores concluíram que existe a ocorrência de reorganização da matriz extracelular gengival em resposta ao processo inflamatório, indicando que na progressão da DP ocorre degradação de colágeno.

GOLIJANIN et al. (2015) desenvolveram um estudo sobre a análise morfométrica do colágeno e das células inflamatórias, incluindo os MCs, na doença periodontal. A amostra de tecido gengival foi de 53 indivíduos (14-60 anos) que foram divididos em 4 grupos: Grupo Controle (Saúde, n=12), Grupo 1 (Gengivite, n=10), Grupo 2 (Periodontite moderada, n=14) e Grupo 3 (Periodontite grave, n=17). Todos os tecidos foram rotineiramente processados pela coloração de HE. Para avaliar colágeno, foi utilizada coloração de Van-Gieson. Para avaliação de MCs, utilizou-se o método histoquímico de Spicer. O grupo Controle mostrou o epitélio subdividido em epitélio sulcular, epitélio oral e epitélio juncional, e logo em seguida a lâmina própria, onde se via fibras colágenas curtas, finas, sem nenhuma alteração visível e também fibras reticulares. Os MCs estavam principalmente localizados nos espaços perivascularares, quase sempre como uma célula única. No Grupo 1, apenas no EJ se percebeu infiltrado de linfócitos e polimorfonucleares. As fibras colágenas do TC estavam mais fragmentadas e nos espaços perivascularares havia menor teor de colágeno. O número de MCs aumentou, principalmente no TC e ao redor dos focos inflamatórios. As características histológicas dos Grupos 2 e 3 foram bastante diferentes dos casos de gengivite, com aumento do número e da extensão do infiltrado inflamatório e maior lise do colágeno. A quantidade e qualidade das fibras colágenas foram inversamente relacionadas à extensão da inflamação. Nos casos graves, na região de inflamação as fibras de colágeno

estavam ausentes ou localizadas apenas nas bordas, sob a forma de feixes finos. Nos grupos de doença o número de MCs foi ainda mais aumentado e a sua localização principal estava na extremidade dos campos inflamatórios. Também foi evidenciando significativa diminuição do volume de colágeno nos grupos de periodontite moderada e grave, comparados aos grupos controle e gengivite.

ALMEIDA et al. (2015) avaliaram colágeno tipo I, III e IV do tecido gengival saudável e compararam com amostra de tecido com gengivite e periodontite crônica. Amostras de tecido gengival foram obtidas a partir de biópsias de 32 indivíduos (35-50 anos), divididos em 3 grupos: grupo saudável (HG, n=12), gengivite crônica (CG, n=10) e grupo periodontite crônica (CP, n=10). As amostras foram submetidas à coloração de HE e picrosírius para análise qualitativa da disposição e composição das fibras colágenas dos tecidos, bem como imunofluorescência. Para mensurar as diferenças entre as fibras nos diferentes estágios de doença periodontal, a intensidade da fluorescência nos TC foi mensurada por um software e compararam-se as fibras dos grupos de doença com o grupo saudável. O grupo HG mostrou fibras espessas, organizadas de forma paralela e contendo fibroblastos. Células inflamatórias também foram observadas e dispersas entre as fibras colágenas, porém geralmente próximas aos vasos sanguíneos. No grupo CG observou-se vasos sanguíneos dilatados, fibras colágenas e células inflamatórias dispersas pelo tecido. O grupo CP mostrou desorganização e destruição da matriz extracelular, poucas fibras colágenas nas regiões mais profundas do tecido e intenso infiltrado de células inflamatórias, caracterizando a inflamação crônica

do tecido. Estes resultados demonstram alta degradação das fibras colágenas durante o curso da doença periodontal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a distribuição e degranulação de mastócitos e sua relação entre a degradação das fibras colágenas em tecido gengival de sítios com periodontite e sem periodontite (sítios saudáveis ou com gengivite).

3.2 Objetivos Específicos

1 – Avaliar a quantidade de mastócitos no epitélio oral, epitélio juncional e tecido conjuntivo com e sem infiltrado inflamatório de espécimes gengivais do grupo caso e grupo controle.

2 – Avaliar a relação entre a degranulação de mastócitos e a degradação das fibras colágenas no tecido conjuntivo com e sem infiltrado inflamatório nos dois grupos.

3 – Avaliar a degradação das fibras colágenas no tecido conjuntivo no grupo caso e grupo controle.

4 – Avaliar a correlação entre a quantidade de mastócitos e degradação das fibras colágenas no grupo caso e no grupo controle.

5 - Avaliar a correlação entre os parâmetros clínicos periodontais de profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, distância da junção cimento-esmalte à margem gengival e a quantidade de mastócitos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (06-306) (anexo I). Todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 Amostra

Participantes (13-62 anos) de ambos os sexos, sem alterações ou doenças sistêmicas, não fumantes e que não fizeram uso de anti-inflamatório e antibióticos em um período de três meses anteriores à cirurgia obedeceram aos critérios de inclusão. Todas essas informações foram obtidas a partir da ficha clínica de cada participante, bem como sobre os hábitos de higiene oral.

Todos os dentes presentes em boca foram examinados por um único examinador treinado utilizando-se uma sonda periodontal manual (Hu-friedy® PCPUNC 156 CE, Chicago, IL, USA). Profundidade de sondagem (PS), distância de junção cimento-esmalte (JCE) à margem gengival (MG) e sangramento à sondagem (SS) foram mensurados em seis sítios por dente (mesio-vestibular, centro-vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, centro-lingual e mesio-lingual) e os valores foram registrados em milímetros ou arredondados para o milímetro mais próximo. Nível clínico de inserção (NIC) foi calculado como a somatória dos valores da PS e distância da JCE-MG (FIGUEIREDO et al., 2013).

Um fragmento de tecido gengival de tamanho e localização variáveis foi removido de cada participante, obedecendo-se as técnicas cirúrgicas de

aumento de coroa clínica ou redução de bolsa periodontal, de acordo com a indicação de cada caso (LINDHE et al., 2008). Um total de trinta e quatro espécimes de tecido foi obtido, sendo 16 do grupo caso e 18 do grupo controle. O fragmento de tecido foi colocado em formol a 10%, mantido nesta solução por 48 horas antes da inclusão em parafina e processamento histológico.

Para o grupo caso, o diagnóstico de periodontite foi definido como perda de nível clínico de inserção ≥ 4 mm associado a sangramento à sondagem (BAELUM & LOPEZ, 2012). Os demais foram incluídos no grupo controle.

4.3 Processamento da amostra

Para realização da técnica imunohistoquímica foram utilizados cortes histológicos de 3 μ m de espessura a partir do material embebido em formol (10%) e incluídos em parafina, sendo os cortes estendidos sobre lâminas de vidro previamente silanizadas. Os cortes histológicos foram desparafinados em dois banhos de xilol por 15 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram re-hidratados em dois banhos de álcool absoluto por 5 minutos em temperatura ambiente. As informações referentes aos anticorpos primários tais como, especificidade, clone, solução recuperadora antigênica, diluição e tempo de incubação estão descritas a seguir:

Tabela 1. Especificidade, clone, tratamento para recuperação antigênica, diluição e controle dos anticorpos primários utilizados no estudo imuno-histoquímico.

Especificidade	Clone	Recuperação Antigênica	Diluição	Tempo de incubação	Fabricante
Mastcell Triptase	AA1	Tripsina 1% a 37°C	1:50	30 min	DAKO*

* Dako Corporation, Carpinteria, CA (USA).

Após lavagem em água corrente e dois banhos em água destilada, foi realizada a recuperação antigênica. Em seguida, foi necessário esperar os cortes atingirem a temperatura ambiente, para então serem novamente lavados em água corrente acompanhados de duas passagens em água destilada. Posteriormente, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 10 minutos, protegido da luz, em uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% e água destilada.

Após repetir a lavagem em água corrente e água destilada, os cortes histológicos foram imersos em solução de Tris-HCl/BSA 1% (solução salina fosfatada/soro albumina bovina), Tris-HCl/Triton e água destilada, sendo 5 minutos cada. Em seguida, foi realizado o bloqueio de proteínas (Dako Corporation, Carpinteria, USA) por 10 minutos. Em seguida o anticorpo foi incubado conforme tempo dito acima.

Os cortes foram imersos em dois banhos da solução de Tris-HCl/BSA 1% durante 5 minutos. Posteriormente, esses cortes foram incubados com o sistema polimérico de amplificação EnVision (Dako Corporation, Carpinteria, USA) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esta etapa foi sucedida por nova imersão em solução de Tris-HCl/BSA 1% como já descrito anteriormente. Para revelação da reação foi utilizado o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina, Dako Corporation, Carpinteria, USA) em câmara escura por 5 minutos. Em seguida, após nova lavagem em água destilada, as secções teciduais foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 15 segundos e novamente lavadas. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram montadas. O controle positivo das reações com os anticorpos Mast Cell Triptase foi realizado usando tecidos com conhecida positividade para este

anticorpo. Para o controle negativo, os anticorpos primários foram substituídos por solução de soro não imune.

Para avaliar as fibras colágenas, cortes de 5 µm de espessura foram processados no Laboratório de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia e identificadas com coloração de Picrosirius. A análise da degradação do colágeno foi qualitativa, descrevendo a morfologia e disposição das fibras colágenas.

4.4 Análise Microscópica

Após o processamento dos cortes histológicos, um único corte de cada espécime foi analisado e os mastócitos contados manualmente por dois examinadores previamente treinados, à microscopia de luz de alta definição (AxiolabTM, Zeiss®, Germany, 2008), com um aumento de 400x no Laboratório de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia. As áreas analisadas compreendiam regiões do epitélio oral (EO), epitélio juncional (EJ) e tecido conjuntivo com (TCI) e sem infiltrado inflamatório (TCSI).

Foram considerados positivos os casos onde as células mastocitárias exibiram marcação de cor castanha, com presença de núcleo e citoplasma (HUANG *et al.*, 2013), figura 5 (A e B).

Para análise da degranulação, os mastócitos do tecido conjuntivo com e sem infiltrado inflamatório, foram considerados degranulados levando-se em consideração a presença dos grânulos no meio extracelular, prevalecendo a morfologia presente na maioria das células ($\geq 50\%$ das células degranuladas).

As imagens foram digitalizadas e em seguida as áreas correspondentes ao EO, EJ, TC foram medidas utilizando-se o software Image J (versão 1.48, USA). Posteriormente, calculou-se a densidade das células mastocitárias, dividindo-se o número médio de mastócitos pela área fornecida pelo software (número de célula/mm²), obtendo-se uma média de densidade de mastócitos por mm² em cada um dos campos histológicos.

A análise das fibras colágenas da região de tecido conjuntivo com e sem infiltrado inflamatório foi feita manualmente por dois examinadores previamente treinados e os cortes foram classificados, utilizando microscopia de luz de alta definição (AxiolabTM, Zeiss®, Germany, 2008), em dois grupos: $\geq 50\%$ das fibras encontravam-se íntegras (coloração vermelha intensa e fibras espessas) ou se $\geq 50\%$ das fibras apresentavam-se degradadas (coloração vermelho claro, fibras finas e intercaladas). As lâminas foram avaliadas com amplificação de 40X. Foi considerada área de colágeno íntegro toda a extensão das fibras de coloração vermelha intensa, que foi marcada pelo observador para obtenção do percentual de colágeno por área do campo analisado.

4.5 Análise Estatística

Os dados foram previamente testados para análise da homogeneidade das variâncias.

Teste t não pareado foi utilizado para comparar as médias e desvios padrões de mastócitos no epitélio oral, epitélio juncional, tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório nos grupos caso e controle. Também foi utilizado para analisar a relação da quantidade de

mastócitos com a degradação das fibras colágenas e para obter as médias dos parâmetros periodontais nos dois grupos.

Teste Mann-Whitney foi feito para análise das médias para os casos de não homogeneidade das variâncias.

Teste Qui-quadrado foi utilizado para análise percentual da relação entre os grupos e a degranulação de mastócitos; relação entre os grupos e degradação das fibras colágenas e a relação entre a degranulação de mastócitos e a degradação das fibras colágenas.

Correlação de Pearson foi feita para analisar a relação entre a quantidade de mastócitos por área analisada e parâmetros clínicos periodontais de profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e distância da junção cimento-esmalte à margem gengival da amostra.

A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do software SPSS (SPSS versão 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5 RESULTADOS

O total da amostra foi de 34 espécimes de tecido gengival, sendo 18 do grupo controle (52,94%) e 16 do grupo caso (47,06%). A maioria dos participantes era do sexo feminino (73,52%) e a média de idade do grupo caso foi de $39,18 \pm 9,87$ anos e no grupo controle foi de $29,39 \pm 8,83$ anos.

A quantidade de mastócitos foi significativamente maior ($p = 0,04$) no grupo caso ($339,01 \pm 188,94$) comparada ao grupo controle ($211,14 \pm 131,13$) no tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório e não houve diferenças nas quantidades de mastócitos entre os grupos no epitélio oral, epitélio juncional e no tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório ($p \geq 0,19$) Tabela 2, figura 5 (C e D).

Tabela 2. Médias e desvios padrões do número de mastócitos por mm^2 por região histológica nos grupos caso e controle.

Áreas	Grupo		P valor
	Caso (N=16)	Controle (N=18)	
EJ	$12,95 \pm 14,78$	$29,21 \pm 46,77$	0,19
EO	$13,01 \pm 16,57$	$12,73 \pm 12,74$	0,96
TCI	$339,01 \pm 188,94$	$211,14 \pm 131,13$	0,04^a
TCSI	$196,42 \pm 122,22$	$183,32 \pm 236,85$	0,84

EO: epitélio oral; EJ: epitélio juncional; TCI: tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório; TCSI: tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório. ^a Teste Mann-Whitney, Teste t: para as demais áreas.

5.1 Degranulação de Mastócitos

No tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório e sem infiltrado, não houve relação significativa entre degranulação de mastócitos e os grupos ($p \geq 0,35$), Tabela 3, figura 5 (E e F).

Tabela 3. Degranulação de mastócitos no tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório e no tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório nos grupo caso (N=16) e controle (N=18).

Degranulação de MCs	Grupo		Odds Ratio (95% IC)	P valor
	Caso – N (%)	Controle – N (%)		
TCI				
Sim	06 (40,0)	09 (60,0)	0,60 (0,15-2,36)	0,35
Não	10 (52,6)	09 (47,4)		
TCSI				
Sim	03 (42,9)	04 (57,1)	0,81 (0,15-4,32)	0,57
Não	13 (48,1)	14 (51,9)		

TCI: tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório; *TCSI*: tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório; *MCs*: Mastócitos. Teste qui-quadrado.

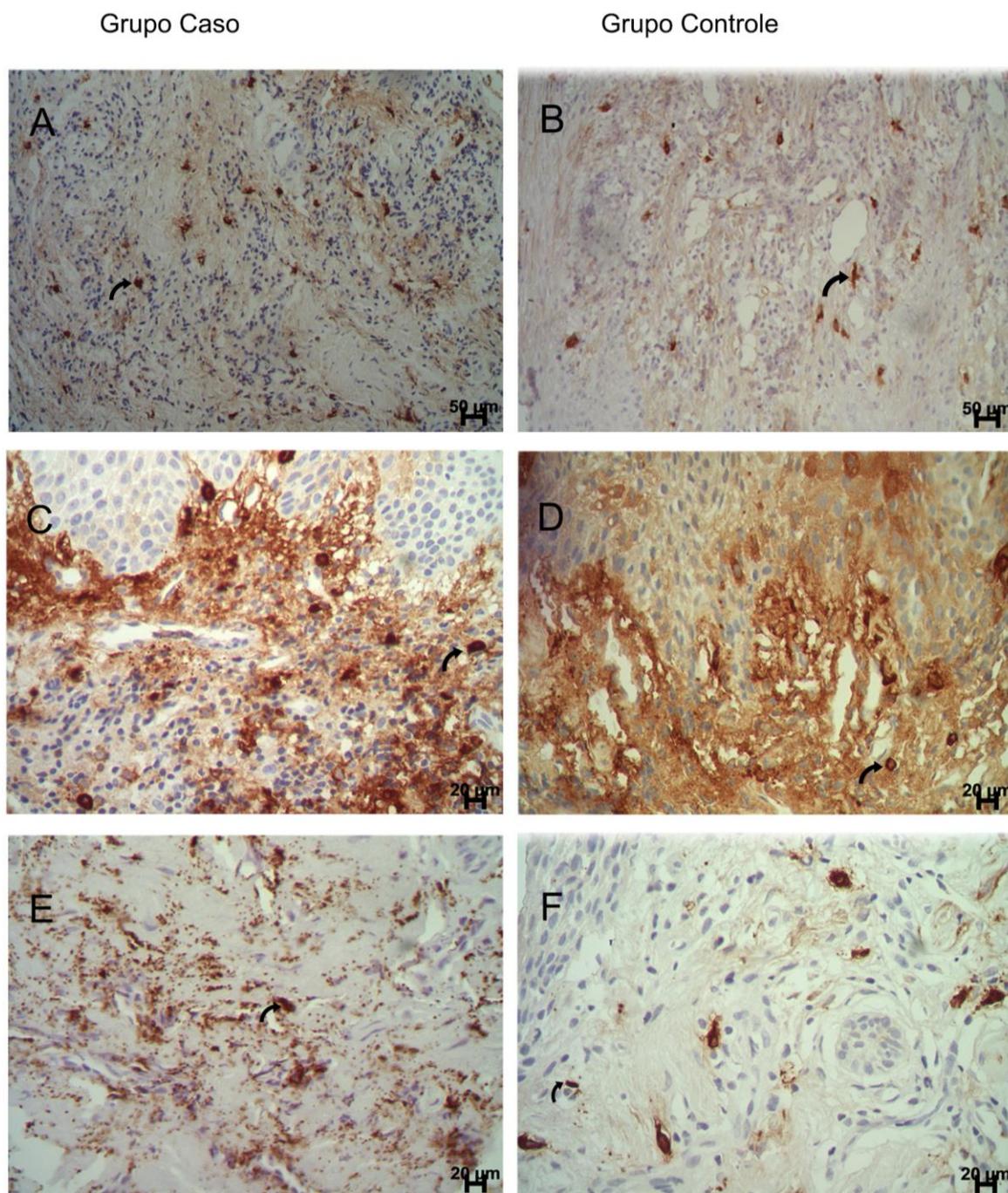


Figura 5. Imuno-histoquímica nos grupos Caso e Controle. **A e B** – Células mastocitárias marcadas em cor castanha; **C e D**– Presença de mastócitos na região de TCI; **E e F** – Degranulação de mastócitos, observar os grânulos citoplasmáticos sendo liberados no meio extracelular.

5.2 Degradação das Fibras Colágenas

As fibras colágenas íntegras foram consideradas aquelas com coloração vermelha intensa e espessa, enquanto que as fibras degradadas foram identificadas como sendo aquelas de coloração vermelha clara, finas e intercaladas. Não houve relação entre a degradação das fibras colágenas na área de tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório e de tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório e os grupos ($p \geq 0,56$), Tabela 4, figura 6 (A-F).

Tabela 4. Degradação do colágeno no tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório e no tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório nos grupo caso (N=16) e controle (N=18).

Degradação das fibras colágenas	Grupo		Odds Ratio (95% IC)	P valor
	Caso – N (%)	Controle – N (%)		
TCSI				
Sim	02 (12,5)	03 (16,7)	0,71 (0,10-4,93)	0,56
Não	14 (87,5)	15 (83,3)		
TCI				
Sim	03 (18,7)	04 (22,2)	0,81 (0,15-3,31)	0,57
Não	13 (81,3)	14 (77,8)		

TCI: tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório; *TCSI*: tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório; Teste qui-quadrado.

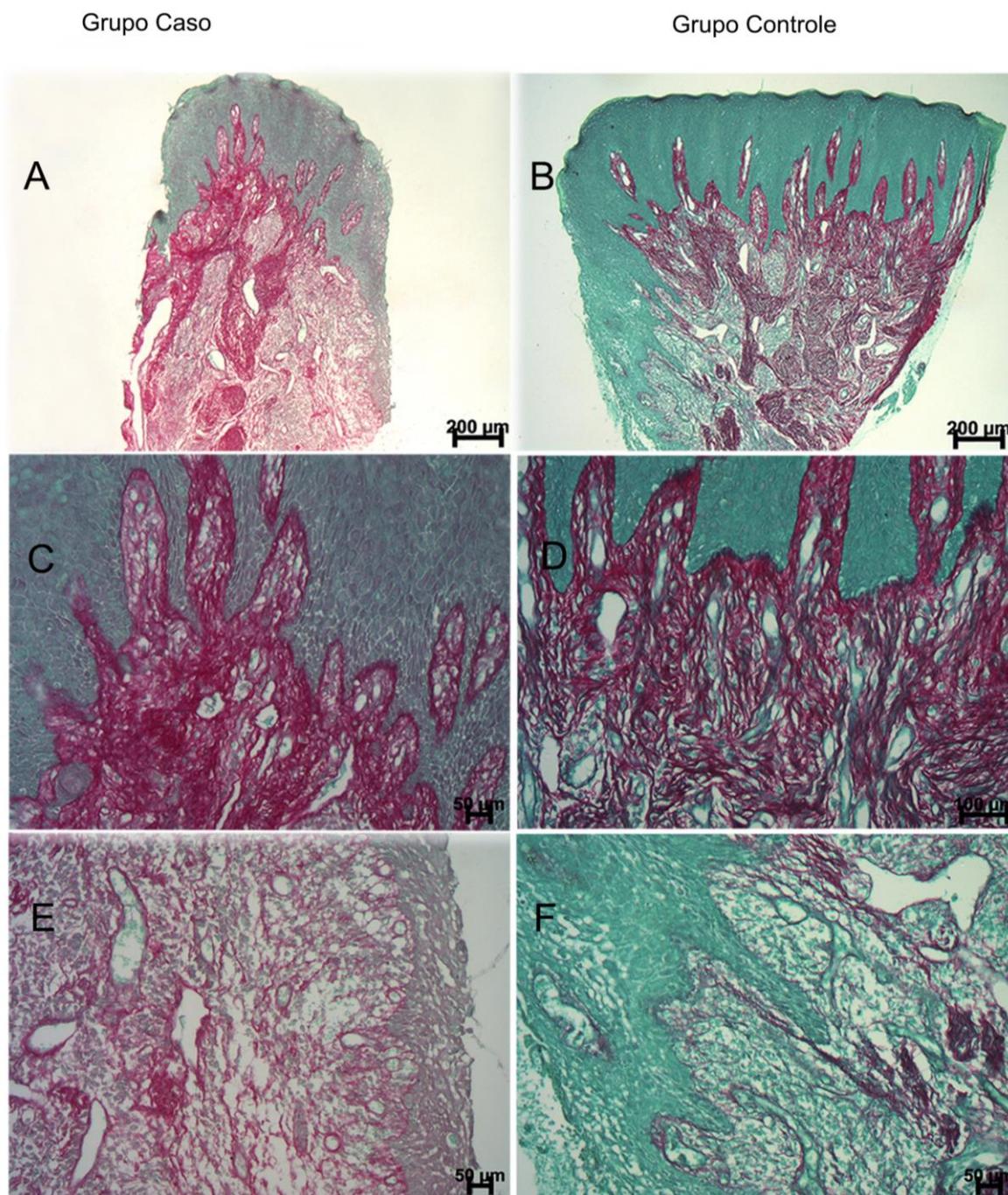


Figura 6. Coloração de Picrosirius nos grupo Caso e Controle. **(A e B)** – Corte histológico para marcação de fibras colágenas, região de TC, parte das fibras colágenas dos grupos apresentaram-se degradadas; **(C e D)** – Fibras colágenas íntegras, espessas e em coloração vermelho intensa; **(E e F)** – Fibras colágenas degradadas, finas, intercaladas, em cor vermelho mais claro.

5.3 Relação entre Degranulação de Mastócitos e Degradação das Fibras Colágenas

Não houve relação estatisticamente significativa entre a degradação das fibras colágenas e a degranulação de MCs em nenhuma área analisada, TCSI ou TCI nos grupos caso e controle ($p \geq 0,30$), Tabela 5.

Tabela 5. Relação entre a degradação das fibras colágenas no tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório e no tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório e a degranulação de mastócitos nos grupos caso (N=16) e controle (N=18).

Degradação das fibras colágenas	Degranulação de MCs		Odds Ratio (IC 95%)	P valor
TCSI	TCI			
Controle	Sim	Não	2,00 (0,13-30,16)	0,55
Não - N (%)	03 (75,0)	12 (85,7)		
Sim - N (%)	01 (25,0)	02 (14,3)		
Caso			4,50 (0,31-65,23)	0,30
Não - N (%)	04 (66,7)	09 (90,0)		
Sim - N (%)	02 (33,3)	01 (10,0)		
TCI	TCI			
Controle	Sim	Não	1,00 (0,11-9,23)	0,71
Não - N (%)	07 (77,8)	07 (77,8)		
Sim - N (%)	02 (22,2)	02 (22,2)		
Caso			0,79 (0,60-1.03)	0,65
Não - N (%)	03 (100,0)	11 (84,6)		
Sim - N (%)	0 (0)	02 (15,4)		

TCI: tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório; TCSI: tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório; Teste qui-quadrado.

5.4 Relação entre o número de Mastócitos e a Degradação das Fibras Colágenas

Na área de tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório do grupo controle, houve relação estatisticamente significativa entre a degradação das fibras colágenas do tecido conjuntivo e maior densidade de mastócitos ($p = 0,001$). No tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório não houve significância estatística entre a degradação das fibras colágenas e o número de mastócitos (Tabela 6).

Tabela 6. Relação das médias e desvios padrões do número de mastócitos por mm^2 nas regiões histológicas e a degradação das fibras colágenas do tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório no grupo controle, $N=18$.

MCs / mm^2			
Degradação das fibras colágenas			
	TCSI		P valor
	Sim (N=15)	Não (N=03)	
EJ	05,02 \pm 8,69	34,05 \pm 49,95	0,34
EO	12,88 \pm 08,43	12,70 \pm 13,70	0,98
TCI	265,30 \pm 109,67	200,30 \pm 135,66	0,45
TCSI	549,28 \pm 444,27	110,13 \pm 74,05	0,001
TCI			
EJ	46,33 \pm 80,62	24,32 \pm 35,29	0,42
EO	03,10 \pm 03,95	15,48 \pm 13,12	0,09
TCI	195,74 \pm 225,40	215,54 \pm 103,27	0,80
TCSI	181,47 \pm 110,84	183,85 \pm 265,56	0,99

EJ: epitélio juncional; *EO*: epitélio oral; *TCI*: tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório; *TCSI*: tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório. *MCs*: Mastócitos. Teste t.

No grupo caso não houve significância estatística entre o número de mastócitos e a degradação das fibras colágenas do tecido conjuntivo com e sem infiltrado inflamatório ($p \geq 0,12$), Tabela 7.

Tabela 7. Relação das médias e desvios padrões do número de mastócitos por mm^2 nas regiões histológicas e a degradação das fibras colágenas do tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório no grupo caso, N=16.

MCs / mm^2			
Degradação das fibras colágenas			
	TCSI		P valor
	Sim (N=13)	Não (N=03)	
EJ	09,34 ± 13,21	13,47 ± 15,37	0,73
EO	15,16 ± 21,44	12,70 ± 16,75	0,85
TCI	364,45 ± 251,21	335,37 ± 190,33	0,85
TCSI	295,38 ± 83,15	182,28 ± 122,41	0,23
TCI			
EJ	16,77 ± 14,54	12,07 ± 15,27	0,64
EO	16,16 ± 27,98	12,27 ± 14,47	0,73
TCI	183,92 ± 108,95	374,80 ± 187,74	0,12
TCSI	111,69 ± 24,66	215,97 ± 127,92	0,19

EJ: epitélio juncional; *EO*: epitélio oral; *TCI*: tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório; *TCSI*: tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório. *MCs*: Mastócitos. Teste t.

5.5 Correlação entre o número de Mastócitos e Parâmetros Periodontais

Os parâmetros clínicos periodontais de profundidade de sondagem, distância da junção cimento-esmalte à margem gengival e nível clínico de inserção foram maiores no grupo caso comparados ao controle (Tabela 8).

Tabela 8. Média \pm Desvio padrão dos parâmetros clínicos periodontais (mm) nos grupo caso e controle.

Variáveis	Grupo		P valor
	Caso N = 16	Controle N = 18	
PS	5,75 \pm 0,77	2,83 \pm 0,51	<0,001
NIC	6,25 \pm 2,14	1,83 \pm 1,38	<0,001
JCE-MG	1,13 \pm 1,20	- 1,00 \pm 1,24	<0,001

PS: profundidade de sondagem; NIC: nível clínico de inserção; JCE: junção cimento-esmalte; MG: margem gengival. Teste t.

Houve correlação estatisticamente significativa da medida da profundidade de sondagem e o número de mastócitos na região de tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório ($r = 0,34$; $p = 0,04$). Os demais parâmetros clínicos periodontais (nível de inserção clínico, recessão gengival e sangramento à sondagem) não apresentaram correlação significativa com a quantidade de mastócitos, tabela 9.

Tabela 9. Correlação do número de mastócitos por mm² de cada região histológica com os parâmetros clínicos periodontais. N=34.

Parâmetros Periodontais	Região Histológica				
	EJ	EO	TCI	TCSI	TCT
PS	r = - 0,21	r = 0,09	r = 0,34	r = 0,01	r = 0,24
	p = 0,24	p = 0,62	p = 0,04	p = 0,94	p = 0,18
NIC	r = - 0,22	r = 0,09	r = 0,27	r = 0,09	r = 0,25
	p = 0,20	p = 0,59	p = 0,12	p = 0,60	p = 0,16
JCE-MG	r = - 0,19	r = 0,003	r = 0,23	r = 0,09	r = 0,22
	p = 0,28	p = 0,99	p = 0,20	p = 0,59	p = 0,21
SS	r = - 0,08	r = - 0,01	r = 0,23	r = 0,15	r = 0,65
	p = 0,66	p = 0,94	p = 0,19	p = 0,59	p = 0,13

PS: profundidade de sondagem; NIC: nível clínico de inserção; JCE: junção cimento-esmalte; MG: margem gengival; SS: sangramento à sondagem. Correlação de Pearson.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliado o número e degranulação de mastócitos e a degradação das fibras colágenas em amostras gengivais de indivíduos com diagnóstico de periodontite, bem como a correlação entre estas variáveis. Amostras gengivais de indivíduos sem periodontite, incluindo aqueles periodontalmente saudáveis ou com gengivite, foram utilizadas como controle.

Os MCs têm sido encontrados tanto nos tecidos gengivais saudáveis quanto nas áreas de inflamação e sabe-se que este tipo celular apresenta importantes funções efectoras contra diversos patógenos (ANGELOPOUS, 1973; BARNETT, 1973a; BARNETT, 1973b; KENNETT et al., 1993; WALSH et al., 1995; WALSH, 2003; BATISTA et al., 2005). Uma vez liberados na circulação sanguínea, os precursores indiferenciados completam sua maturação e diferenciação nos tecidos para onde são recrutados, influenciados por fatores ambientais, fatores de origem celular (SCF), produtos bacterianos (LPS) e citocinas.

Quando diferenciados, os MCs distribuem-se por todo o tecido, localizando-se preferencialmente adjacentes aos vasos sanguíneos, aos vasos linfáticos e próximos ao epitélio (STEINVOLL et al., 2004). Entre os diferentes tipos celulares envolvidos na patogênese da doença periodontal, diversos autores sugerem que o mastócito é uma célula que pode estar envolvida neste processo (SHAPIRO et al., 1969, STEINSVOLL et al., 2004; BATISTA et al., 2005). Neste estudo foi observado que os mastócitos estavam distribuídos em todos os tecidos gengivais (epitélio oral - EO, epitélio juncional - EJ e no tecido conjuntivo - TC) podendo evidenciar sua participação nos processos inflamatórios periodontais.

A densidade de mastócitos nos tecidos gengivais é tema diverso. Alguns autores, em casos de doença periodontal, apontam que os mastócitos foram encontrados em maior quantidade (KENNETT et al. 1993; GOLIJANIN et al., 2015; BATISTA et al., 2005; HUANG et al., 2013), enquanto outros não verificaram esta situação, mas sim uma diminuição do número dessas células em condição de inflamação periodontal (SHELTON & HALL, 1968; ROBINSON & De MARCO, 1972; GEMMELL et al., 2004a). Esta divergência de resultados pode ser explicada pelo fato da doença periodontal ser uma doença inflamatória que apresenta diferentes estágios de evolução, incluindo casos de gengivite à periodontite grave (PAGE & EKE, 2007). Assim, as características histológicas de doença periodontal mostram sítios inflamatórios com células diferentes em tipo e em número (SEGUIER, et al., 2000) a depender do tipo de doença. No presente estudo, a quantidade de mastócitos por mm^2 foi significativamente maior ($p=0,04$) no grupo caso ($339,01 \pm 188,94$) comparada ao grupo controle ($211,14 \pm 131,13$) no tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório e não houve diferença na quantidade de mastócitos entre os grupos nas demais áreas. Sugere-se que os mastócitos estejam participando ativamente no processo de defesa e inflamação nos tecidos, justificando sua presença em maior quantidade no grupo caso. Esta afirmativa coincide com as afirmações de STEINSVOLL et al., (2004) ao relatarem que os mastócitos são conhecidos pelo seu papel nos processos inflamatórios e que são capazes de fagocitar, processar e apresentar antígenos tão efetivamente quanto os macrófagos.

Técnica histoquímica – utilizando-se azul de toluidina e técnica imunohistoquímica – utilizando-se anticorpos, com anticorpo anti-triptase - têm

sido empregadas para o estudo de mastócitos em cortes histológicos. A primeira técnica tem menor sensibilidade, quando comparada à técnica imunohistoquímica (NURMENIEMI et al., 2004). Consequentemente, a técnica imunohistoquímica, por ser mais sensível resulta em contagens mais facilitadas, mais rápidas e precisas (BATISTA et al., 2005), além do que, para observar a degranulação de MCs, é mais confiável a técnica imunohistoquímica (HUANG et al., 2013). Talvez pelo fato da técnica utilizando-se o azul de toluidina ser mais simples e mais barata, alguns estudos a utilizaram (SHARPIRO et al., 1969; VEHABI et al., 2010; HUANG et al., 2014), porém o presente trabalho utilizou-se da técnica imunohistoquímica com marcação por anticorpo anti-triptase, bem como outros trabalhos (GEMMEL et al., 2004; NURMENIEMI et al., 2004; POPOVICI et al., 2014; RODINI et al., 2004; SEGUNDO et al., 2013). E há ainda estudos que comparam a identificação de MCs através das duas técnicas (BATISTA et al., 2005; HUANG et al., 2013).

No interior citoplasmático dos MCs há grânulos ricos em mediadores químicos pré-armazenados tais como histamina, heparina, derivados do ácido araquidônico, fator de ativação de plaquetas, citocinas, proteases metaloproteinases e quando ativadas, estas células degranulam e libera-os em grandes quantidades no meio extracelular, sendo capazes de controlar ou exacerbar a lesão tecidual, a angiogênese, a fibrose, a inflamação e a resposta imunológica (JANEWAY et al., 2002; BATISTA et al., 2005; STEINSVOLL et al., 2004). Uma vez alterada a homeostasia devido aos mediadores químicos nos tecidos gengivais, ocorrem alterações nos vários tipos de populações celulares, interferindo sobre a inflamação, degradação do colágeno, a angiogênese e a fibrose gengival (TRACKMAN & KANTARCI, 2004). Os MCs e o conteúdo de

seus grânulos poderiam estar associados às alterações teciduais observadas nos tecidos gengivais. Entretanto, neste trabalho não houve relação significativa entre a presença de mastócitos degranulados e o diagnóstico periodontal. Este resultado é conflitante com estudos prévios, os quais verificaram aumento da população de MCs degranulados em tecidos gengivais em casos de periodontite (HUANG et al., 2013; HUANG et al., 2014). Entretanto, GOLIJANIN et al., 2015 observaram a presença de MCs com fraca evidência de degranulação em todos os grupos investigados (saúde gengival, gengivite, periodontite moderada e periodontite grave) e os mastócitos permaneceram com o conteúdo granular similar, corroborando com os presentes achados deste estudo.

Os tecidos gengivais e periodontais inflamados apresentam queda no nível e produção de colágeno, o que acentua o desequilíbrio entre formação e destruição tecidual, resultando em redução de matriz extracelular (KARIMBUX et al., 1998). Sabendo-se disso, o presente trabalho investigou a condição das fibras colágenas do tecido conjuntivo das amostras gengivais. A identificação do colágeno pela técnica de Picrosirius foi a mesma técnica utilizada em outros estudos para análise de fibras colágenas em tecido gengival (GOGLY et al., 1997; SEGUIÉR et al., 2000, SÉGUIER et al., 2001; EJEIL et al., 2003; ALMEIDA et al., 2015) e neste trabalho não foi observada relação entre a degradação das fibras colágenas nas áreas de tecido conjuntivo com e sem infiltrado inflamatório e o diagnóstico periodontal.

No estudo de LORENCINI et al., 2009, a avaliação das fibras colágenas em modelo animal utilizando-se também a técnica de Picrosirius, observou-se um aumento na quantidade de fibras mais espessas após a indução de doença

periodontal em ratos. Diferentemente, no estudo morfológico e quantitativo das fibras colágenas do tecido gengival humano de ALMEIDA et al, 2015, os autores observaram no grupo saudável, fibras colágenas maduras e espessas, enquanto que no grupo periodontite crônica a matriz extracelular estava extensamente destruída e as fibras colágenas desorganizadas e com diferentes padrões de disposição.

Alguns autores sugerem que os mastócitos podem ter participação na degradação tecidual visto que eles expressam alguns tipos de metaloproteinases da matriz (MMPs) (SEGUIER et al., 2001; NAESSE et al., 2003; LAGDIVE et al., 2013), liberam histamina, a qual promove edema e favorece a penetração de células inflamatórias no tecido (LAGDIVE et al., 2013) e as proteases liberadas durante a degranulação, como a triptase, podem ativar MMPs e participar da destruição dos tecidos (VAN DYKE & KORNMAN, 2008; LAGDIVE et al., 2013). No presente trabalho, a análise da relação entre a degranulação de mastócitos e a degradação das fibras colágenas não foi significativa em nenhuma área analisada nos dois grupos estudados ($p \geq 0,30$). Este resultado pode sugerir que, embora se acredite na participação dos mastócitos e de todos seus mediadores na patogênese da doença periodontal, sabe-se que o processo inflamatório é algo complexo, e muitos outros fatores e células podem gerar maior impacto sobre o referente tecido em casos de doença.

A relação entre a densidade de mastócitos e a degradação das fibras colágenas também foi avaliada. No grupo controle, na área de tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório, houve relação estatisticamente significativa entre a degradação das fibras colágenas e maior densidade de

mastócitos. Este achado pode indicar que talvez o mastócito seja ainda mais importante durante a fase inicial da inflamação e destruição dos tecidos periodontais. Porém, diferentemente do presente estudo, BARNETT (1973b) relatou uma distribuição difusa de mastócitos por todo tecido conjuntivo, além de íntima relação destas células com fibras colágenas em biópsias humanas de doença periodontal, sugerindo que em lesões gengivais inflamatórias crônicas, o efeito primário dos mastócitos seria de proporcionar o aumento da destruição tecidual.

No presente estudo, os parâmetros clínicos periodontais de profundidade de sondagem, recessão gengival e nível clínico de inserção foram maiores no grupo caso, demonstrando que as medidas correspondentes a estas características foram compatíveis com o diagnóstico clínico de periodontite. Apesar de não ter existido relação entre o número de mastócitos e o sangramento à sondagem, foi significativa a relação entre o número de mastócitos e a profundidade de sondagem ($p=0,04$) e talvez este resultado represente, de alguma forma, que uma maior quantidade de mastócitos possa estar favorecendo o quadro de uma pior condição periodontal.

Portanto, visto que os mastócitos liberam diversos mediadores reconhecidos como elementos importantes para o processo inflamatório se desenvolver, estas células estão envolvidas na patogênese das doenças periodontais, independente do estágio da doença, seja na fase inicial ou em seu estado mais crônico e incluindo a degradação das fibras colágenas do tecido conjuntivo gengival.

Sugere-se o desenvolvimento de estudos para investigar os mecanismos de ação dos mediadores químicos liberados pelos mastócitos e desenvolver

possíveis manobras que possam minimizar a ação dos mesmos. Com isso, poder-se-ia tentar controlar a inflamação ou mesmo melhorar a regeneração dos tecidos periodontais.

O tamanho da amostra e a contagem dos mastócitos manualmente podem ser limitações deste estudo. Entretanto, a contagem automatizada também apresenta limitações, visto que podem ser consideradas como mastócitos outras estruturas pigmentadas, mesmo que não seja uma célula.

7 CONCLUSÃO

Os mastócitos estão envolvidos na patogênese das doenças periodontais independente do estágio da doença, e podem estar associados à degradação das fibras colágenas do tecido conjuntivo gengival na saúde periodontal e nos estágios iniciais destas doenças.

REFERÊNCIAS

1. ABEL, M.; VLIAGOFTIS, H. Mast cell-fibroblast interactions induce matrix metalloproteinase-9 release from fibroblasts: role for IgE-mediated mast cell activation. **Journal of Immunology**. v.180, n.5, p.3543-50, 2008.
2. AESCHLIMANN, C.R; KAMINSKI, E.J; ROBINSON, P.J. The effects of periodontal therapy on the mast cell population in gingival tissues. **Journal of Periodontology**. v.51, n.4, p.193-198, 1980.
3. ALMEIDA, T., et al. Morphological and quantitative study of collagen fibers in healthy and diseased human gingival tissues. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**. v.56, n.1, p.33-40, 2015.
4. ANGELOPOULOS, AP. Studies of mast cells in the human gingiva. **Journal of Periodontal Research**. v.8, p.28-36, 1973.
5. ASARO, J.P., et al. Experimental periodontal disease. Immediate hypersensitivity. **Journal of Periodontology**. v.54, n. 1, p.23-8, 1983.
6. ATKINS, F.M. Mast cells and fibrosis. **Archives of Dermatology**. v.123, p.191–193, 1987.
7. ATKINS, F.M. Interaction between mast cells, fibroblasts and connective tissue components. **International Archives of Allergy and Immunology**. v.77, p.96–102, 1985.
8. BAELUM, V., LOPEZ, R. Defining a periodontitis case: analysis of a never-treated adult population. **Journal of Clinical Periodontology**. v.39:10-19, 2012.
9. BARNETT, M.L. The fine structure of human epithelial mast cells in periodontal disease. **Journal of Periodontal. Research**. v.8, p.371-380, 1973a.
10. BARNETT, M.L. The fine structure of human connective tissue mast cells in periodontal disease. **Journal of Periodontal. Research**. v.9, p.84-91, 1973b.
11. BATISTA, A; RODINI, C.O; LARA, V.S. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. **Oral Diseases**. v.11, n.4, p.249-254, 2005.
12. BEFUS, A.D, et al. Mast cells from the human intestinal lamina propria. Isolation, histochemical subtypes, and functional characterization. **Journal of Immunology**.v.138, n.8, p.2604-2610, 1987.

13. BEFUS, A.D; et al. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. **Journal of Immunology**. v.15, n.163, p.947-53, 1999.
14. BRADDING, P; et al. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. **Journal of Immunology**. v.155, n.1, p.297-307, 1995.
15. BLAIR, R.J; et al. Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *J Clin Invest*. v.99, n.11, p.2691-700, 1997.
16. CAIRNS, J.A; WALLS, A.F. Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts. **Journal of Clinical Investigation**. v.99, n.6, p.1313-1321, 1997.
17. CARRANZA, F.A.J, CABRINI, R.L. Mast cell in human gingiva. **Oral Surgery**. v.8, n.10, p.1093-1099, 1955.
18. CASTRO, I.C; et al. Do laser and led phototherapies influence mast cells and myofibroblasts to produce collagen? **Lasers in Medical Science**. v.29, n.4, p.1405-1410, 2014.
19. CHATTERJEE, S; et al. Quantitative role of mast cells in odontogenic cystic enlargement. **Brazilian Journal of Oral Sciences**. v.7, p.1662–1665, 2008.
20. CHO M, GARANT PR. Development and general structure of the periodontium. 2000. *Periodontol*. 2000 Oct; 24(1):9-27.
21. CURVINEL, W.M.; et al. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.50, n.4, p.434-61, 2010.
22. DARVEAU, R.P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nature Reviews**. v.8, p.481-490, 2010.
23. EJEIL, A.L; et al. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? **Journal of Periodontology**. v.74, n.2, p.196-201, 2003.
24. FIGUEIREDO, A., et al. Destructive periodontal disease in adult Indians from Northeast Brazil: cross-sectional study of prevalence and risk indicators. **Journal of Clinical Periodontology**. v.40, p.1000–6, 2013.
25. GALLI, S.J; MAURER, M.; LANTZ, C.S. Mast cells as sentinels of innate immunity. **Current Opinion in Immunology**. v.11, p.53–59, 1999.

26. GALLI, S.J, NAKAE, S., TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. **Nature Immunology**. v.6, n.2, p.135-142, 2005.
27. GEMMELL, E.; SEYMOUR, G.J. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. **Journal of Dental Research**. v.77, n.1, p.16-26, 1998.
28. GEMMELL, E.; YAMAZAKI, K.; SEYMOUR, G.J. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**. v.13, n.1, p.17–34, 2002.
29. GEMMELL, E.; CARTER, C.L.; SEYMOUR, G.J. Mast cells in human periodontal disease. **Journal of Dental Research**. v.83, n.5, p.384-387, 2004a.
30. GEMMELL, E.; SEYMOUR, J. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. **Periodontology 2000**. v.35, p.21-41, 2004b.
31. GENCO, R.J. Host response in periodontal diseases: current concepts. **Journal of Periodontology**. v.63, n.4, p.338-55, 1992.
32. GOGLY, B. et al. Morphometric analysis of collagen and elastic fibers in normal skin and gingiva in relation to age. **Clinical Oral Investigate**. v.1, p.147-152, 1997.
33. GOLIJANIN, R; et al. Morphometric analysis of collagen and inflammatory cells in periodontal disease. **Vojnosanitetski Pregled**. v.72, n.3, p.219–224, 2015.
34. GRUBER, B.L; et al. Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. **Journal of Clinical Investigation**. v.84, p.1657-1662, 1989.
35. HALLGREN, J.; PEJLER, G. Biology of mast cells tryptase an inflammatory mediator. **FEBS Journal**. v.273, p.1871–1895, 2006.
36. HUANG, S; et al. Mast cell degranulation in human periodontitis. **Journal of Periodontology**. v.84, p.248-255, 2013.
37. HUANG, S., et al. Quantification of tryptase-TIM-3 double-positive mast cells in human chronic periodontitis. **Archives of Oral Biology**. v.56, n.6, p.654-661, 2014.
38. HANSSON, G.K. Inflammation and immune response in atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**. v.1, n.2, p.150-155, 1999.

39. JANEWAY JUNIOR, C.A.; TRAVERS, C. A. WALPORT, M. et al. Basic concepts in immunology. *In: Immuno biology: the system in health and disease*, 6ª edição. New York: Garland Science Publishing, 2005, p.1-35.
40. JOLLY, S.; et al. Detection of triptase in bovine mast cells: comparison of enzyme- and immnohistochemistry. **Journal of Comparative Pathology**. v. 120, p.269-279, 1999.
41. KARIMBUX, N.Y., et al. The expression of collagen I and XII mRNAs in Porphyromonas gingivalis-induced periodontitis in rats: the effect of doxycycline and chemically modified tetracycline. **Journal of Periodontology**. v.69,n.1, p.34-40, 1998.
42. KENNETT, C.N. Comparative histochemical and biochemical studies of mast cell tryptase in human gingiva. **Journal of Periodontology**. v.64, n.9, p.870-7, 1993.
43. KOBAYASHI, H.; ISHIZUKA, T.; OKAYAMA, Y. Human mast cells and basophils as sources of cytokines. **Clinical & Experimental Allergy**. v.9, p.1205-1212, 2000.
44. LAGDIVE, S.S; et al. Correlation of mast cells in periodontal diseases. **Journal of Indian Society of Periodontology**. v.17, n.1, p.63-67, 2013.
45. LEE, D.M, et al. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. **Science**. v.297, n.5587, p.1689-1692, 2002.
46. LEVI-SCHAFFER, F.; RUBINCHIK, E. Activated mast cells are fibrogenic for 3T3 fibroblasts. **Journal of Investigative Dermatology**. v.104, p.999–1003, 1995.
47. LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 5aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
48. LORENCINI, M.; et al. A new paradigm in the periodontal disease progression: gingival connective tissue remodeling with simultaneous collagen degradation and fibers thickening. **Tissue Cell**. v.41, n.1, p.43–50, 2009.
49. MALAVIYA, R.; et al. Mast cells process bacterial Ags through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells. **Journal of Immunology**. v.156, n.4, p.490-496, 1996.
50. MARSHALL, J.S. Mast cell responses to pathogens. **Nature Reviews**. v.4, p.787-799, 2004.

51. MARONE, G.; et al. Molecular and cellular biology of mast cells and basophils. **International Archives and Allergy Immunology**. v.114, p.207-217, 1997.
52. METCALFE, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast Cells. **Physiological Reviews**. v.77, n.4, p.1034-1079, 1997.
53. METCALFE, D.D. Mast cells and mastocytosis. **Blood**. v.112, n.4, p.946–956, 2008.
54. METZ, M.; MAURER, M. Mast cells - key effector cells in immune responses. **Trends in Immunology**. v.28, n.5, p.234-41, 2007.
55. NAESSE, E.P; et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival mast cells in persons with and without HIV-infection. **Journal of Periodontal Research**. v.38, p.575-82, 2003.
56. NANJI, A.; BOSSHARDT, D.D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Periodontology 2000**. v.40, p.11-28, 2006.
57. NURMENNEMI, P.; PERNU, H.E.; KNUTTLA, M.L.E. Mast cell subpopulations in gingival overgrowth induced by immunosuppressives and nifedipine medication. **Journal of Periodontology**. v.75, p.933-938, 2004.
58. OKADA, H.; MURAKAMI, S. Cytokine expression in periodontal health and disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**. v.9, n.3, p.248-66, 1998.
59. PAGE, R.C.; et al. Advances in pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implication and future directions. **Periodontology 2000**.; v.14, p.216-248, 1997.
60. PAGE, R.C.; SCHROEDER, H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. **Laboratory Investigation**. v.34, p.235–249, 1976.
61. PAGE, R.C.; KORNMAN, K.S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontology 2000**. v.14, p.9-11, 1997.
62. PAGE, R.C.; EKE, P.I. Case Definitions for use in population-based Surveillance of Periodontitis. **Journal of Periodontology**. v.78, p.1387-1399, 2007.
63. PAQUETTE, D.W.; WILLIAMS, R.C. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. **Periodontology 2000**. v.24, n. 1, p.239-52, 2000.

64. PINHEIRO, S.W. Avaliação comparativa do número de mastócitos na musculatura circular do esôfago e do cólon de chagásicos crônicos com ou sem mega [Tese]. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2006.
65. POPOVICI, R.A.; et al. Mast cells as key players in periodontal disease. **Archives of Biological Science**. v.66, n.2, p.801-809, 2014.
66. RAMÍREZ-ROMERO R.; et al. Reduction of pulmonary mast cells in areas of acute inflammation in calves with Mannheimia (Pasteurella) haemolytica pneumonia. **Journal of Comparative Pathology**. v.123, n.1, p.29-35, 2000.
67. RECH, R.R.; GRAÇA, D.L. Mastócitos em condições normais e patológicas – Revisão. **Veterinária Notícias**. v.12, n.1 ,p.51-60, 2006.
68. RIEKKI, R.; et al. The production of collagen and the activity of mast-cell chymase increase in human skin after irradiation therapy. **Experimental Dermatology**. v.13, n.6, p.364-71, 2004.
69. ROBINSON, L.P.; DE MARCO, T.J. Alteration of mast cell densities in experimentally inflamed human gingivae. **Journal of Periodontology**. v.43, n.10, p.614-22, 1972.
70. RODINI, C.O; BATISTA, A.C.; LARA, V.S. 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 Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**. v.97, n.1, p.59-63, 2004.
71. RUOSS, S.J.; CAUGHEY, G.H. Mast cells, basophils, and eosinophils in the evolution of pulmonary fibrosis. **Pulmonary Fibrosis (Lung Biology in health and disease series)**. p.445–480, 1995.
72. SCHROEDER, H.E. **Gingiva. Handbook of microscopic anatomy**. Vol. 5. The periodontium. Berlin. p.233–323, 1986.
73. SÉGUIER, S.; GODEAU, G.; BROUSSE, N. Collagen fibers and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunohistochemistry and automated image analysis. **Journal of Periodontology**. v.71, n.7, p.1079-1085, 2000.
74. SÉGUIER, S.; et al. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and

- tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? **Journal of Periodontology**.v.72, n.10, p.1398-13406, 2001.
- 75.SEGUNDO, T.K.; et al. Mast cells in periodontal disease of individuals with and without HIV undergoing highly active antiretroviral therapy. **Journal of Periodontology**. v.84, n.7, p.995-1001, 2013.
- 76.SANTOS, J.M. Mastócitos nas gengivites crônicas do homem. Belo Horizonte. Tese (Livre Docência), Faculdade de Odontologia e de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 1961.
- 77.SHAPIRO, S.; ULMANSKY, M.; SCHEUER, M. Mast cell population in gingiva affected by chronic destructive periodontal disease. **Journal of Periodontology**. v.40, n.5, p.276-8, 1969.
- 78.SHELTON, L.E; HALL, W.B. Human gingival mast cells. Effects of chronic inflammation. **Journal of Periodontal Research**. v.3, n.3, p.214-23, 1968.
- 79.SILVA, V.D.U. Avaliação da fotobiomodulação a laser no reparo tecidual em ratos submetidos à dieta hiperlipídica. Dissertação de Mestrado, 2014.
- 80.STEINSVOLL, S.; HALSTENSEN, T.S.; SCHENCK, K. Extensive expression of TGF-beta1 in chronically-inflamed periodontal tissue. **Journal of Clinical Periodontology**. v.26, n.6, p.366-73, 1999.
- 81.STEINSVOLL, S.; HELGELAND, K.; SCHENCK, K. Mast cells – a role in periodontal diseases? **Journal of Clinical Periodontology**. v.31, p.413–419, 2004.
- 82.SUBBA-RAO, P.V.; et al. Phagocytosis of mast cell granules by cultured fibroblasts. **Journal of Immunology**. v.130, p.341–349, 1983.
- 83.TRACKMAN, P.C. & KANTARCI, A. Connective tissue metabolism and gingival overgrowth. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**. v.15,n.3,p.165-75, 2004.
- 84.VAHABI, S.; et al. Correlation of mast cell number and different periodontal diseases. **Research Journal of Biological Sciences**. v.5, n.4, p.340-344, 2010.
- 85.VAN DYKE, T.E.; KORNMAN, K.S. Inflammation and factors that may regulate inflammatory response. **Journal of Periodontology**. v.79, p.1503-1507, 2008.

- 86.VILLA, I.; et al. Capacity of mouse mast cells to prime T cells and to induce specific antibody responses in vivo. **Immunology**. v.102, n.2, p.165-72, 2001.
- 87.WALSH, L.J.; et al. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. **Journal of Oral Pathology & Medicine**. v.24, n.6, p.266-72, 1995.
- 88.WALSH LJ. Mast cells and oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14(3):188-198.
- 89.WELLE, M. Development, significance and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. **Journal of Leukocyte Biology**. v.61, n.3, p.233-245, 1997.
- 90.ZACHRISSON, B.U.; SCHULTZ-HAUDT, S.D. A comparative histological study of clinically normal and chronically inflamed gingivae from the same individuals. **Odontologisk Tidskrift**. v.76, n.2, p.179-92, 1968.
- 91.ZHAO, Z.Z; et al. A Fluorometric microassay for histamine release from human gingival mast cells. **Journal of Periodontal Research**. v.36, p.233-236, 2001.

ANEXO

**Aprovado pelo CEP**

Campinas, 24 de Agosto de 2006.

A

C. D. Tânia Shirley Carvalho Almeida
Curso: Mestrado em Periodontia

Prezado(a) Aluno(a):

O projeto de sua autoria: "ANÁLISE QUANTITATIVA DE MASTÓCITOS EM TECIDO PERIODONTAL CLINICAMENTE SAUDÁVEL, COM PERIODONTITE E GENGIVITE".

Orientado pelo(a) Prof.(a) Dr.(a) Patrícia Amos Cury.

Entregue na Secretaria de Pós-Graduação do CPO - São Leopoldo Mandic, no dia 31/07/2006, com número de protocolo nº 06/306 foi APROVADO pelo Comitê de Ética e Pesquisa instituído nesta Universidade de acordo com a resolução 196 / 1.996 do CNS – Ministério da Saúde, em reunião realizada no dia 20/08/2006.

Cordialmente

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Thomaz Wassall".

Coordenador de Pós-Graduação
Prof. Dr. Thomaz Wassall