

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

LUCIANO ALBERTO DE CASTRO

**ANÁLISE MICROSCÓPICA E DA IMUNOEXPRESSÃO DOS
MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR Ki-67 E CICLINA B1 NO
EPITÉLIO GENGIVAL DE PACIENTES SOB TERAPIA COM NIFEDIPINA**

Goiânia
2006

LUCIANO ALBERTO DE CASTRO

ANÁLISE MICROSCÓPICA E DA IMUNOEXPRESSÃO DOS
MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR Ki-67 E CICLINA B1 NO
EPITÉLIO GENGIVAL DE PACIENTES SOB TERAPIA COM NIFEDIPINA

Dissertação apresentada à Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientador: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça
Co-orientadora: Profa. Dra. Aline Carvalho Batista

Goiânia
2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Castro, Luciano Alberto. -

Análise microscópica e da imunoexpressão dos marcadores de proliferação celular Ki-67 e Ciclina B1 no epitélio gengival de pacientes sob terapia com nifedipina / Luciano Alberto Castro. Goiânia, 2006.

78 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça.

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Odontologia - Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2006.

1. Proliferação de células. 2. Apoptose. 3. Nifedipina. 4. Efeitos adversos. 5. Crescimento excessivo da gengiva I. Mendonça, Elismauro Francisco. II. Universidade Federal de Goiás. III. Título.

CDU: 616.314:615-461

DADOS CURRICULARES

LUCIANO ALBERTO DE CASTRO

Nascimento	05/02/1966
Filiação	José Affonso da Silva Castro Jandira Alves de Castro
1985-1989	Curso de Graduação na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO-UFG)
2000-2002	Curso de Especialização em Periodontia na Associação Brasileira de Odontologia – Seção de Goiás (ABO-GO)
2004-2006	Curso de Mestrado em Odontologia, área de concentração em Clínica Odontológica na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO-UFG)

LUCIANO ALBERTO DE CASTRO

ANÁLISE MICROSCÓPICA E DA IMUNOEXPRESSÃO DOS
MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR Ki-67 E CICLINA B1 NO
EPITÉLIO GENGIVAL DE PACIENTES SOB TERAPIA COM NIFEDIPINA

Dissertação apresentada à Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em _____/_____/_____,
Banca Examinadora constituída pelos Professores Doutores:

Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça
Presidente da Banca

Profª. Dra.. Maria do Carmo Machado Guimarães
Membro da Banca

Prof. Dr. Adérico Santana Guilherme
Membro da Banca

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, VICTOR HUGO, JOÃO GABRIEL E LUCIANO, os bens mais caros da minha existência e a principal razão do meu esforço profissional. Durante o tempo deste Mestrado, sofremos mutuamente, mas a infinita bondade divina nos fez fortes e capazes de entender e superar as dificuldades da minha ausência, acreditando sempre num futuro vitorioso e recompensador para todos nós.

À minha esposa, IRACELE, que sempre me cobriu com seu amor, carinho e compreensão. Desde a minha decisão de fazer o Mestrado até a conclusão do curso, sempre esteve ao meu lado, suprimindo a minha falta em casa e desdobrando-se como esposa, mãe e trabalhadora. O seu apoio foi inestimável para a conclusão deste trabalho.

À minha mãe, JANDIRA, que, mesmo distante, sempre torce e reza por mim. Sinto que seu amor me protege e me abençoa.

À memória do meu pai, AFFONSO, de quem eu sinto muita falta e imensa saudade, mas sei que está guardado em um bom lugar e sempre está junto de mim.

Finalmente, dedico este trabalho aos PACIENTES que, com extrema simplicidade, generosidade e confiança, aceitaram participar desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, o princípio fundamental de tudo. Obrigado, Senhor, por conduzir os meus passos e ter me agraciado com esta oportunidade de realização pessoal e profissional.

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, por ter proporcionado todas as condições para a realização deste Mestrado. Quatorze anos após concluir a Graduação na FO/UFG, sinto uma enorme satisfação em voltar à minha “casa” como aluno de Pós-Graduação.

À Profa. Dra. LUCIANE RIBEIRO DE REZENDE SUCASAS DA COSTA, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UFG, pela seriedade e empenho com que conduz o seu trabalho dentro da Universidade.

Ao orientador do presente trabalho, Prof. Dr. ELISMAURO FRANCISCO DE MENDONÇA, por quem tenho grande admiração e respeito e a quem agradeço a confiança no meu potencial e por ter me dado a oportunidade do convívio e enriquecimento científico.

À co-orientadora deste estudo, Profa. Dra. ALINE CARVALHO BATISTA, pela sua disponibilidade para a orientação e por compartilhar comigo a sua experiência como pesquisadora.

A todos os meus Professores do Mestrado: VÂNIA MARCELO, CLÁUDIO LELES, LUCIANE SUCASAS, REJANE FARIA RIBEIRO-ROTTA, MARIA ALVES, MARCOS LENZA, ELISMAURO MENDONÇA, FERNANDO ALMEIDA, FABIANA PIMENTA, ANA CLARA TIPPLE e MARIA MARGARETH NAVES. Eu, seguramente, ao

concluir este curso, estarei levando um pouco do ensinamento de cada um de vocês e o orgulho de ter sido aluno da UFG.

Ao Prof. Dr. CLÁUDIO RODRIGUES LELES, pela sua valiosa ajuda na análise estatística.

Aos meus Colegas de curso: ANA FLÁVIA, ANAILDE, ÉZIO, FREDERICO, GEISA, JANAÍNA, LILIANE, MÁRCIO, PAULENE, REGINA, SESOSTRES, TÂMARA E WILLIAM e, especialmente, ao JOSÉ VIEIRA de quem eu estive mais próximo e com quem pude partilhar uma grande amizade.

Aos colegas do Centro Goiano de Doenças da Boca (CGDB): KÁTIA FERNANDES, pela amabilidade, gentileza e companheirismo e SATIRO WATANABE, exemplo de capacidade profissional, humildade e desprendimento na arte da docência.

Ao amigo e colega WILTON BRITO, que, com bom humor e companheirismo, prestou uma enorme ajuda para a obtenção da amostra deste estudo.

Às funcionárias do CGDB, CLAUDINHA E FABIANA, especialmente à CLAUDINHA, pela sua bondade, presteza e dedicação e pela imprescindível ajuda no agendamento e atendimento dos meus pacientes da pesquisa.

À SIMONE e ao JÚNIOR, pela presteza e atenção com que me ajudaram no laboratório de Patologia Bucal da UFG.

À HELENISA e ANGÉLICA, pela indispensável ajuda no laboratório de imunoistoquímica.

Ao meu TIO ADÃO, uma das pessoas mais generosas e admiráveis que eu já conheci e que abriu as portas da sua casa para mim em Goiânia. À TIA MARIA ELISA, que

sempre me acolheu como filho e aos meus primos PAULO IÚRI, MARÍLIA e ANINHA, pela amizade e por torcerem pelo meu sucesso.

Ao meu irmão, ALESSANDRO, por ser o amigo fiel e incondicional de todas as situações. Durante o curso, como em toda a vida, estive ao meu lado e sempre pronto a me ajudar em tudo que eu precisei.

Às minhas cunhadas, IRACYENE E IRACYARA, pelo importante apoio que deram à minha família durante as inúmeras viagens a Goiânia.

Aos Coordenadores do Serviço Odontológico da PM-TO, Tenente-coronel MIGUEL ÂNGELO DE SENNA (*in memorian*) e Tenente-coronel LEONAM RODRIGUES ALVES, pela grande amizade e compreensão que os fizeram entender que o prejuízo da minha ausência no Serviço era justificado não só por um projeto pessoal, mas também por um investimento na qualidade do atendimento prestado aos usuários de todo o Serviço Odontológico.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À POLÍCIA MILITAR DO ESTADO DO TOCANTINS, a valorosa instituição à qual tenho orgulho de pertencer há mais de doze anos e que tem me proporcionado um prazeroso e gratificante ambiente de trabalho. Em especial, quero prestar agradecimento ao atual Comandante Geral da PM-TO, o Senhor Coronel PM RAIMUNDO BONFIM AZEVEDO COELHO, pela sua maneira democrática e honesta de comandar, pela consideração e respeito que sempre me dispensou e pela imensa generosidade com que me concedeu a autorização para realizar este Curso de Mestrado.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas, o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá.

RESUMO

O crescimento gengival induzido por drogas (CGID) é um efeito adverso associado ao uso crônico de três medicamentos principais: a fenitoína, um anticonvulsivante, a ciclosporina, uma droga imunossupressora e os agentes farmacológicos conhecidos como bloqueadores dos canais de cálcio (BCC). A nifedipina é um bloqueador dos canais de cálcio que, por sua potente ação vasodilatadora, tornou-se uma droga largamente utilizada em cardioterapia, especialmente, para controle da hipertensão arterial. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as características microscópicas e o índice proliferativo epitelial do tecido gengival de pacientes sob terapia crônica com nifedipina. Para este fim, foram obtidas vinte amostras de tecido gengival de usuários crônicos de nifedipina, sendo que, a maioria dos pacientes não apresentava CG clinicamente detectável. Para fins comparativos, foram utilizadas nove amostras de tecido gengival de pacientes saudáveis e não usuários de drogas indutoras de CG (controle). As amostras foram avaliadas microscopicamente, por meio da coloração de hematoxilina-eosina, quanto ao tamanho das cristas epiteliais. Para a avaliação do índice proliferativo epitelial, foi realizada a identificação celular das proteínas Ki-67 e Ciclina B1 pela técnica da imunistoquímica (streptavidina-biotina-peroxidase), bem como a quantificação das células positivas (células +) por mm^2 . Os resultados revelaram que os pacientes usuários de nifedipina exibiram um tecido epitelial com cristas significativamente mais longas do que os pacientes do grupo controle (Mann-Whitney, $p=0,02$). No entanto, quanto à atividade proliferativa dos queratinócitos, não pôde ser observada diferença significativa entre os dois grupos (Mann-Whitney, $p>0,05$). Os achados revelaram que as alterações microscópicas observadas no epitélio de pacientes usuários de nifedipina não ocorreram por aumento da atividade mitótica dos queratinócitos, mas considerando dados da literatura, sugere-se que este aumento possa ocorrer devido a uma inibição da taxa de apoptose destas células.

Palavras-chave: Proliferação de células, Apoptose, Nifedipina, Efeitos adversos.

ABSTRACT

Drug induced gingival overgrowth (DIGO) is an adverse effect associated with the chronic use of three main drugs: phenytoin, an anticonvulsant, cyclosporin, an immunosuppressant drug and the pharmacological agents known as calcium channel blockers (CCB). Nifedipine is a calcium channel blocker, which because of its strong vessel dilating action has become widely used in cardiotherapy, in particular for the control of arterial hypertension. The aim of this study is to evaluate the microscopic characteristics and the epithelial proliferation index of gingival tissue in patients undergoing chronic treatment with nifedipine. To do so, twenty samples of gingival tissue of patients undergoing chronic treatment with nifedipine were obtained. The majority of these patients did not present clinically detectable gingival overgrowth. For comparative purposes, nine samples of gingival tissues of healthy patients who did not use drugs associated with gingival overgrowth (control) were used. The samples were microscopically analyzed using hematoxylin-eosin staining, to determine the size of the epithelial rete pegs. To carry out the epithelial proliferation index evaluation, a cellular identification of the Ki-67 and B1 Cyclin proteins was done using the immunohistochemical technique (streptavidin-biotin-peroxidase), as well as the quantification of positive cells (+cells) in mm². The results showed that the epithelial tissue of nifedipine users has considerably longer rete pegs than that of the control group (Mann-Whitney, $p=0.02$). However, with regard to the proliferating activity of the keratinocytes, no significant difference was observed between the two groups (Mann-Whitney, $p>0.05$). The findings show that the microscopic alterations observed in the epithelium of nifedipine users are not caused by the mitotic activity of the keratinocytes but taking data from the literature into consideration, it is

suggested that this increase might be caused by an inhibition of apoptosis rate of these same cells.

Keywords: Cell Proliferation, Apoptosis, Nifedipine, Adverse effect.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1	Anticorpos primários e suas respectivas diluições, clones, códigos e fabricantes utilizados nas amostras.....	55
Quadro 2	Médias, desvios padrão e postos médios do número de células epiteliais Ki-67+ e Ciclina B1+ por mm ²	60
Quadro 3	Informações gerais sobre os pacientes e as variáveis utilizadas.....	Apêndice III
Tabela 1	Médias, desvios padrão, valores mínimos e máximos das variáveis demográficas e farmacológicas nos dois grupos.....	58
Tabela 2	Porcentagem de cristas epiteliais alongadas nos dois grupos.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do ciclo celular.....	28
Figura 2	Amostra de tecido gengival de paciente usuário de nifedipina. A – Epitélio paraqueratinizado exibindo crista epitelial longa (seta vermelha). B – Tecido conjuntivo com intensa colagenização (seta amarela) e ausência de infiltrado inflamatório (H.E., Aumento Original de 25x).....	61
Figura 3	Amostra de tecido gengival de paciente controle. A - Epitélio paraqueratinizado com cristas curtas (seta azul). B - Tecido conjuntivo exibindo grande número de fibroblastos, fibras colágenas (seta verde) e ausência de infiltrado inflamatório (H.E., Aumento Original de 25x).....	61
Figura 4	Amostra de tecido gengival de paciente usuário de nifedipina. A - Epitélio paraqueratinizado com cristas longas (seta amarela). B - Tecido conjuntivo exibindo grande número de fibroblastos, fibras colágenas e ausência de infiltrado inflamatório (H.E., Aumento Original de 25x).....	61
Figura 5	Amostra de tecido gengival de paciente controle. A - Epitélio paraqueratinizado com cristas curtas (seta azul). B - Tecido conjuntivo exibindo grande número de fibroblastos, fibras colágenas (seta verde) e ausência de infiltrado inflamatório (H.E., Aumento Original de 25x).....	61
Figura 6	Amostra de tecido gengival de paciente teste mostrando muitas células epiteliais Ki-67 positivas (em marrom), com marcação nuclear, presentes principalmente na camada basal. (Imunoistoquímica, Aumento Original de 100x).....	62
Figura 7	Amostra de tecido gengival de paciente controle mostrando muitas células epiteliais Ki-67 positivas (em marrom), com marcação nuclear, presentes principalmente na camada basal. (Imunoistoquímica, Aumento Original de 100x).....	62
Figura 8	Amostra de tecido gengival de paciente teste mostrando poucas células epiteliais Ciclina B1 positivas (em marrom), com marcação citoplasmática, presentes principalmente na camada basal. (Imunoistoquímica, Aumento Original de 100x).....	62
Figura 9	Amostra de tecido gengival de paciente controle mostrando poucas células epiteliais Ciclina B1 positivas (em marrom), com marcação citoplasmática, presentes principalmente na camada basal. (Imunoistoquímica, Aumento Original de 100x).....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

BCC	Bloqueador dos canais de cálcio
bFGF	Basic fibroblast growth factor (Fator de crescimento de fibroblastos básico)
BSA	Bovine serum albumina (Soro-albumina bovina)
CG	Crescimento gengival
CGIC	Crescimento gengival induzido por ciclosporina
CGID	Crescimento gengival induzido por drogas
CGIF	Crescimento gengival induzido por fenitoína
CGIN	Crescimento gengival induzido por nifedipina
DAB	Diaminobenzidine (Diaminobenzidina)
ECA	Enzima conversora da angiotensina
H-E	Hematoxilina e eosina
IGF-1	Insulin-like growth factor-1 (Fator de crescimento semelhante à insulina-1)
IL	Interleucina
KGF	Keratinocyte growth factor (Fator de crescimento dos queratinócitos)
LPS	Lipopolissacáride
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
MPF	M phase promoting factor (Fator promotor de mitose)
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid (Ácido ribonucléico mensageiro)
PDGF-β	Platelet-derived growth factor- β (Fator de crescimento derivado das plaquetas-β)
PSC	Profundidade de sondagem clínica
SEM	Scanning electron microscopy (Microscopia eletrônica de varredura)
SF	Scatter Factor (Fator de dispersão)
TBS	Tris buffered saline
TGF-β1	Transforming growth factor - β1 (Fator de crescimento transformador-β1)
Th: 1	T <i>helper</i> (Linfócito)
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento vascular endotelial)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1	CONCEITOS BÁSICOS.....	24
2.1.1	O Metabolismo Celular do Íon Cálcio	24
2.1.2	O Ciclo Celular e os Marcadores de Proliferação Celular.....	26
2.2	EPIDEMIOLOGIA DO CRESCIMENTO GENGIVAL INDUZIDO POR NIFEDIPINA.....	30
2.3	PATOGÊNESE DO CRESCIMENTO GENGIVAL.....	32
2.3.1	O Papel da Inflamação, dos Fibroblastos e da Matriz Extracelular.....	34
2.3.2	Os Efeitos das Drogas no Epitélio Gengival	42
2.3.3	A Interação Epitélio-Tecido Conjuntivo.....	47
3	PROPOSIÇÃO	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1	SELEÇÃO DA AMOSTRA	50
4.2	EXAME CLÍNICO	51
4.3	ABORDAGEM PERIODONTAL E BIÓPSIA GENGIVAL	52
4.4	TÉCNICAS EMPREGADAS.....	53
4.4.1	Técnica Histológica Convencional (Hematoxilina e Eosina).....	53
4.4.2	Técnica Imunoistoquímica.....	53
4.5	ANÁLISES QUANTITATIVAS	55
4.5.1	Medida do Comprimento das Cristas Epiteliais	55
4.5.2	Contagem das Células por mm ²	56

4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5.	RESULTADOS.....	58
5.1	ANÁLISE SUBJETIVA	59
5.2	ANÁLISES QUANTITATIVAS	59
5.2.1	Comprimento das Cristas Epiteliais	59
5.2.2	Contagem das Células por mm ²	60
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71
	APÊNDICES.....	
	ANEXO.....	

1. INTRODUÇÃO

A nifedipina é uma diidropiridina pertencente à classe de agentes farmacológicos conhecidos como bloqueadores dos canais de cálcio (BCC). Estes são medicamentos largamente utilizados para tratamento de distúrbios cardiovasculares tais como: angina do peito, arritmias ventriculares e hipertensão arterial (MUELLER et al., 1981; OPIE et al., 1987).

O princípio de ação da nifedipina é a inibição do influxo do cálcio extracelular através das membranas das células musculares lisas dos vasos sangüíneos e das células do músculo cardíaco (ANTMAN et al., 1980). O processo de contração destes tecidos é dependente do movimento do cálcio extracelular através de canais específicos. Desta forma, bloqueando a entrada do íon cálcio, a força de contração do miocárdio é reduzida, resultando num menor consumo de oxigênio. No leito vascular, a redução do influxo de cálcio causa relaxamento arterial e, conseqüentemente, vasodilatação. Estes mecanismos fundamentam o emprego clínico da nifedipina como uma potente droga anti-hipertensiva e anti-anginosa (STONE et al., 1980; HENRY, 1980).

A hipertensão arterial é uma condição clínica altamente prevalente em todo o mundo. Dados de um recente estudo epidemiológico brasileiro indicaram que a hipertensão atingiu 46,4% dos homens e 55,9% das mulheres com idades iguais ou superiores a sessenta anos (ZAITUNE et al., 2006). Para o controle dos níveis de pressão arterial, várias medidas podem ser empregadas; desde modificações no estilo de vida até o uso de drogas anti-hipertensivas. Para a maioria dos pacientes, os diuréticos podem ser considerados como medicamentos de primeira escolha. No entanto, dependendo de outras indicações específicas como diabetes mellitus, nefropatia ou doença cardiovascular, pode haver a necessidade de

associação dos diuréticos com outras drogas como os beta-bloqueadores, os bloqueadores do receptor de angiotensina, os inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) e os bloqueadores dos canais de cálcio. Em algumas situações especiais, os BCC podem ser indicados, inclusive, como monoterapia para hipertensão ou mesmo no tratamento de outras desordens cardiovasculares (ABERNETHY; SCHWARTZ, 1999, WHO, INTERNATIONAL SOCIETY OF HYPERTENSION WRITING GROUP, 2003).

Os BCC, embora sejam medicações extremamente úteis, podem gerar alguns efeitos colaterais indesejáveis. Os efeitos tóxicos mais importantes consistem em extensões diretas de sua ação terapêutica, já que a inibição excessiva do cálcio pode causar depressão cardíaca grave, incluindo bradicardia, bloqueio atrioventricular, insuficiência cardíaca congestiva e parada cardíaca. Outros efeitos de menor importância são tontura, rubor facial, constipação intestinal, náusea e edema periférico (KATZUNG; CHATERJEE, 2003).

De especial interesse para a Odontologia é a ocorrência de crescimento gengival (CG) após o uso da nifedipina. Além do notório comprometimento estético, este efeito adverso pode interferir nas próprias funções orais, prejudicando a mastigação e a fonação. Assim, nos casos mais severos, há a necessidade de repetidas cirurgias para a correção estética ou funcional (WESTBROOK et al., 1997; SEYMOUR; THOMASON e ELLIS, 1996). Além disto, o CG é capaz de produzir uma modificação no micro-ambiente gengival, ou seja, as dimensões gengivais aumentadas geram sítios de intensa anaerobiose. Essa alteração no nível de tensão de oxigênio favorece a proliferação de bastonetes anaeróbios Gram-negativos que podem iniciar ou agravar a doença periodontal destrutiva (NAKOU et al., 1998; LEUNG et al., 2003).

Embora o mecanismo de instalação do CG ainda não esteja totalmente esclarecido, alguns trabalhos indicaram que, pelo menos em parte, a proliferação celular pode ser responsável pelo aumento de volume do tecido gengival. Estudos utilizando a técnica de

imunoistoquímica e cultura de células detectaram aumento da atividade proliferativa de fibroblastos e queratinócitos em CG induzidos por nifedipina, ciclosporina, fenitoína e vigabatrina (SAITO et al., 1999; NURMENNIEMI; PERNU e KNUUTTILA, 2001; PARKAR et al., 2004; TAKEUCHI, 2004; MESA et al., 2004).

O espessamento do tecido epitelial é um aspecto marcante da hiperplasia gengival induzida por nifedipina e tem sido relatado desde os primeiros estudos microscópicos (LEDERMAN et al., 1984; BARAK; ENGELBERG e HISS, 1987). Um achado interessante do estudo de Barak et al. (1987) foi que os tecidos gengivais dos pacientes sob terapia com nifedipina exibiram graus variados de prolongamento das cristas epiteliais, mesmo que não manifestassem um CG clinicamente expressivo. Todavia, ainda não está esclarecido se estas alterações epiteliais subclínicas estão associadas a um aumento da atividade mitótica dos queratinócitos.

O comportamento proliferativo dos queratinócitos pode ser investigado por meio da identificação de proteínas específicas que são expressas nas diferentes fases do ciclo celular. Assim, a técnica da imunoistoquímica, que utiliza anticorpos específicos contra alvos desejados, permite o reconhecimento de proteínas que são marcadores de proliferação celular. O Ki-67 é uma proteína nuclear que está presente em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M); porém, está ausente na fase de repouso (G0). Assim, a expressão do antígeno Ki-67 é um excelente recurso para a identificação da fração de crescimento de uma dada população celular (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

A Ciclina B1 é uma proteína citoplasmática que conjugada com outra proteína conhecida como Cdk 1 forma o MPF (*M-phase Promoting Factor*), ou seja, o fator promotor de mitose. Assim, a ciclina B1 é um membro de ciclinas mitóticas que regulam a entrada da célula em mitose (HWANG et al., 1995). Estudos com citometria de fluxo mostraram que a Ciclina B1 começa a se acumular na fase S e G2, atingindo um pico de concentração na

mitose, especialmente na metáfase (WIDROW et al., 1997). Deste modo, a identificação da Ciclina B1 tem sido utilizada como um indicador da taxa de células que estão em mitose no CG (PARKAR et al., 2004; TAKEUCHI, 2004).

O objetivo deste estudo foi avaliar as características microscópicas e a imunexpressão dos marcadores de proliferação celular Ki-67 e Ciclina B1 no epitélio gengival de pacientes sob uso contínuo e regular da nifedipina. Além da análise imunoistoquímica, utilizamos a técnica histológica convencional para detectar possíveis efeitos da nifedipina sobre o epitélio, mesmo em nível subclínico. Essa investigação justifica-se em função do grande número de pacientes que utilizam regularmente este medicamento. A análise destes resultados, além de contribuir para a compreensão da patogênese do crescimento gengival, pode fornecer importantes informações sobre a segurança do uso continuado de nifedipina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A primeira referência de crescimento gengival induzido por drogas (CGID) foi feita em 1939, portanto, há mais de sessenta anos. Naquela ocasião, o autor reportou um caso de hiperplasia gengival associada ao uso crônico da droga anticonvulsivante fenitoína (KIMBALL, 1939).

Com a evolução da Farmacologia e o aparecimento de novas drogas, surgiram outros relatos de hiperplasia gengival medicamentosa. Assim, no início da década de oitenta, houve uma revolução na terapia dos transplantes com a descoberta das propriedades imunossupressoras da ciclosporina. O uso dessa droga aumentou consideravelmente a sobrevida dos pacientes transplantados, no entanto, vários efeitos colaterais também foram observados como hipertensão, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e hiperplasia gengival. Em 1983, foi publicado o primeiro relato de crescimento gengival associado ao uso de ciclosporina (RATEITSCHAK-PLÜSS et al., 1983).

No ano seguinte, dois trabalhos pioneiros e independentes relataram o crescimento gengival associado à terapia com nifedipina. Lederman et al. (1984) descreveram este efeito colateral em uma paciente de 58 anos que fazia uso de 90 mg/dia de nifedipina durante três meses. O CG manifestou-se como um aumento tecidual de aspecto lobular e generalizado, localizando-se tanto nas papilas vestibulares quanto nas linguais. Ramon et al. (1984) relataram a ocorrência de CG em cinco pacientes medicados com doses diárias de 30 a 60 mg de nifedipina. Após estes casos iniciais, autores de várias partes do mundo publicaram relatos que confirmariam a associação entre o uso crônico de nifedipina e o CG (LUCAS; HOWELL e WALL, 1985; VAN DER WALL; TUINZING e HES, 1985; ZLOTOGORSKI et al., 1989).

De maneira surpreendente, pôde ser observado que drogas com estruturas químicas e indicações terapêuticas diversas como fenitoína, ciclosporina e nifedipina eram capazes de induzir crescimentos gengivais semelhantes do ponto de vista clínico e microscópico (BENCINI et al., 1985).

2.1 CONCEITOS BÁSICOS

2.1.1 Metabolismo Celular do Íon Cálcio

É bem conhecido que o íon cálcio (Ca^{2+}) é um importante mensageiro usado em várias funções celulares. Nas células eucariotas, variações no nível do cálcio citosólico regulam processos como a segregação de cromossomos, a fertilização e a contração muscular. Do mesmo modo, nas células procariotas, o íon cálcio está incrivelmente implicado com numerosas funções bacterianas, interferindo na patogenicidade, quimiotaxia e no ciclo celular. A concentração do cálcio livre no citosol é mantida em níveis muito baixos em relação ao meio extracelular tanto em células procariotas como eucariotas. O conhecimento de que os mecanismos controladores do cálcio intracelular de procariotas e leveduras são muito semelhantes àqueles dos vertebrados comprova a importância crucial deste íon nas funções celulares, desde as células mais simples até as mais complexas (NORRIS, 1989; NORRIS et al., 1996).

Uma interessante característica do íon cálcio é que a célula não é capaz de produzi-lo e nem de destruí-lo, mas unicamente controlar suas concentrações intracelulares usando o meio extracelular como fonte principal. Assim, as células evolutivamente têm conseguido “domesticar” o íon cálcio utilizando uma complexa maquinaria que lhes permite controlar, com muita precisão, os níveis de cálcio iônico intracelular. Este controle pode se dar por meio de proteínas que se ligam ao cálcio, bombas que retiram Ca^{2+} de depósitos

intracelulares (retículo endoplasmático) e do meio extracelular ou através de canais da membrana citoplasmática que são permeáveis ao cálcio (ELLIOTT, 2001).

Curiosamente, a mobilização do íon cálcio não ocorre de modo similar em todas as células. Nas células excitáveis, ou seja, capazes de disparar potenciais de ação em suas membranas, o aumento da concentração do cálcio citosólico se dá por meio do influxo de cálcio extracelular através de canais dependentes de voltagem e também a partir dos depósitos intracelulares oriundos do retículo endoplasmático. As células musculares lisas e os neurônios são exemplos de células excitáveis. Nas células não-excitáveis como os fibroblastos, a mobilização do Ca^{2+} pode ocorrer a partir dos depósitos intracelulares e também a partir do meio extracelular. Nesse último caso, o cálcio pode passar por dois tipos diferentes de canais, a saber, os canais dependentes de depósito (ativados quando ocorre queda no nível de Ca^{2+} intracelular) e os canais independentes de depósitos (também chamados canais catiônicos não-seletivos) que podem ser abertos por mensageiros intracelulares tais como o ácido araquidônico. Resumindo, há basicamente três vias pelas quais o Ca^{2+} pode entrar numa célula animal: os canais de cálcio operados por voltagem, os canais dependentes de depósitos e os canais catiônicos não-específicos (BARRITT, 1999).

Existem vários tipos canais de cálcio regulados por voltagem que foram classificados com base numa combinação de critérios eletrofisiológicos e farmacológicos. Até o momento, estão descritos seis subtipos de canais de cálcio regulados por voltagem: L, T, N, P, Q e R. Esses subtipos variam quanto à sua cinética de ativação e inativação, seu limiar de voltagem para a ativação, condutância e sensibilidade a agentes bloqueadores. Em geral, os canais L são importantes na regulação da contração do músculo liso e cardíaco. Os canais N (bem como os canais P e Q) estão envolvidos na liberação de neurotransmissores e

hormônios, enquanto os canais T medeiam a entrada de Ca^{2+} nos neurônios (RANG et al., 2003).

Os canais de cálcio do tipo L são estruturas complexas que foram inicialmente identificadas nas membranas plasmáticas de células musculares cardíacas. Posteriormente, esses canais também foram isolados em células musculares lisas que compõem os vasos sanguíneos, o útero, os bronquíolos e os tecidos gastrintestinal e geniturinário. Estudos futuros demonstraram que, até mesmo algumas células não-contráteis (como os leucócitos, as plaquetas e as células das glândulas salivares) podem conter canais de cálcio do tipo L. As drogas conhecidas como bloqueadores dos canais de cálcio (BCC) são capazes de se ligar diretamente a esses canais específicos e bloquear a entrada do íon cálcio nas células. É por meio desse mecanismo que os BCC conseguem diminuir a contratilidade das fibras musculares do coração e dos vasos sanguíneos (ABERNETHY; SCHWARTZ, 1999).

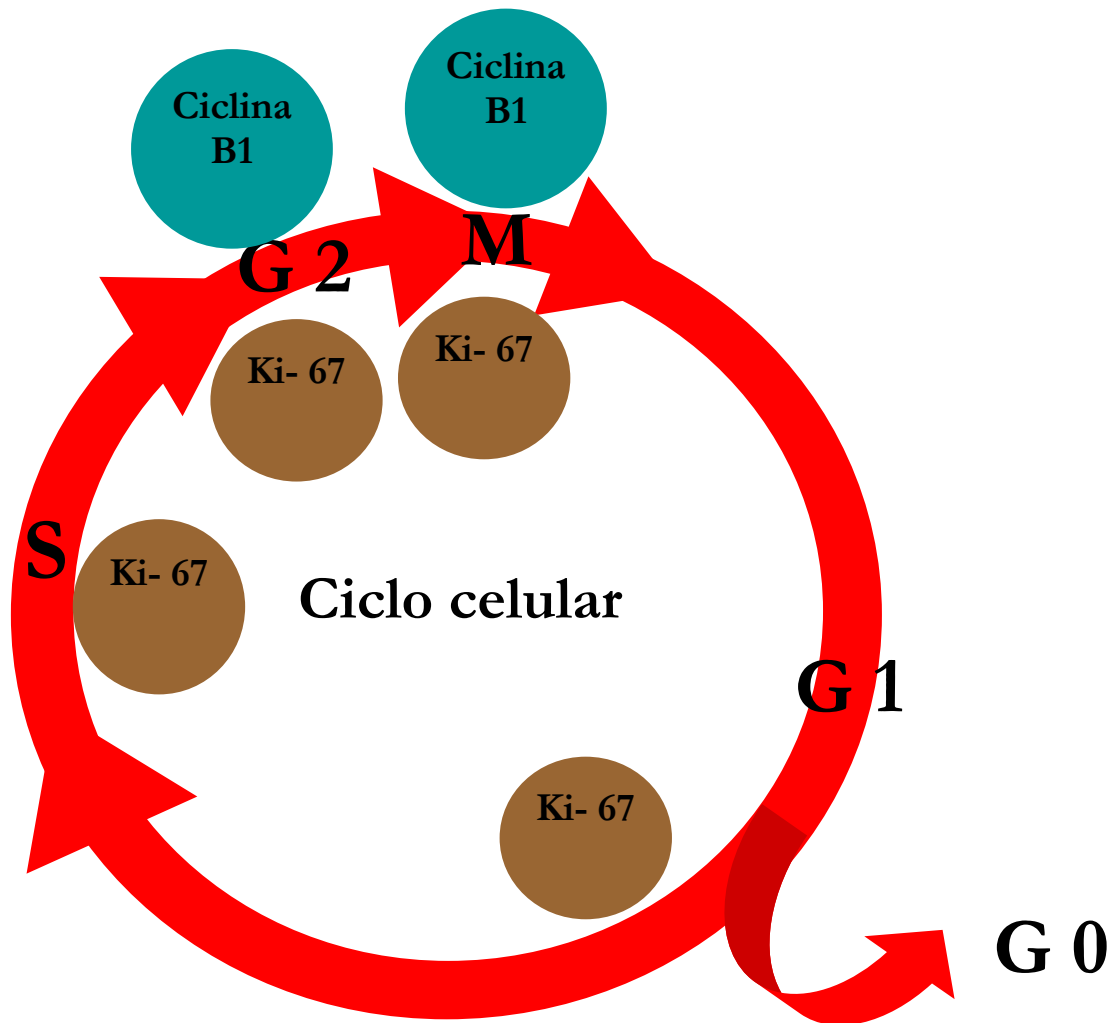
2.1.2 O Ciclo Celular e os Marcadores de Proliferação Celular

A teoria celular proposta por Rudolf Virchow, em 1855, estabeleceu que a célula constitui-se na unidade morfológica e funcional de todos os seres vivos. Embora este conceito não possa ser totalmente aceito nos dias atuais, sabe-se que desde as formas mais rudimentares de vida como os microrganismos até seres mais complexos como plantas e animais, todos são constituídos por células. A partir desse conceito, pode-se concluir que a continuidade da vida depende da divisão celular, ou seja, a única maneira de se gerar mais células é através de células pré-existentes. O princípio é simples, uma célula duplica o seu conteúdo, divide-se em duas células-filhas idênticas e assim ocorre a continuidade da vida. O ciclo de duplicação e divisão celular é conhecido como ciclo celular (MURRAY; HUNT, 1993).

O ciclo celular também pode ser entendido como o período de tempo entre duas divisões celulares sucessivas. A duração do ciclo varia enormemente entre diferentes organismos, entre células em diferentes fases de desenvolvimento e entre diferentes tipos de células no mesmo organismo. Por exemplo, a divisão celular da bactéria *Escherichia coli* pode levar apenas vinte minutos. O ciclo celular de leveduras do gênero *Saccharomyces* pode durar de 90 a 120 minutos. As células de mamíferos que se dividem mais rapidamente, têm um ciclo de aproximadamente 24 horas (VINELLA; D'ARI, 1995; FORSBURG; NURSE, 1991, NORBURY; NURSE, 1992).

O ciclo celular é tradicionalmente dividido em duas fases: intérfase e mitose. A intérfase é o período em que a célula se organiza para entrar em divisão e a mitose ou fase M é a divisão celular propriamente dita. A observação de que a duplicação (replicação) dos cromossomos ocorre durante um momento específico da intérfase, originou subdivisão dessa fase em três partes: Fase S(*synthesis*), período no qual ocorre a síntese do DNA; a Fase G1 (*Gap1*), antecedente da síntese e a Fase G2 (*Gap2*), período após a síntese de DNA e imediatamente anterior à mitose. Há ainda a fase G0 que acontece quando as células abandonam o ciclo e param de se dividir temporária ou definitivamente (vide figura1). O período de mitose é uma fase relativamente curta do ciclo celular, sendo a sua duração bastante constante entre diferentes tipos de células (freqüentemente cerca de uma hora). O mesmo acontece com as fases S e G2, verificando-se que, em termos de duração, a maior variabilidade ocorre na fase G1. Essa fase corresponde ao período em que a célula cresce e executa suas funções e verifica-se que, com raras exceções, as células que entram em G0, fazem-no em um ponto imediatamente anterior à iniciação da síntese de DNA. Os processos essenciais envolvidos na duplicação e divisão do conteúdo celular são coordenados e induzidos por um grande número de moléculas presentes, tanto no meio extracelular, quanto no meio intracelular (JACOBS, 1992; TAVARES; PERDIGÃO, 2001).

Figura 1- Representação esquemática do ciclo celular (Adaptada de Junqueira e Carneiro,2004)



Atualmente, existe muito interesse na utilidade clínica dos marcadores imunoistoquímicos de proliferação celular, particularmente, os marcadores nucleares. A imunoistoquímica é uma técnica que se utiliza da alta especificidade da reação antígeno-anticorpo para a localização de moléculas (antígenos) expressas pelas células durante o ciclo celular. Assim, para se localizar uma determinada proteína, a imunoistoquímica usa anticorpos específicos que se ligam fortemente a esta molécula; porém, para que este complexo antígeno-anticorpo seja visualizado ao microscópio, é preciso o acoplamento de todo este sistema a vários tipos de marcadores. (HALL; WOODS, 1990).

O Ki-67 é uma proteína não-histônica com peso molecular aparente de 345 a 348 quilodaltons, presente em todas as fases do ciclo celular, exceto G0 (figura 1). Apesar disso, existem oscilações no nível desta proteína que ocorrem devido a variações quantitativas da síntese desta molécula em diferentes fases do ciclo celular. Assim, o antígeno Ki-67 é um marcador para detectar a fração de uma determinada população celular que está em crescimento, porém sua maior expressão ocorre nas fases G2 e M. Originalmente, o antígeno Ki-67 somente podia ser estudado em secções congeladas. Porém, uma série de anticorpos anti-Ki67 (anticorpos MIB) desenvolvida por pesquisadores alemães permitiu a identificação dessa proteína em material tumoral embebido em parafina após a recuperação antigênica (BRUNO; DARZYNKIEWICZ, 1992; GERDES et al., 1992).

As ciclinas constituem um grupo de proteínas citoplasmáticas que foram inicialmente isoladas em embriões de ouriço-do-mar e que são sintetizadas e degradadas de modo cíclico, em sincronia com o ciclo celular. Essas proteínas, quando conjugadas com outras moléculas protéicas denominadas quinases ou CDKs, formam o MPF (*M-Phase Promoting factor*), ou seja, o fator citoplasmático responsável pela entrada das células em mitose. Em todas as células eucariotas, a progressão do ciclo celular é controlada pela ativação e inativação sucessivas de diferentes complexos ciclina-CDK (EVANS et al., 1983; LOHKA; HAYES e MALLER, 1988; PINES, 1999).

A quantidade de conjugados ciclina-CDK varia de acordo com a complexidade celular. Nos eucariotas inferiores, como as leveduras, há apenas dois genes que codificam CDKs. Nos mamíferos, já foram isolados dezesseis tipos de ciclinas, denominadas pelas letras A, B1, B2, C, D1, D2, D3, E, F, G1, G2, H, I, K, T1 e T2. Todas essas ciclinas têm em comum uma região de homologia, a caixa ciclina, que é na realidade um domínio de ligação para as CDKs. As ciclinas podem ser referidas como mitóticas ou da fase S conforme o seu pico de expressão ocorra durante a fase M ou S, respectivamente. A Ciclina B 1 é a principal

ciclina mitótica em eucariotas superiores que, em conjunto com a CDK 1, forma o MPF, esse complexo tem um papel essencial na transição da fase G2 para a mitose. Deste modo, o pico de expressão da Ciclina B1 ocorre nas fases G2 e M (HUNT, 1991; JOHNSON; WALKER, 1999; TAVARES; PERDIGÃO, 2001) (figura 1).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DO CRESCIMENTO GENGIVAL INDUZIDO POR NIFEDIPINA

Barak et al. (1987) publicaram um estudo pioneiro sobre a prevalência do crescimento gengival induzido por nifedipina (CGIN). Em uma amostra de 34 pacientes tratados com nifedipina, os autores encontraram crescimento gengival clinicamente evidente em apenas cinco indivíduos (14,7%). Os achados microscópicos das 34 biópsias gengivais revelaram variados graus de hiperqueratose, espessamento da camada espinhosa, proliferação fibroblástica do tecido conjuntivo que exibia também um número aumentado de vasos sanguíneos e leve infiltrado inflamatório crônico perivascular. No entanto, o achado mais marcante foi a presença de cristas epiteliais alongadas ou “*rete pegs*” em direção ao tecido conjuntivo. Os autores mediram o comprimento dessas cristas epiteliais e observaram que aqueles cinco, pacientes portadores de CG, exibiram o grau mais severo de hiperplasia epitelial. Entretanto, a análise histopatológica dos 29 pacientes sem CG evidenciou graus leves ou moderados de hiperplasia epitelial, sugerindo a nifedipina pode ter um efeito subclínico sobre o epitélio gengival.

Considerando a alta prevalência de hipertensão em idosos e que muitos destes pacientes utilizam regularmente os BCC, Fattore et al. (1991) pesquisaram as condições periodontais de 58 pacientes em um hospital de veteranos de Chicago-EUA. Desses pacientes, 23 eram usuários de nifedipina e 35 estavam recebendo diltiazem. Após avaliação periodontal, pôde ser detectada hiperplasia gengival em 74% dos pacientes tratados com diltiazem e em 83% daqueles recebendo nifedipina. Os autores reconheceram que esse estudo

teve limitações importantes por não ter avaliado o nível de higiene bucal dos pacientes e nem o tempo de uso e a dose dos medicamentos. Apesar disso, enfatizaram que hiperplasia gengival é um evento significativo nos pacientes usuários de BCC e que a ocorrência desse efeito colateral deve ser considerada quando há indicação para o uso dessas drogas.

Em 1992, Barclay et al. investigaram a incidência e severidade do CGID em um grupo de dezenove pacientes cardiopatas. Além desses, foram avaliados nove usuários de atenolol e dezenove pacientes saudáveis. Dentre os dezenove pacientes usuários de nifedipina, quatro (21%) apresentaram CG significativo que exigiu remoção cirúrgica. A análise do índice de placa não mostrou diferença significativa nos três grupos. No entanto, os pacientes tratados com nifedipina exibiram índice gengival significativamente superior aos demais grupos. Com relação à incidência relativamente alta do estudo, os autores consideraram que o recrutamento de pacientes em um hospital como feito neste trabalho não tem um valor tão representativo como o da população em geral. Outro aspecto interessante é que, apesar de exibirem índices de placa semelhantes aos outros pacientes, os usuários de nifedipina mostraram maior índice inflamação gengival. Desse modo, os autores ressaltaram o papel do tecido conjuntivo e da resposta inflamatória na patogênese do CG.

Nery et al. (1995) realizaram um estudo sobre prevalência CGIN em um grupo de 181 pacientes recrutados em um centro de atendimento a idosos. A prevalência de CG foi de 43,6%, ou seja, 79 de 181. É interessante que, nesse trabalho, os autores incluíram também pacientes edentados usuários ou não de próteses. Dentre os 39 edentados, quatro pacientes (10,3%) apresentaram CG. Os resultados mostraram que os fatores mais fortemente associados ao CGIN foram o índice de higiene bucal e a presença de dentes. Não ficou definido o grau de CG encontrado nos pacientes edentados; porém, 21 pacientes dentados tiveram índice de crescimento gengival de 2 ou 3. A análise microscópica do CG de cinco

pacientes dentados mostrou alterações no epitélio e tecido conjuntivo que foram compatíveis com aquelas descritas em estudos anteriores.

Com o objetivo de obter uma amostragem representativa de uma grande área populacional, Ellis et al. (1999) empreenderam uma investigação sobre a prevalência do CG entre os usuários dos BCC nifedipina, amlodipina e diltiazem em 911 pessoas. Os autores enfatizaram que, ao contrário de trabalhos anteriores que recrutaram pacientes em hospitais, esse estudo abrangeu uma área urbana com 1,15 milhão de pessoas. De 442 indivíduos tratados com nifedipina, apenas 6,3% exibiram CG significativo. Os pesquisadores concluíram que a prevalência de CGIN clinicamente importante foi muito mais baixa do que a observada em trabalhos anteriores. Além disto, pôde ser notado que o risco para o CGIN foi três vezes maior nos indivíduos do gênero masculino. O índice de placa não foi considerado um fator de risco para o CG; porém, o grau de inflamação gengival, medido pelo índice de sangramento papilar, esteve fortemente associado com a ocorrência de CG. Embora reconhecendo que o mecanismo de desenvolvimento do CG seja multifatorial, os autores salientaram o papel da inflamação induzida pela placa na patogênese de CGID.

2.3 PATOGÊNESE DO CRESCIMENTO GENGIVAL

Um trabalho experimental conduzido por Ishida et al. (1995) pesquisou fatores que poderiam influenciar o CGIN em ratos. Foram avaliados fatores tais como idade, gênero, dose de nifedipina na dieta, nível de nifedipina no soro e duração da terapia. Os resultados sugeriram que o CG ocorreu de maneira dependente da dose de nifedipina e da sua concentração no soro. Além disso, ficou evidente que os indivíduos mais jovens e do gênero masculino foram mais susceptíveis à ocorrência de CG.

A patogênese do CGID foi exhaustivamente discutida por Seymour et al. (1996). Após uma extensa revisão da literatura, os autores sugeriram um modelo multifatorial para instalação do crescimento gengival que, em última instância, seria mediado por uma interação entre as drogas, os seus metabólitos e os fibroblastos gengivais. Dentre os diversos fatores que poderiam estar envolvidos na patogênese, os autores relacionaram três considerados essenciais: os fatores genéticos que conferem heterogeneidade aos fibroblastos gengivais, as variáveis farmacológicas das drogas (concentração no plasma, no fluido gengival, no biofilme dental e na saliva) e a inflamação gengival mediada pela placa dentária.

Em um estudo clínico de 97 pacientes sob terapia com nifedipina, Tavassoli et al. (1998) encontraram 29 % de pessoas com algum grau de CG. O tempo de uso da droga e o nível de inflamação gengival estavam diretamente associados à severidade do CG. A idade teve uma leve influência, no entanto, os indivíduos do gênero masculino foram, significativamente, mais afetados. Nesse estudo, o índice de placa dos pacientes não interferiu com a prevalência do crescimento gengival. Assim, os autores entenderam que a presença da inflamação gengival associada à placa não parece ser essencial para a instalação do CGIN, mas influencia na sua severidade. Discutindo patogênese, os autores expressaram que, embora acreditem que os fibroblastos sejam as células-chave para o desenvolvimento do CGID, vários outros fatores individuais também podem estar envolvidos. Assim, o nível de inflamação gengival, o gênero, o tempo de ingestão do medicamento e, até certo ponto, a idade podem participar do mecanismo de instalação do crescimento gengival.

Em outro estudo de revisão, Seymour et al. (2000) analisaram que vários fatores de risco podem estar associados ao CGID, dentre estes estão as variáveis demográficas como a idade e gênero, as variáveis ligadas às drogas como a dose e a duração da terapia, o uso concomitante de outras medicações indutoras de CG, a condição periodontal e os fatores genéticos. Os autores afirmaram que a heterogeneidade genética dos fibroblastos gengivais

persiste como um fator chave que explicaria as diferenças individuais na severidade do CG. Com relação à influência da placa, os dados disponíveis na literatura não são suficientes para esclarecer se o acúmulo de placa dentária é um fator contribuinte ou uma consequência do CG.

2.3.1 O Papel da Inflamação, dos Fibroblastos e da Matriz Extracelular

Os dados sobre a influência da placa dentária e a inflamação gengival na patogênese do CG são confusos e contraditórios. Heijl e Sundin (1988) investigaram o efeito da nitrendipina (uma diidropiridina semelhante à nifedipina) nos tecidos gengivais de cães *beagle*. Seis animais machos receberam altas doses de nitrendipina duas vezes por dia durante vinte semanas. Pôde ser constatado que 100% dos cães exibiram graus significativos de CG após dez semanas de uso da droga e que houve uma exacerbação cumulativa do CG após vinte semanas. Além disso, foi observado que o CG só se instalou em áreas com depósitos de placa e sinais de inflamação. As dimensões gengivais se mantiveram inalteradas nas áreas saudáveis.

Nishikawa et al. (1991) relataram um caso clínico de crescimento gengival progressivo. O paciente de 60 anos era portador de angina do peito e vinha recebendo 40 mg diárias de nifedipina nos últimos seis meses. Além do CG, o paciente também apresentava periodontite crônica com perda óssea alveolar moderada e difusa. Como o tratamento periodontal convencional (raspagem/alisamento radicular e controle de placa) teve pouco efeito sobre o CG, os autores procederam a uma cirurgia periodontal para a remoção do tecido hiperplásico. Após a cirurgia, o paciente obedeceu a um rigoroso esquema de acompanhamento regular para controle de placa. Após um período de controle de quatro anos, não foi observada recorrência do CG, apesar da manutenção da terapia com nifedipina.

O sucesso na resolução do CGIN apenas com controle de placa também foi relatado por Hancock e Swan (1992). Um paciente de 58 anos manifestou severo CG após o uso de 60 mg diárias de nifedipina por dezoito meses. Uma abordagem periodontal meticulosa direcionada para a remoção dos depósitos de placa e cálculo através de várias sessões de raspagem/alisamento radicular e reiteradas instruções para controle de placa resultaram em significativa redução do CG. Este caso demonstrou a possibilidade de tratamento do CG apenas com minucioso controle da inflamação gengival, sem a necessidade de substituição do medicamento.

A maioria dos casos estudados de CGID refere-se à ocorrência desta complicação em áreas dentadas. Isto contribui fortemente para uma associação com os efeitos da placa depositada na superfície dentária. No entanto, existem alguns relatos de CG em rebordos edentados em pacientes usuários de fenitoína feitos por Dreyer e Thomas (1978), Poppell e Collins (1987), Darling et al. (1988) e Bredfeldt (1992). Nesses trabalhos, apesar de não haver dentes associados ao aumento tecidual, pôde ser observada uma grande quantidade de depósitos (placa dental e cálculo) nos próprios tecidos hiperplásicos ou nas próteses totais. Os autores desses relatos acreditam que o raro desenvolvimento destes aumentos teciduais na mucosa mastigatória aconteça devido a uma interação entre os irritantes locais (trauma da prótese ou depósitos microbianos) e susceptibilidade individual de alguns pacientes.

Thomason et al. (1994) relataram uma severa hiperplasia em rebordo maxilar desdentado de um paciente que fazia uso de ciclosporina e nicardipina. Nesse trabalho, foi sugerido que a origem do CG estaria relacionada ao trauma de uma prótese total e infecção por *candida albicans*. Os autores enfatizaram a participação da inflamação no desenvolvimento da hiperplasia medicamentosa.

Esses relatos de casos sugerem fortemente que a presença da inflamação gengival associada à placa dentária seja um fator essencial para a instalação do crescimento gengival

induzido pela nifedipina e outras drogas; no entanto, respeitadas estudos experimentais não confirmam esses achados. Morizaki et al. (1993) usando ratos jovens como modelo experimental, provaram que a placa dentária não constitui um fator imprescindível para a instalação do CG. Os pesquisadores mostraram que animais isentos de placa e inflamação exibiram crescimento gengival considerável quando submetidos a uma dieta acrescida de nifedipina. No entanto, a placa dentária teve influência na severidade do CG, uma vez que, naqueles animais exibindo acúmulo de placa, o grau de CG foi significativamente mais expressivo.

Outro trabalho experimental com dezesseis ratos Sprague-Dawley, realizado por Fu et al. (2001), questionou a hipótese de que a presença de dentes e inflamação sejam fatores essenciais para o desenvolvimento do crescimento gengival induzido por ciclosporina (CGIC). Inicialmente, os dezesseis ratos foram submetidos a exodontias dos molares superiores direitos. Após duas semanas de cicatrização, os animais foram alocados aleatoriamente em dois grupos de oito indivíduos. O grupo teste recebeu uma dose diária de 15 mg/kg de ciclosporina por quatro semanas, enquanto o grupo controle recebeu apenas óleo mineral. Foi evidenciado crescimento mucoso no rebordo alveolar desdentado dos animais que estavam recebendo ciclosporina. A análise histométrica revelou que o rebordo dos animais do grupo teste apresentou áreas de tecido epitelial e conjuntivo significativamente maiores.

Utilizando uma metodologia similar, Chen et al. (2005) pesquisaram o papel de diversos fatores de crescimento na patogênese do CG em rebordos edentados de ratos Sprague-Dawley. O objetivo foi avaliar a influência dos fatores de crescimento na ausência da inflamação local. A altura e largura do rebordo alveolar foram medidas em oito animais que receberam doses diárias de 30mg/Kg de ciclosporina durante quatro semanas. Além disso, foi analisada a expressão do RNAm para TGF- β 1, PDGF- β , IGF-1 e VEGF e a marcação

imunistoquímica para estes mesmos fatores de crescimento. Os resultados mostraram que o rebordo edentado do grupo teste apresentou altura e largura significativamente maiores do que o grupo controle. Houve uma maior expressão do RNAm para oTGF- β 1 e VEGF no rebordo edentado dos ratos tratados com ciclosporina. Foi observada também uma maior imunomarcção para o TGF- β 1 e VEGF no tecido conjuntivo do rebordo dos ratos que receberam a droga imunossupressora.

Apesar desses achados, há evidente constatação clínica que o CG instala-se, quase invariavelmente, em áreas dentadas. Isto levou à hipótese que, de alguma forma, a nifedipina poderia se fixar na gengiva e estabelecer interações celulares diretas ou indiretas. Assim, Ellis et al. (1993) inquiriram se os níveis de nifedipina no fluido gengival influenciariam a incidência e severidade do CG. Usando filtros de papel, os pesquisadores colheram fluido gengival em bolsas maiores de quatro mm em nove pacientes usuários de nifedipina. Foi possível detectar a presença de nifedipina no fluido gengival de sete pacientes. O pico de concentração da droga no fluido gengival foi de 15 a 90 vezes maior do que os níveis encontrados no plasma. Os autores especularam que poderia haver um limiar de concentração de nifedipina no fluido para que ocorresse CG e que este limiar seria variável de paciente para paciente.

Num trabalho complementar, Ellis et al. (1995) investigaram o valor das variáveis periodontais na fixação da nifedipina no fluido gengival. Foram medidos os níveis de nifedipina em sítios saudáveis (profundidade de sondagem clínica, PSC < 4 mm) e doentes (PSC \geq 4 mm) de dez pacientes respondedores ao CG, ou seja, aqueles pacientes que exibiram alterações clínicas significativas no volume gengival após o uso de nifedipina. As variáveis periodontais avaliadas em cada paciente foram o índice de sangramento papilar, o índice de placa, a profundidade de bolsa e o índice de CG. Os resultados indicaram uma forte correlação entre o índice de sangramento papilar e o índice de placa com os depósitos de

nifedipina no fluido gengival. Os autores relataram que o seqüestro de nifedipina no fluido gengival está diretamente relacionado com o *status* inflamatório do tecido gengival, ou seja, quanto maior o acúmulo de placa e maior o nível de inflamação, maior será a presença de nifedipina no fluido gengival e, provavelmente, na placa dentária.

O infiltrado inflamatório de 43 pacientes cardiopatas foi estudado por Bullón et al. (2001). Utilizando a coloração pela hematoxilina-eosina, os autores quantificaram os plasmócitos, linfócitos, histiócitos e polimorfonucleares da lâmina própria de dezoito pacientes usuários de nifedipina, treze pacientes tratados com diltiazem e doze indivíduos portadores de cardiopatia isquêmica que recebiam outras medicações tais como anti-coagulantes e beta-bloqueadores. Doze pacientes saudáveis serviram como controle. A técnica de imunistoquímica utilizando anticorpos monoclonais foi empregada nas amostras destes mesmos pacientes para avaliar a imunexpressão das moléculas CD20 (linfócitos B) e CD45RO (linfócitos T). Os resultados indicaram que, apesar do índice de placa e inflamação gengival ser similar nos quatro grupos, o infiltrado inflamatório foi significativamente diferente entre eles. Os usuários de nifedipina exibiram um infiltrado com uma concentração de linfócitos até dez vezes maior do que os demais grupos. Os autores concluíram que a nifedipina afeta o infiltrado inflamatório aumentando o número de linfócitos, especialmente do tipo B, e que o número destas células cai significativamente após o tratamento periodontal.

Huang et al. (2003) pesquisaram o papel dos receptores de testosterona e das interleucinas na patogênese do CGIN. A análise imunistoquímica revelou que as células inflamatórias e os fibroblastos gengivais dos pacientes com CG exibiram expressão de receptores de testosterona significativamente superior aos pacientes saudáveis ou com periodontite. Quando analisada a imunexpressão de várias citocinas nas células do infiltrado inflamatório, foi constatado que o CG apresenta uma predominância de resposta imunológica celular do tipo Th1, caracterizada pela evidente marcação das citocinas IL-2 e interferon- γ .

Com esses dados, os autores asseguraram a ação dos linfócitos T no desenvolvimento do CGIN que, inclusive, pode estar inter-relacionada com a participação dos receptores de andrógeno.

O papel da testosterona e da inflamação gengival na patogênese do CGID já havia sido analisado por Dayan et al. (1998). Estudando cães machos, os autores encontraram uma correlação positiva entre o nível sérico de testosterona, o grau de inflamação gengival e índice de hiperplasia gengival. De maneira interessante, o estudo comprovou que cães castrados recebendo oxodipina durante quatro meses não desenvolveram CG e que esses mesmos animais, quando receberam injeções de testosterona, manifestaram hiperplasia gengival e aumento do índice gengival.

Um recente experimento com cultura de células conduzido por Sato et al. (2005) comparou as taxas de proliferação celular e síntese de DNA de fibroblastos gengivais em pacientes respondedores e não-respondedores sob o efeito da interleucina pró-inflamatória IL-1 α . Os resultados revelaram que os fibroblastos incubados com nifedipina e IL-1 α mostraram taxas de proliferação e síntese de DNA significativamente maiores e que este efeito era mais pronunciado nos pacientes respondedores. Os autores sugeriram que a interação entre nifedipina e a inflamação gengival pode exercer um importante papel na patogênese do crescimento gengival.

Na literatura, há suficiente suporte científico para assegurar que os fibroblastos gengivais sejam as células mais importantes na intrincada patogênese do CGID. Trabalhos como os de Fuji et al. (1994) demonstraram que os fibroblastos colhidos de pacientes respondedores ao CG exibiram taxas de proliferação celular, síntese de DNA e síntese de colágeno, superiores àqueles extraídos de pacientes não-respondedores.

Recentemente, os resultados de um estudo conduzido por Takeuchi (2004) indicaram que os fibroblastos de pacientes reativos ou respondedores se mostraram mais

susceptíveis a fatores de crescimento como o bFGF e, desta forma, exibiram maiores taxas de proliferação celular.

A asserção de que existam subpopulações de fibroblastos funcionalmente distintas no tecido gengival humano foi comprovada em um trabalho de Hassel e Stanek, em 1983. Os autores colheram tecido gengival normal em uma única papila e puderam encontrar seis tipos de fibroblastos diferentes quanto às taxas de crescimento e atividade sintética.

A hipótese da existência de subtipos diferentes de fibroblastos passou a ser usada para explicar as diferenças na resposta gengival após terapia por nifedipina, havendo pacientes respondedores e não respondedores ao CG. Mc Kevitt e Irwin, em 1995, encontraram significativas diferenças entre os fibroblastos gengivais de pacientes respondedores ao CG com relação às taxas de proliferação celular, síntese de proteínas e colágeno. Um interessante resultado do trabalho foi que a adição de nifedipina aos fibroblastos em cultura teve um surpreendente efeito inibitório. Esse achado sugeriu que a interação entre a nifedipina e os fibroblastos residentes pode não acontecer apenas de maneira direta, outros agentes como as citocinas inflamatórias poderiam mediar essa interação.

O efeito da nifedipina sobre fibroblastos gengivais humanos também foi estudado por Fujimori et al. (2001). Inicialmente, as células em cultura foram incubadas com concentrações crescentes de nifedipina e outros BCC. Após duas semanas, pôde ser constatada uma significativa redução no número de células mortas, sugerindo uma ação direta e dose-dependente da nifedipina sobre a sobrevivência dos fibroblastos. Em seguida, os fibroblastos foram cultivados junto com células inflamatórias tipo RAW264 (semelhantes a macrófagos), sendo que, a este meio, foram adicionadas concentrações crescentes de lipopolissacáride (LPS). Foi observado que a porcentagem de fibroblastos mortos aumentou proporcionalmente em resposta a concentrações crescentes de LPS, no entanto, a adição de nifedipina ao meio reduziu significativamente o número de células mortas. Os autores

sugeriram que a morte desses fibroblastos ocorreu devido à produção de óxido nítrico e peróxinitrito pelas células inflamatórias em resposta ao LPS e que a nifedipina, bloqueando a produção desses mediadores, inibiu a morte dos fibroblastos gengivais. Assim, o estudo mostrou que a nifedipina apresentou um efeito protetor contra a morte das células do tecido conjuntivo com ou sem a participação do estímulo inflamatório.

Outros estudos investigaram o papel do metabolismo da matriz extracelular gengival na patogênese do CG. Tipton et al. (1994) analisaram o comportamento de fibroblastos em cultura retirados de dois pacientes com CGIN e compararam com os fibroblastos gengivais de três pacientes saudáveis. Os achados desse experimento *in vitro* mostraram que os fibroblastos colhidos dos pacientes com CG não produziram grande quantidade de fibronectina, além disso, o nível de produção de glicosaminoglicanas foi menor em relação aos fibroblastos de gengiva normal. A taxa de proliferação das células também não mostrou diferenças significativas entre os dois grupos. No entanto, as linhagens de fibroblastos de pacientes com CG mostraram produção de grande quantidade de colágeno e baixa produção de colagenase quando comparados com os pacientes normais. O metabolismo alterado do colágeno foi considerado um importante fator na instalação do CGIN.

A participação de outras proteinases da matriz extracelular na patogênese do GC também tem sido estudada. Usando 34 ratos Fischer como modelo experimental, Ozaki et al. (1998) pesquisaram o papel da *medullasin* no CG. Essa enzima é uma proteinase secretada por neutrófilos em sítios inflamados e que é capaz de degradar componentes do tecido conjuntivo como o colágeno e as proteoglicanas. Nesse experimento, foi observada uma marcante expressão da enzima *medullasin* em neutrófilos e células semelhantes a macrófagos nos tecidos hiperplásicos em relação aos controles. Os autores declararam que, embora a *medullasin* tenha uma função conhecida na degradação do colágeno, essa proteinase pode ser produzida por macrófagos, participar de fenômenos imunoregulatórios e, desta forma,

estimular a função dos fibroblastos via citocinas e fatores de crescimento envolvidos no processo inflamatório. A *medullasin* poderia assim mediar uma interação entre a inflamação e os fibroblastos gengivais residentes.

Outra proteinase, a catepsina L, foi considerada por Nishimura et al. (2002) como uma molécula-chave na patogênese do CGID já que essa enzima produzida por fibroblastos é capaz de degradar vários componentes da matriz extracelular tais como colágeno e fibronectina. Os autores demonstraram que ratos com deficiência do gene catepsina L desenvolveram crescimento gengival. Nesse estudo, foi mostrado que a nifedipina, inibindo a atividade da catepsina L, causa diminuição da degradação da matriz extracelular. Por meio deste mecanismo, haveria acúmulo de proteínas da matriz extracelular. Tais estudos indicam que o CG pode ser mediado por um desequilíbrio entre a formação e degradação dos componentes da matriz extracelular.

2.3.2 Os Efeitos das Drogas no Epitélio Gengival

A despeito da vasta evidência da participação dos fibroblastos e da matriz extracelular na patogênese do CGID, as análises microscópicas dos tecidos gengivais hiperplásicos revelam, invariavelmente, um acentuado espessamento do tecido epitelial caracterizado pela proliferação de cristas epiteliais alongadas em direção ao tecido conjuntivo (BARAK; ENGELBERG e HISS, 1987). Assim, o efeito das drogas no tecido epitelial também tem sido estudado.

Pisanty et al. (1990), usando a técnica de microscopia elétrica de varredura, investigaram se a administração prolongada de ciclosporina poderia afetar o epitélio gengival. Foram analisados espécimes colhidos em biópsias de doze pacientes tratados com ciclosporina por mais de 20 meses. Os resultados revelaram a presença de focos de estruturas

cristalizadas em forma de agulhas incrustadas no interior do epitélio. Essas estruturas foram consideradas depósitos intraepiteliais de ciclosporina. Os autores sugeriram que as alterações epiteliais observadas no CGIC ocorriam devido ao depósito intraepitelial da droga.

Um acúmulo intraepitelial de ciclosporina também foi encontrado por O'Valle et al. (1994) estudando trinta casos de CG induzido por essa droga imunossupressora. Pela técnica da imunistoquímica, os autores puderam identificar expressão da ciclosporina em depósitos granulares difusamente distribuídos no citoplasma e sob a membrana celular das células epiteliais. Nesse trabalho, foi demonstrada uma correlação positiva entre os depósitos intraepiteliais e o grau de CG. No entanto, não foi citada qualquer correlação entre estes depósitos e as alterações epiteliais.

Com o objetivo de investigar a atividade proliferativa dos queratinócitos em CGID, Niimi et al. (1990) estudaram a enzima DNA polimerase α . Os autores compararam a expressão imunistoquímica desta proteína na camada basal de três grupos de pacientes: transplantados renais recebendo ciclosporina (n=8), pacientes com crescimento gengival induzido por fenitoína (n=5) e pacientes portadores de inflamação gengival não-específica (n=8). A marcação imunistoquímica dessa enzima foi sensivelmente menor nos grupos recebendo medicamentos, especialmente, a ciclosporina. Esse resultado indicou que a ciclosporina teria um surpreendente efeito antiproliferativo sobre os queratinócitos gengivais. De posse dos achados, os autores sugeriram que a hiperplasia epitelial observada nos crescimentos gengivais induzidos por essas drogas não se daria por aumento da proliferação dos queratinócitos, mas por um prolongamento da vida dessas células. Outro achado do trabalho foi que a placa dentária pode funcionar como um reservatório para depósito de ciclosporina.

A ação da ciclosporina sobre os epitélios e, especialmente, sobre os queratinócitos permanece um assunto conflitante. Um estudo *in vitro* publicado por Nickoloff et al. (1988), revelou um efeito supressivo da ciclosporina sobre a proliferação de queratinócitos humanos.

De modo similar, Esposito et al. (2000), trabalhando com cultura de vários tipos de células humanas incubadas com ciclosporina, encontraram diferentes comportamentos celulares. A ciclosporina teve um marcante efeito antiproliferativo e indutor de apoptose para as células endoteliais e epiteliais do rim. Esse efeito teve um caráter dose-dependente. O crescimento dos fibroblastos não foi afetado pela ciclosporina, no entanto, a capacidade de produção de proteinases por essas células foi sensivelmente diminuída. Os autores sugeriram que a ciclosporina é capaz de promover um acúmulo de matriz extracelular não por aumento da síntese, mas por uma inibição das proteinases.

A expressão imunistoquímica de marcadores de proliferação celular tem sido utilizada como instrumento para investigação do comportamento dos queratinócitos sob o efeito das drogas implicadas no CG. Em um trabalho pioneiro, Saito et al. (1999) estudaram a expressão das proteínas p53 e Ki-67 em hiperplasias gengivais induzidas por nifedipina e fenitoína. Foram analisados tecidos gengivais retirados de quatro pacientes portadores de CGIN, sete casos com CGIF e cinco pacientes saudáveis. Os resultados evidenciaram que em torno de 50% dos tecidos hiperplásicos exibiram marcação epitelial para o antígeno p 53, enquanto, os tecidos normais mostraram-se totalmente isentos de expressão desse antígeno. Além disso, o índice de marcação para o Ki-67 foi significativamente maior nos dois grupos de tecidos hiperplásicos em relação ao grupo controle. Essa marcação ocorreu na camada basal e suprabasal do epitélio e também nos fibroblastos. Um surpreendente achado foi a redução da expressão do Ki-67 nas típicas cristas epiteliais alongadas do CG. Os autores consideraram que a supressão do crescimento epitelial poderia ser traduzida como resposta das células a um dano no DNA, como ficou evidenciado pela expressão do p53. Assim, esses

resultados mostraram-se conflitantes em relação ao efeito da nifedipina e fenitoína na proliferação das células epiteliais.

A atividade mitótica dos queratinócitos nos CG induzidos por ciclosporina e nifedipina também foi estudada por Nurmenniemi et al., em 2001. Dependendo do tipo de droga e da combinação terapêutica, os pacientes (n=33) foram alocados em três grupos de onze indivíduos. Assim, havia um grupo composto por usuários de ciclosporina, outro formado por pacientes recebendo ciclosporina e também nifedipina e um último grupo de pacientes tratados somente com nifedipina. Dezenove pacientes saudáveis formaram o grupo controle. A expressão do antígeno Ki-67 foi avaliada em três diferentes epitélios da região gengival: o epitélio oral, o epitélio oral sulcular e o epitélio sulcular. A expressão do Ki-67 na vertente vestibular do epitélio gengival (epitélio oral) foi significativamente superior nos três grupos de pacientes sob medicação em relação ao grupo saudável. O epitélio oral sulcular mostrou uma atividade proliferativa similar nos quatro grupos. A imunoexpressão do Ki-67 no epitélio sulcular foi significativamente maior no grupo da ciclosporina, nos demais grupos, a proliferação do epitélio sulcular foi semelhante ao grupo controle. Assim, foi concluído que o aumento da espessura epitelial tipicamente observado nos crescimentos gengivais induzidos por nifedipina e ciclosporina estaria associado ao aumento da atividade mitótica. As diferenças encontradas entre as taxas de proliferação do epitélio oral, epitélio oral sulcular e o do epitélio sulcular sugerem que a inflamação local pode interferir nos efeitos das drogas sobre esses tecidos.

Crescimento gengival associado ao uso da droga anticonvulsivante vigabatrina também foi recentemente relatado na literatura. Mesa et al. (2004) pesquisaram a proliferação dos queratinócitos em quatro casos de crescimento gengival induzido por esse medicamento. Os resultados da análise imunoistoquímica mostraram uma significativa expressão do antígeno Ki-67 na camada basal e suprabasal do epitélio quando comparados com grupos saudáveis ou

portadores de doença periodontal. De maneira similar aos achados de Saito et al. (1999), uma expressiva marcação para a proteína p53 foi evidenciada no CG em relação aos outros grupos. Os pesquisadores concluíram que a vigabatrina induziu um aumento da atividade mitótica dos queratinócitos e que esta proliferação epitelial contribuiu para o crescimento gengival juntamente com a participação do tecido conjuntivo.

Alguns trabalhos questionaram se as alterações clássicas dos epitélios hiperplásicos tais como aumento da paraqueratinização, acantose e cristas alongadas ocorreriam em função da proliferação celular ou da inibição da apoptose. Assim, Saito et al. (2000) observaram a imunexpressão das proteínas c-Myc e bcl-2 no tecido epitelial de cinco pacientes com CGIN e sete pacientes com CGIF. A c-Myc é uma oncoproteína observada em vários tipos de câncer e associada à atividade proliferativa das células tumorais, enquanto a bcl-2 é uma proteína fortemente relacionada com a inibição da apoptose. Os resultados mostraram uma sinérgica hiperexpressão das duas proteínas nos tecidos hiperplásicos. Estes achados podem indicar que existe uma ação coordenada de proliferação celular e inibição da apoptose no tecido epitelial dos crescimentos gengivais induzidos por drogas.

Para melhor entender o papel da apoptose na hiperplasia epitelial do CGIN, Shimizu et al. (2002) usaram ratos Fischer como modelo experimental. Vinte animais foram alimentados com dieta rica em nifedipina por trinta dias. Os ratos foram sacrificados aos oito, quinze e trinta dias de experimento. Foram analisadas amostras de gengiva vestibular dos molares inferiores e também da região mediana do palato duro. Os resultados revelaram que o acentuado espessamento epitelial observado nas áreas dentadas ocorreu devido a um efeito inibitório da apoptose e prolongamento da vida dos queratinócitos e não por aumento da proliferação celular. Estas alterações não foram observadas na mucosa palatina. A partir desses achados, os autores concluíram que a nifedipina, através do bloqueio dos canais de

cálcio, poderia ter um efeito direto sobre os queratinócitos, inibindo o processo de apoptose e prolongando a vida dessas células.

Handajani et al. (2003) avaliaram o efeito da nifedipina sobre a expressão da proteína bcl-2 na gengiva de ratos Sprague-Dawley. Por meio da análise imunoistoquímica, os autores observaram que doses crescentes de nifedipina ocasionaram uma correspondente expressão da proteína bcl-2 na camada suprabasal do epitélio. Os autores concluíram que a terapia com nifedipina foi capaz de causar uma inibição da apoptose dos queratinócitos de ratos e que a intensidade dessa alteração esteve relacionada com a dose e duração da terapia.

2.3.3 A Interação Epitélio-Tecido Conjuntivo

A participação de fatores oriundos do tecido conjuntivo no aumento da proliferação dos queratinócitos foi investigada em alguns estudos. Das e Olsen (2000) avaliaram a produção do *Keratinocyte Growth factor* (KGF), um fator mitogênico produzido pelos fibroblastos e direcionado especificamente para os queratinócitos. Os fibroblastos de gengiva humana normal foram cultivados *in vitro* e incubados com diferentes concentrações de nifedipina. Os resultados mostraram que os fibroblastos produziram quantidades crescentes de KGF em resposta a concentrações cada vez maiores de nifedipina. Desse modo, o trabalho sugeriu que o espessamento epitelial observado no CGIN pode ser mediado pela hipersecreção do fator mitogênico KGF, configurando assim uma interação do epitélio com o tecido conjuntivo.

Das, Newman e Olsen (2002) empreenderam uma investigação sobre o receptor para KGF no epitélio gengival, comparando a expressão imunoistoquímica desse receptor entre gengiva saudável e crescimento gengival induzido por ciclosporina. Os achados desse experimento *in vitro* revelaram que houve uma expressão significativamente maior do

receptor para KGF no CGIC em relação à gengiva normal. Os autores confirmaram o achado anterior e sugeriram que uma interação entre epitélio e tecido conjuntivo pode induzir um aumento da capacidade mitótica dos queratinócitos e exercer um importante papel na patogênese do CG.

Estudos de recombinação cruzada conduzidos por Mackenzie e Hill (1984) mostraram que o tecido conjuntivo continua a influenciar e modificar o padrão de arquitetura, crescimento e diferenciação celular do epitélio por toda a vida adulta.

Assim, Hyland et al. (2004) examinaram esta interação no CGIC. Os pesquisadores mensuraram a produção das proteínas *Keratinocyte Growth factor* (KGF) e *Scatter Factor* (SF) que são fatores de crescimento produzidos pelos fibroblastos e direcionados aos queratinócitos. Foram cultivados fibroblastos colhidos de três pacientes com gengiva normal e células colhidas de três casos de CG. Essas células foram incubadas com várias concentrações de ciclosporina. Os resultados indicaram que, para os fibroblastos do CG, a adição de 500ng/ml de ciclosporina teve um efeito inibitório na produção de KGF e SF, enquanto a concentração de 2000 ng/ml resultou num efeito estimulatório. Em contato com os fibroblastos de gengiva normal, a ciclosporina aumentou significativamente a produção de KGF e SF. Os autores defenderam a hipótese de que a ciclosporina seria capaz de alterar a produção de fatores de crescimento para os queratinócitos e que essa ação seria dependente da dose e da resposta celular de diferentes subtipos de fibroblastos.

3. PROPOSIÇÃO

Considerando que a nifedipina é uma medicação anti-hipertensiva largamente utilizada no Brasil e que o uso crônico dessa droga está associado ao aparecimento de crescimento gengival, empreendemos um estudo que, por meio da técnica histológica convencional (H.E.) e imunoistoquímica, analisou o epitélio gengival de pacientes sob terapia crônica com nifedipina. O objetivo deste estudo foi detectar possíveis efeitos da nifedipina sobre o epitélio gengival em nível subclínico e correlacionar esses achados com o índice de proliferação dos queratinócitos que foi medido através das proteínas Ki-67 e Ciclina B1.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

A amostra para este estudo foi representada por pacientes usuários de nifedipina selecionados em várias unidades de Saúde pertencentes à Liga da Hipertensão do Município de Goiânia. Foram selecionados vinte pacientes hipertensos controlados e usuários de nifedipina que constituíram o grupo I (grupo teste). O grupo II (grupo controle) foi composto por nove pacientes que foram atendidos no Serviço de Periodontia da Polícia Militar do Estado do Tocantins e nos quais havia indicação para ressecção de tecido gengival saudável durante cirurgia de aumento de coroa clínica. Assim, um fragmento de gengiva vestibular clinicamente saudável, que seria descartado, foi encaminhado para as análises laboratoriais. O protocolo de atendimento dos pacientes do grupo teste foi aprovado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás – COEP (vide Anexo). Os seguintes critérios de seleção foram empregados para o recrutamento dos pacientes:

Grupo I

- Estar sob controle médico;
- Fazer uso diário e regular de nifedipina por um período mínimo de seis meses;
- Não ser fumante;
- Não ser edentado total;
- Exibir CG clinicamente significativa ou apresentar indicação para exodontia;
- Aceitar participar da pesquisa.

Grupo II

- Não fazer uso de nifedipina, ciclosporina, fenitoína ou qualquer outra droga de uso contínuo;
- Não apresentar doença periodontal;
- Não ser fumante;
- Não usar aparelho ortodôntico fixo.

Os pacientes do grupo teste foram esclarecidos, detalhadamente, sobre os métodos a serem utilizados e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice I) autorizando os procedimentos.

4.2 EXAME CLÍNICO

Inicialmente, os pacientes usuários de nifedipina foram entrevistados e responderam a um questionário dirigido (Apêndice II) contendo os seguintes dados:

- Identificação do paciente: nome, gênero, idade e outras informações pessoais;
- História médica e odontológica: investigação de doenças e condições sistêmicas, tratamentos odontológicos anteriores e eventuais complicações;
- Protocolo medicamentoso utilizado no momento, incluindo a dose diária de nifedipina e o tempo de uso da medicação.

Em seguida, os pacientes foram submetidos a uma avaliação clínica completa que incluía mensuração da pressão arterial e exame loco - regional da face, pescoço e articulações têmporo-mandibulares. As mucosas de revestimento, a língua, o tecido gengival e os dentes foram, cuidadosamente, inspecionados durante o exame da cavidade bucal.

4.3 ABORDAGEM PERIODONTAL E BIÓPSIA GENGIVAL

Após a avaliação clínica, os pacientes selecionados receberam atenção periodontal básica. Inicialmente, foram instruídos sobre técnicas de higiene bucal e, em seguida, passaram por uma ou duas sessões semanais para remoção de cálculo sub e supragengival por meio de instrumentação manual ou ultrassônica complementada com profilaxia com taça de borracha.

Assim, o sítio indicado para a remoção do tecido foi selecionado de acordo com a necessidade de tratamento do paciente em função das implicações éticas, já que a maioria dos pacientes (exceto um) não exibia crescimento gengival que justificasse remoção cirúrgica. Esse paciente com CG mais evidente apresentava severa inflamação gengival associada a um grande acúmulo de placa e cálculo. Foi realizada uma rigorosa instrumentação periodontal com curetas de Gracey com o objetivo de controlar a inflamação gengival. Após esse procedimento, foi feita uma biópsia de mucosa ceratinizada a três mm da margem gengival do canino superior esquerdo.

Para os demais pacientes com dimensões gengivais normais ou levemente aumentadas, o fragmento de gengiva foi removido em uma área isenta de inflamação na qual estava indicada a exodontia de dentes remanescentes ou restos radiculares. Na maioria dos casos, os dentes removidos estavam isentos de doença periodontal. Quando o dente indicado para a exodontia apresentava sinais de periodontite, foi realizado um vigoroso debridamento manual duas semanas antes da cirurgia.

Deste modo, após a realização da exodontia, fragmentos de quatro a cinco mm de mucosa ceratinizada vestibular ou proximal localizados, aproximadamente, a três mm da margem gengival foram removidos para as análises de laboratório. Após a coleta do material, os pacientes que apresentavam necessidade de seguimento no tratamento odontológico, foram encaminhados para as diversas clínicas da FO/UFG.

Todas as amostras obtidas foram acondicionadas em frascos de formol a 10% tamponado e enviadas para o laboratório de Patologia Bucal da FO/UFG, onde foram submetidas à análise histológica convencional e imunoistoquímica.

4.4 TÉCNICAS EMPREGADAS

4.4.1 Técnica Histológica Convencional (Hematoxilina e Eosina)

O material selecionado foi processado, incluído em parafina e seccionado em micrótomo (Leica RM2165). De cada bloco de parafina, foram obtidos cortes consecutivos de 5µm que foram colocados sobre lâminas histológicas e corados pelos métodos da Hematoxilina e Eosina (H-E). As lâminas coradas pela Técnica Histológica Convencional foram submetidas à análise microscópica subjetiva por um patologista experiente. Na análise, foram anotados aspectos do tecido epitelial como o tipo de queratinização, a presença de acantose e o tamanho das cristas epiteliais. No tecido conjuntivo, foram observados outros dados como o grau de colagenização e a intensidade do infiltrado inflamatório. Deste modo, realizou-se um estudo descritivo e comparativo das características microscópicas do tecido epitelial e conjuntivo nos dois grupos de pacientes.

4.4.2 Técnica Imunoistoquímica

Ao obter os cortes seriados, descritos anteriormente, alguns foram seccionados em 3µm e estendidos sobre lâminas de vidro silanizadas (DAKO, S3003, Glostrup-Denmark) e submetidos à técnica imunoistoquímica por meio de Imunoperoxidase (streptavidina-biotina-peroxidase) para a identificação das moléculas Ki-67 e Ciclina B1. Inicialmente, os cortes sobre as lâminas foram desparafinizados e hidratados por meio de: 1- xilol, 3 vezes, 5 minutos cada vez; 2- álcool absoluto, 3 vezes, 2 minutos cada vez; 3- álcool etílico 95% 1 vez, 2

minutos; 4- solução salina tamponada de Tris (TBS), Ph=7.2 por 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão citrato, pH=6.0 (SIGMA, P4809, Saint Louis – USA) aquecido à temperatura de 95°C, com auxílio de Banho Maria Digital (DeLeo), para exposição dos seguintes antígenos: Ki-67 e Ciclina B1, por 20 minutos. Após lavagens com TBS, as lâminas foram mergulhadas em peróxido de hidrogênio (Merck) a 3% em solução salina tamponada (PBS), por 40 minutos, para o bloqueio da peroxidase endógena.

Após serem lavadas com TBS, as lâminas foram incubadas com soro de leite a 3% em água destilada (leite desnatado Molico®) por 20 minutos, a fim de se obter o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas. Em seguida, as lâminas foram secas e incubadas com os anticorpos primários, por 18 horas e mantidas na temperatura de 4°C. Os anticorpos que foram utilizados e suas respectivas diluições estão especificados no Quadro 1. Todas as diluições foram realizadas utilizando PBS associado a soro-albumina bovina (PBS-BSA) a 1%. Após o período de 18 horas, realizaram-se as lavagens consecutivas e posteriormente a incubação com os anticorpos biotinizados anti-IgG de coelho/camundongo/cabra por 30 minutos, à temperatura de 22 a 25 °C, seguido pela incubação da streptoavidina marcada com peroxidase por 30 minutos, à temperatura ambiente (kit DAKO LSAB+, Peroxidase- Universal- K0690).

Posteriormente às lavagens consecutivas com TBS, procedeu-se à revelação da reação utilizando o 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) em uma solução cromogênica (DAKO, K3468), por 2 a 3 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina de Mayer, por 3 minutos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água destilada por duas vezes, as lâminas foram desidratadas com álcoois (70, 95 e 100 GL), passadas em xilol (3 vezes) e montadas com solução de resina não aquosa (Entellan-Mikroskopie-Merck).

Os controles negativos das reações foram realizados através da substituição dos anticorpos primários por PBS-BSA 1%, bem como por soro normal de camundongo (DAKO, X0910-1, Glostrup-Denmark), descartando assim possíveis falsos positivos.

Quadro I – Anticorpos primários e suas respectivas diluições, clones, códigos e fabricantes utilizados nas amostras.

Anticorpo	Diluição	Clone	Código	Fabricante
Monoclonal de camundongo anti-Ki 67 humano	1: 100	MM 1	NCL-Ki67 MM 1	Novocastra (Benton Lane, UK)
Monoclonal de camundongo anti-Ciclina B1 humana	1: 40	7A9	NCL – Ciclina B1	Novocastra (Benton Lane, UK)

4.5 ANÁLISES QUANTITATIVAS

4.5.1 Medida do Comprimento das Cristas Epiteliais

Utilizando lâminas coradas pela Técnica Histológica Convencional, foi feita uma estimativa pormenorizada sobre o comprimento das cristas epiteliais. Para a mensuração deste dado, foi utilizado o lado do retículo de integração (CARL ZEISS-474068000000-Netzmikrometer 12.5x), no aumento de 10x, sendo que, nessa ampliação, o lado do retículo está dividido em dez espaços de 0,125 mm, perfazendo um total de 1,25 mm. Todas as cristas epiteliais contidas em cada corte microscópico foram medidas e enquadradas em duas categorias: cristas curtas (até 0,75 mm) e longas (maiores de 0,75 mm). Todas as medidas foram feitas por um mesmo examinador e os valores foram expressos em porcentagem.

4.5.2 Contagem de Células por mm²

O número de células Ki-67 positivas (Ki-67⁺) e Ciclina B1 positivas (Ciclina B1⁺) foi quantificado por meio de análise morfométrica, utilizando microscópio óptico contendo um retículo de integração em rede quadrada (CARL ZEISS-474068000000- Netzmikrometer 12.5x). Para esta contagem, utilizou-se a objetiva de 40x; neste aumento, o lado (L) do retículo de integração, obtido por meio de uma lâmina milimetrada, corresponde a 0,31mm. Determinou-se a área do retículo (A), pela expressão matemática: $A = (L)^2$, resultando em uma área de 0,0961mm².

Em cada amostra selecionada, as células epiteliais das camadas basais e suprabasais foram quantificadas em dez campos microscópicos consecutivos (área total de 0,961mm²). Registrou-se o número total de células epiteliais marcadas com os dois anticorpos na área total percorrida e dividiu-se este número por 0,961mm², obtendo-se a média de células epiteliais imunomarcadas por milímetro quadrado (mm²).

Todas as contagens foram realizadas por um único examinador previamente calibrado e orientado.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizando o programa SPSS, versão 10.0.1, 1999 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA), foram analisadas duas variáveis: a densidade de marcação das células epiteliais e o comprimento das cristas epiteliais. A densidade de marcação foi expressa em número de células marcadas por mm² e a altura das cristas epiteliais foi analisada em porcentagem de cristas maiores ou menores que 0,75 mm.

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos ao teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos não pareados (grupos I e II). Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Os resultados serão demonstrados de forma descritiva e também por meio de tabelas. A caracterização geral da amostra está resumida na tabela abaixo (Tabela 1), na qual estão descritas as médias e desvios padrão das variáveis demográficas (número de pacientes, idade e distribuição por gênero) e farmacológicas (dose de nifedipina e tempo de uso da droga). O grupo teste foi composto por vinte pacientes usuários de nifedipina. Destes, apenas um paciente (5%) apresentou CG clinicamente evidente. Os demais apresentaram dimensões gengivais normais ou levemente alteradas. Em alguns desses pacientes, pôde ser notado um ligeiro espessamento da gengiva, no qual a margem gengival perdeu a sua característica normal de borda aguda e assumiu um aspecto mais rombo, porém, estas pequenas alterações não exigiram intervenção cirúrgica.

Tabela 1- Médias, desvios padrão, valores mínimos e máximos das variáveis demográficas e farmacológicas nos dois grupos.

Variáveis	Grupo I (Usuários de nifedipina)	Grupo II (Controle)
Número de pacientes	20	09
Idade (anos)	58,65 ± 11,40 (37-74)	40 ± 10,15(24-51)
Distribuição por gênero (M: F)	9:11	5:4
Dose de nifedipina (mg/dia)	33,50 ± 10,40 (10-40)	-
Tempo de uso (meses)	50,75±35,98 (10-144)	-

5.1 ANÁLISE SUBJETIVA

Grupo I - Usuários de nifedipina

Os cortes microscópicos revelaram epitélio gengival do tipo pavimentoso estratificado, ora paraqueratinizado ora ortoqueratinizado, exibindo também áreas de acantose e cristas epiteliais de comprimentos variáveis. O tecido conjuntivo subjacente apresentava-se, na maioria dos casos, sem infiltrado inflamatório, porém alguns poucos casos mostravam um infiltrado leve ou moderado. Além disso, pôde ser observado um número variável de fibroblastos, grande quantidade de fibras colágenas e vasos sanguíneos (Página 61, figuras 2,4).

Grupo II – Controle

Os cortes microscópicos evidenciaram tecido gengival revestido por epitélio pavimentoso estratificado exibindo cristas epiteliais curtas e áreas de acantose. O tecido conjuntivo mostrava-se com infiltrado inflamatório leve ou ausente, colagenização densa e número variável de fibroblastos e vasos sanguíneos (Página 61, figuras 3,5).

5.2 ANÁLISES QUANTITATIVAS

5.2.1 Comprimento das Cristas Epiteliais

Todas as cristas epiteliais contidas nos cortes microscópicos foram medidas e os valores percentuais foram enquadrados em duas categorias: cristas curtas (até 0,75 mm) e cristas longas (acima de 0,75mm). Pôde ser observado que houve diferenças significantes na porcentagem de cristas longas quando foram comparados os dois grupos (Tabela 2). Assim, considerando este aspecto microscópico, pôde ser evidenciado que o grupo de pacientes

usuários de nifedipina exibiu uma porcentagem maior de cristas epiteliais longas quando comparado com o grupo controle.

Tabela 2 - Porcentagem de cristas epiteliais alongadas nos dois grupos

Variável	Grupo I (Usuários de nifedipina)	Grupo II (Controle)	Teste Mann-Whitney
% de cristas longas (Posto-médio)	17,02 *	10,50 *	p< 0,02

* Valor estatisticamente significante.

5.2.2 Contagem de Células por mm²

Os dados quantitativos de imunomarcção das células epiteliais basais e suprabasais revelaram que houve uma expressão maior do anticorpo Ki-67 do que da Ciclina B1 nos dois grupos. No entanto, não foi encontrada diferença significativa na marcação quando foram comparados entre si o grupo de usuários de nifedipina e o grupo controle, tanto para o Ki-67 como para a Ciclina B1 (Quadro 2). As figuras 6, 7, 8 e 9 (Página 62) ilustram a marcação imunoistoquímica para os anticorpos Ki-67 e Ciclina B1 nos dois grupos.

Quadro 2 - Médias, desvios padrão e postos médios do número de células epiteliais Ki-67⁺ e ciclina B1⁺ por mm².

Marcador	Grupo I		Grupo II	
	Média (DP)	Posto-médio	Média (DP)	Posto-médio
Ki-67	378,39 ± 222,28	14,75	400,96 ± 260,86	15,56
Ciclina B1	85,79 ± 45,12	15,68	75,57 ± 45,83	13,50

Mann-Whitney, p>0,05. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e II considerando o número de células epiteliais Ki-67⁺ e ciclina B1⁺ por mm².

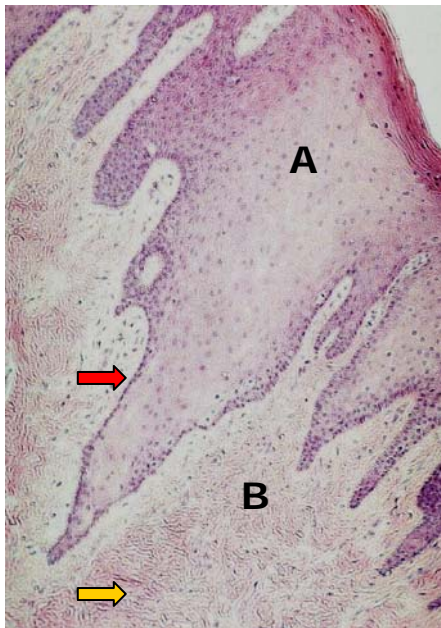


Figura 2 – Amostra de tecido gengival de paciente usuário de nifedipina.

A – Epitélio paraqueratinizado exibindo crista epitelial longa (seta vermelha)

B – Tecido conjuntivo com intensa colagenização (seta amarela) e ausência de infiltrado inflamatório (H.E., Aumento Original de 25x).

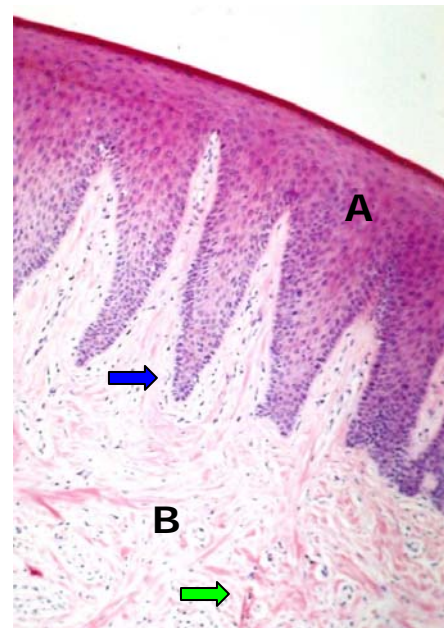


Figura 3 - Amostra de tecido gengival de paciente controle.

A - Epitélio paraqueratinizado com cristas curtas (seta azul). B - Tecido conjuntivo exibindo grande número de fibroblastos, fibras colágenas (seta verde) e ausência de infiltrado inflamatório (H.E., Aumento Original de 25x).

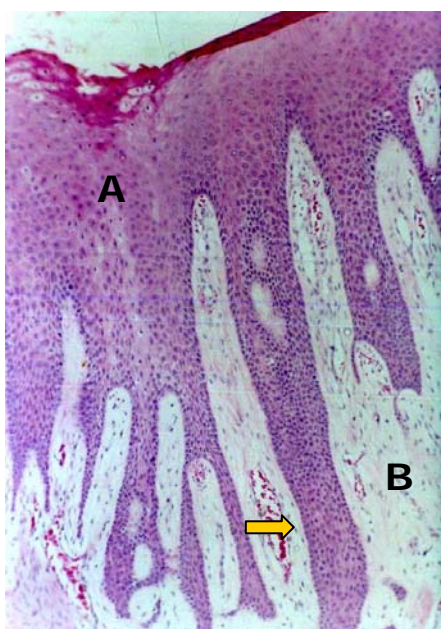


Figura 4 - Amostra de tecido gengival de paciente usuário de nifedipina.

A - Epitélio paraqueratinizado com cristas longas (seta amarela). B - Tecido conjuntivo exibindo grande número de fibroblastos, fibras colágenas e ausência de infiltrado inflamatório (H.E., Aumento Original de 25x).

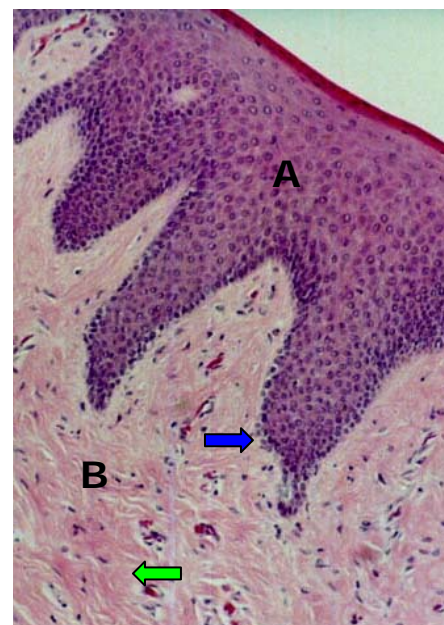


Figura 5 - Amostra de tecido gengival de paciente controle.

A - Epitélio paraqueratinizado com cristas curtas (seta azul). B - Tecido conjuntivo exibindo grande número de fibroblastos, fibras colágenas (seta verde) e ausência de infiltrado inflamatório (H.E., Aumento Original de 25x).

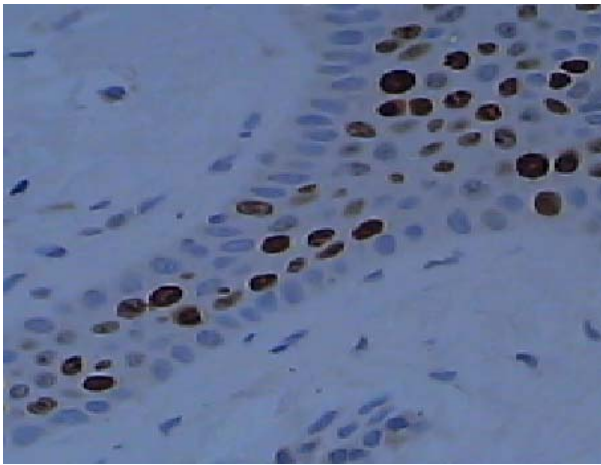


Figura 6 – Amostra de tecido gengival de paciente teste mostrando muitas células epiteliais Ki-67 positivas (em marrom), com marcação nuclear, presentes principalmente na camada basal. (Imunoistoquímica, Aumento Original de 100x).

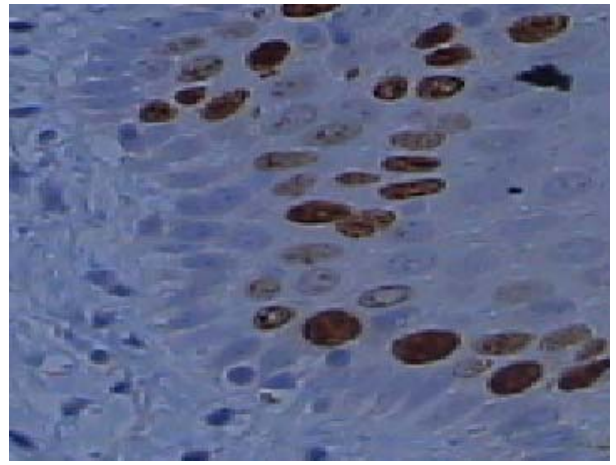


Figura 7 – Amostra de tecido gengival de paciente controle mostrando muitas células epiteliais Ki-67 positivas (em marrom), com marcação nuclear, presentes principalmente na camada basal. (Imunoistoquímica, Aumento Original de 100x).

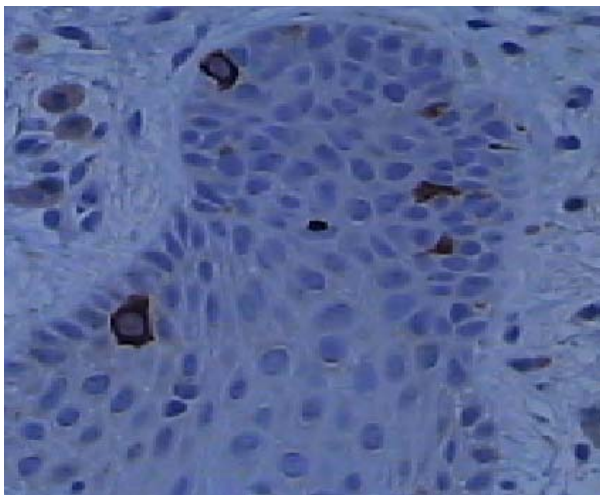


Figura 8 – Amostra de tecido gengival de paciente teste mostrando poucas células epiteliais Ciclina B1 positivas (em marrom), com marcação citoplasmática, presentes principalmente na camada basal. (Imunoistoquímica, Aumento Original de 100x).

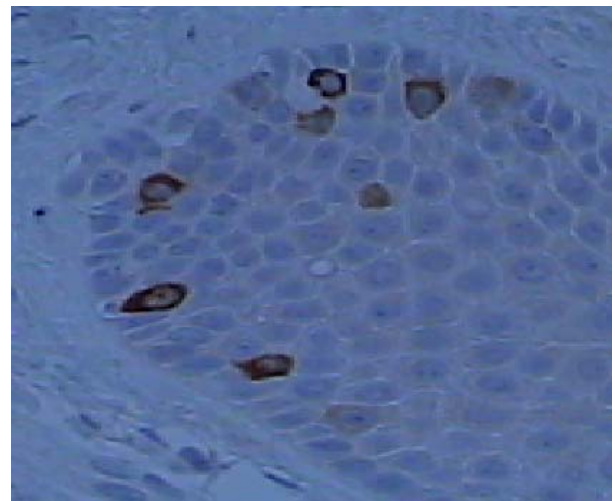


Figura 9 – Amostra de tecido gengival de paciente controle mostrando poucas células epiteliais Ciclina B1 positivas (em marrom), com marcação citoplasmática, presentes principalmente na camada basal. (Imunoistoquímica, Aumento Original de 100x).

6. DISCUSSÃO

Os dados sobre a prevalência do crescimento gengival entre os usuários de nifedipina são bastante conflitantes, com taxas variando de 6,3% (ELLIS et al., 1999) até 83% (FATTORE et al., 1991). Esta enorme variabilidade está provavelmente associada a questões metodológicas como o local de seleção dos pacientes, o número de indivíduos pesquisados e os critérios para avaliação do CG. A taxa de 83% de pacientes exibindo CG foi a maior prevalência relatada na literatura; porém, avaliou um reduzido número de apenas 23 pacientes. Do mesmo modo, outros estudos sobre prevalência do CGIN utilizaram amostras pequenas e, além disto, os pacientes foram recrutados em serviços hospitalares o que pode influenciar na representatividade dos dados (BARAK et al., 1987; BARCLAY et al., 1992).

Tavassoli et al. (1998) pesquisaram uma amostra considerável de 97 pacientes e encontraram uma prevalência de 29% de CGIN. No entanto, o mais importante estudo epidemiológico sobre este tema foi conduzido por Ellis et al. (1999) e abrangeu uma grande área populacional. Os pesquisadores avaliaram 442 pacientes usuários de nifedipina e encontraram apenas 6,3% com CG clinicamente importante. A baixa prevalência de CG encontrada por Ellis et al. (1999) está em conformidade com os nossos achados, muito embora, tenhamos trabalhado com uma amostra bastante reduzida. Assim, dos nossos vinte pacientes, apenas um (5%) exibiu CG clinicamente significativa. As evidências mais fortes sugerem, então, que a ocorrência de CG em usuários de nifedipina seja um evento raro (ELLIS et al., 1999).

Um dos fatores que podem influenciar na patogênese do CG e que, pelo menos em parte, explicariam esta baixa prevalência é a idade. Estudos clínicos com outras drogas indutoras de crescimento gengival sugerem que as crianças e adolescentes são mais

susceptíveis ao CG do que os adultos (ESTERBERG; WHITE, 1945; DALEY; WYSOCKY e DAY, 1986; HEFTI et al., 1994). Embora estes achados sejam limitados à fenitoína e ciclosporina, outros trabalhos clínicos e experimentais revelaram que os indivíduos mais jovens foram mais afetados pelo crescimento gengival induzido pela nifedipina (ISHIDA et al., 1995; NAKOU et al., 1998)). Assim, embora a patogênese do CG seja complexa e multifatorial e a influência do fator idade ainda não esteja totalmente esclarecida, é possível que a idade mais avançada dos usuários de nifedipina diminua a susceptibilidade destes pacientes ao CG.

Mesmo considerando o CG como um efeito colateral raro, esse tema continua a ser bastante estudado em todo mundo. O principal objetivo das pesquisas nesse campo é buscar um entendimento sobre os intrincados mecanismos envolvidos na patogênese do CG. Várias conseqüências indesejáveis podem advir com a instalação do CG. Além das evidentes alterações estéticas, pode haver dificuldades de mastigação e fonação e o início ou agravamento da doença periodontal destrutiva (WESTBROOK et al., 1997; SEYMOUR; THOMASON e ELLIS, 1996; NAKOU et al., 1998; LEUNG et al., 2003). Em nosso estudo, pudemos constatar que o próprio manejo dos usuários de nifedipina portadores de crescimento gengival pode tornar-se mais complexo em função da idade dos pacientes e das condições sistêmicas associadas, já que além da hipertensão, muitos pacientes apresentavam *Diabetes Mellitus* e outras enfermidades crônicas debilitantes. Apesar da coexistência destas doenças sistêmicas, conseguimos realizar os procedimentos cirúrgicos (exodontias e biópsias gengivais) sem quaisquer intercorrências.

Na literatura científica, há um consenso geral de que o CGID tem uma patogênese multifatorial. Dentre as várias hipóteses levantadas, estão a predisposição genética e as alterações da homeostase do tecido gengival, especialmente na função dos fibroblastos e na interação das drogas com os fatores de crescimento (NURMENNIEMI, 2006). Além disso,

muitos estudos clínicos têm investigado a associação entre o *status* de higiene bucal e prevalência e severidade do CG. Esses estudos sugerem que a inflamação gengival induzida pela placa pode ser um importante fator no desenvolvimento e expressão do CGID. Por outro lado, outras variáveis como dose e duração da terapia parecem ter pouca influência na patogênese do CG (SEYMOUR et al., 1996; NURMENNIEMI, 2006). Assim, as hipóteses mais consistentes sobre patogênese do CG apontam para uma inequívoca participação de fatores oriundos do tecido conjuntivo. Numerosos estudos demonstraram o papel do metabolismo dos fibroblastos e da inflamação gengival na instalação do CGID (FUJI et al., 1994; TIPTON et al., 1994; MC KEVITT; IRWIN, 1995; HUANG et al., 2003; SATO et al., 2005). É importante ressaltar que, em nosso estudo, a inflamação estava praticamente ausente em todos os casos, já que os pacientes receberam tratamento periodontal básico com o objetivo de reduzir ao máximo o efeito da inflamação gengival associada à placa e cálculo.

Apesar disso, as evidentes alterações epiteliais invariavelmente observadas nos casos de CG, sempre sugeriram alguma participação proveniente do epitélio. A análise microscópica dos primeiros casos relatados já revelou uma característica marcante do CG que é o espessamento epitelial. Ramon et al. (1984) mostraram que o tecido epitelial dos pacientes com CG era de 5 a 10 vezes mais espesso que o epitélio dos pacientes saudáveis. Dentre os aspectos histopatológicos encontrados por Barak et al. (1987), o achado mais impressionante foi o prolongamento das cristas epiteliais em direção à lâmina própria. As cristas epiteliais de 34 pacientes foram medidas e classificadas em diferentes graus de hiperplasia. Nesse estudo, Barak et al. observaram que mesmo pacientes sem CG clinicamente evidente exibiram cristas epiteliais mais longas em relação ao grupo controle.

Por meio da análise microscópica convencional, o presente estudo confirmou os achados de Barak et al. (1987) e constatou que, embora não houvesse CG expressivo, o tecido gengival dos pacientes usuários de nifedipina exibiu marcantes alterações epiteliais em

relação ao grupo controle. A porcentagem de cristas epiteliais longas (maiores que 0,75 mm) foi significativamente maior nos pacientes do grupo teste do que nos controles saudáveis (Tabela 2). Nossos resultados indicam que o uso crônico de nifedipina pode acarretar alterações epiteliais, mesmo na ausência de CG clinicamente evidente.

As técnicas de imunistoquímica começaram a ser desenvolvidas a partir da década de quarenta. No entanto, nos últimos dez anos, os grandes avanços na especificidade dos anticorpos e nos sistemas de marcação projetaram a imunistoquímica como um recurso extraordinário para realização de diagnósticos a nível celular (MILLER, 1995). Assim, estas técnicas têm sido amplamente utilizadas em vários campos da Patologia Bucal, inclusive para investigar a proliferação epitelial no CG. Vários estudos utilizaram a expressão do antígeno Ki-67 para avaliar a atividade mitótica dos queratinócitos em crescimentos gengivais induzidos por nifedipina, fenitoína, ciclosporina e vigabatrina (SAITO et al., 1999; NURMENNIEMI et al., 2001; MESA et al., 2004; NURMENNIEMI et al., 2006). Em todos esses trabalhos, a atividade mitótica dos queratinócitos nos CGID foi significativamente maior do que nos tecidos gengivais saudáveis.

Em nosso estudo, utilizamos o Ki-67 e também a Ciclina B1 como marcadores para pesquisar a atividade proliferativa dos queratinócitos de vinte pacientes sob terapia crônica com nifedipina. Dentre esses pacientes, apenas um apresentava CG moderado, no entanto, o aumento das dimensões gengivais desse paciente não pode ser creditado apenas ao efeito da nifedipina. Como havia pesados depósitos de placa e cálculo, esse crescimento tecidual pode ter sido o resultado da conjunção do efeito não-inflamatório mediado pela droga com o efeito inflamatório mediado pelos fatores locais, o que caracteriza o aumento gengival combinado (CARRANZA Jr., 1983). Diferentemente dos estudos anteriores nos quais os pacientes exibiam graus moderados ou severos de CG, a grande maioria dos nossos pacientes apresentava tecido gengival com dimensões normais ou ligeiramente aumentadas.

A possível influência da inflamação sobre a atividade mitótica das células epiteliais é um assunto que apresenta informações controversas na literatura. O clássico estudo de Page e Schroeder (1976) estabeleceu que a inflamação gengival é capaz de induzir uma resposta proliferativa das células epiteliais. No entanto, Carro, Evans e Leone (1997) demonstraram que o aumento do nível de inflamação gengival teve um efeito inibitório sobre a proliferação de células epiteliais em cultura. Independentemente de qual seja o real efeito da inflamação gengival sobre a taxa de proliferação celular, em nosso estudo, procuramos afastar ou diminuir esta interferência. As áreas escolhidas para a remoção tecidual, tanto no grupo teste como no grupo controle, foram sítios clinicamente saudáveis, com um nível mínimo de inflamação. Assim, acreditamos que os resultados encontrados representam o comportamento das células epiteliais com pouca influência dos estímulos inflamatórios.

Nossos resultados mostraram que não pôde ser encontrada diferença significativa nas taxas de proliferação celular entre os usuários de nifedipina e os pacientes do grupo controle. Isso foi válido tanto para o Ki-67 como para a Ciclina B1, contrariando outros estudos que encontraram uma maior expressão do Ki-67 em usuários de nifedipina exibindo CG (SAITO et al., 1999; NURMENNIEMI et al., 2001). Foi claramente identificado que a marcação para o Ki-67 teve números mais altos do que a marcação pela Ciclina B1. Isso se deve ao fato de que a proteína nuclear Ki-67 é expressa em todas as fases ativas do ciclo celular, ou seja, G1, S, G2 e M (SCHOLZEN; GERDES, 2000) e por isso, o número de células marcadas é maior quando comparado à Ciclina B1 que é expressa em fases mais curtas do ciclo celular, isto é, G2 e M (HWANG et al., 1995).

É possível que as altas taxas de proliferação de queratinócitos observadas por Saito et al. (1999), Nurmenniemi et al. (2001,2006) e Mesa et al. (2004) só ocorreram devido a estímulos provenientes do tecido conjuntivo. Provavelmente, só há aumento da atividade mitótica das células epiteliais quando há um CG moderado ou severo. Apesar das limitações,

ossos resultados sugerem que, como não havia CG, o tecido gengival dos pacientes usuários de nifedipina teve taxa de proliferação semelhante ao tecido saudável.

Alguns estudos mostraram que a proliferação dos queratinócitos pode ser mediada por fatores de crescimento provenientes do tecido conjuntivo tais como o KGF e o SF (DAS; IRWIN, 2000; DAS; NEWMAN; OLSEN, 2002; HYLAND et al., 2004). Assim, é possível sugerir que a alta atividade proliferativa dos queratinócitos nos CGID não ocorra por uma ação direta das drogas no epitélio, mas como um resultado da interação das drogas com fibroblastos gengivais. Em alguns pacientes reativos, pode haver subpopulações de fibroblastos que reajam direta ou indiretamente ao efeito das drogas e produzam uma série de eventos responsáveis pelo CG (HASSEL; STANEK, 1983; FUJI et al., 1994; TIPTON et al., 1994; MC KEVITT; IRWIN, 1995; NISHIMURA et al., 2002; PARKAR et al., 2004; TAKEUCHI, 2004). Um desses eventos pode ser a produção de fatores mitogênicos que geram um aumento da atividade mitótica dos queratinócitos.

É interessante observar que as alterações epiteliais detectadas pela análise microscópica não corresponderam a um aumento da atividade mitótica dos queratinócitos quantificada pela imunistoquímica. Embora reconheçamos as limitações deste estudo, podemos sugerir que o prolongamento das cristas epiteliais nos usuários de nifedipina não ocorra em função do aumento da capacidade proliferativa, mas provavelmente por inibição da taxa de apoptose dos queratinócitos. Saito et al. (1999) notaram uma surpreendente redução da expressão do Ki-67 nas cristas alongadas de pacientes com CG, isso sugere que o prolongamento das cristas não tenha relação com proliferação epitelial. Outros estudos demonstraram que a nifedipina foi capaz de bloquear a apoptose de células endoteliais (SUGANO; TSUCHIDA e MAKINO, 2002; YAMAGISHI et al., 2003). Esse efeito inibidor da apoptose também foi verificado em relação ao CG. Trabalhos clínicos (SAITO et al., 2000) e experimentais (SHIMIZU et al., 2002; HANDAJANI et al., 2003) mostraram que a

nifedipina induziu à inibição da apoptose dos queratinócitos e, conseqüentemente, a um prolongamento da vida destas células, o que explicaria o espessamento epitelial observado no CG.

Neste estudo, não utilizamos marcadores específicos (como a proteína bcl-2) que indiquem inibição de apoptose. Apesar disso, podemos supor que o uso crônico de nifedipina seja capaz de acarretar inibição da taxa de apoptose dos queratinócitos gengivais. O aparecimento de cristas epiteliais longas estaria associado ao prolongamento da vida das células e não a um aumento na taxa de proliferação. Sabe-se que a apoptose é um fenômeno que envolve uma cascata de eventos bioquímicos os quais exigem um aumento da concentração do cálcio intracelular (RIBEIRO et al., 1993; CANO-ABAD et al., 2001). Assim, é possível que esse efeito sobre o epitélio se processe até mesmo de maneira direta, ou seja, a nifedipina bloquearia o influxo intracelular de cálcio e com isso impediria a entrada das células epiteliais em apoptose (SHIMIZU et al., 2002). Essa ação direta da nifedipina sobre as células epiteliais está reforçada por um estudo recente que demonstrou, de forma inédita, a presença de canais de cálcio do tipo L em queratinócitos de pele humana (DENDA; FUJIWARA e HIBINO, 2006). De maneira análoga, o queratinócito gengival também pode apresentar canais de cálcio do tipo L. A nifedipina ligando-se a estes sítios, assim como o faz às células musculares, seria capaz de bloquear a entrada de Ca^{2+} e conseqüentemente impedir a apoptose.

Enfim, os resultados encontrados neste estudo mostraram que o uso crônico de nifedipina é capaz de ocasionar alterações subclínicas no tecido gengival humano ao nível do epitélio. Tais alterações, entretanto, não parecem estar relacionadas ao aumento da atividade mitótica, mas a um efeito inibidor da apoptose. O significado clínico dessas alterações e os possíveis fatores associados a elas precisam ser elucidados por futuros estudos.

7. CONCLUSÕES

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

- O uso crônico de nifedipina está associado com alterações subclínicas no epitélio gengival. Essas alterações foram caracterizadas por um aumento da porcentagem de cristas epiteliais longas.
- Não houve diferença significativa na expressão dos marcadores de proliferação celular Ki-67 e Ciclina B1 entre o grupo de usuários de nifedipina e o grupo controle. Portanto, a taxa de proliferação epitelial dos usuários de nifedipina foi semelhante aos pacientes saudáveis.

A partir destas conclusões e com base na revisão da literatura, podemos sugerir que:

- As elevadas taxas de proliferação do tecido epitelial descritas em outros estudos ocorreram devido a estímulos provenientes do tecido conjuntivo em pacientes reativos ao CGIN.
- O aparecimento de cristas epiteliais alongadas no tecido gengival dos usuários de nifedipina está provavelmente relacionado a um efeito inibidor da apoptose dos queratinócitos.

REFERÊNCIAS

- ABERNETHY, D. R.; SCHWARTZ, J. B. Calcium-antagonist drugs. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 341, n. 19, p. 1447-57, Nov. 1999.
- ANTMAN, E. M.; STONE, P. H.; MULLER, J. E. Calcium channel blocking agents in the treatment of cardiovascular disorders. Part I: Basic and clinical electrophysiologic effects. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 93, n. 6, p. 875-85, Dec. 1980.
- BARAK, S.; ENGELBERG, I. S.; HISS, J. Gingival hyperplasia caused by nifedipine. Histopathologic findings. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 58, n. 9, p. 639-42, Sept. 1987.
- BARCLAY, S.; THOMASON, J. M.; IDLE, J. R.; SEYMOUR, R. A. The incidence and severity of nifedipine-induced gingival overgrowth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 19, n. 5, p. 311-4, May 1992.
- BARRITT, G. J. Receptor-activated Ca²⁺ + Inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca²⁺ + signalling requirements. **Biochem J.**, London, v. 337, n. 2, p. 153-169. Jan. 1999.
- BENCINI, P. L.; CROSTI, C.; SALA, F.; MONTAGNINO, G.; TARANTINO, A.; MENNI, S.; PICCINNO, R. Gingival hyperplasia by nifedipine: report of a case. **Acta Derm. Venereol.**, Oslo, v. 65, n. 4, p. 362-5, Apr. 1985.
- BREDFELDT, G. W. Phenytoin-induced hyperplasia found in edentulous patients. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 123, n. 6, p. 61-4, June 1992.
- BRUNO, S.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. **Cell Prolif.**, New York, v. 25, n. 1, p. 31-40, Jan. 1992.
- BULLON, P.; MACHUCA, G.; ARMAS, J. R.; ROJAS, J. L.; JIMENEZ, G. The gingival inflammatory infiltrate in cardiac patients treated with calcium antagonists. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 28, n. 10, p. 897-903, Oct. 2001.
- CANO-ABAD, MF.; VILLARROYA, M.; GARCIA, A.G.; GABILAN, N.H.; LÓPEZ, M.G. Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. **J Biol Chem.**, Baltimore, v. 276, n. 43, p. 39695-39704, Oct. 2001.
- CARRANZA Jr., F. A. Aumento gengival. In: CARRANZA Jr., F. A. **Periodontia clínica de glickman**. 5. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1983. p. 95-121.
- CARRO, O. M.; EVANS, S. A.; LEONE, C. W. Effect of inflammation on the proliferation of human gingival epithelial cells in vitro. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 68, n. 11, p. 1070-5, Nov. 1997.
- CHEN, Y. T.; TU, H. P.; CHIN, Y. T.; SHEN, E. C.; CHIANG, C. Y.; GAU, C. H.; FU, E. Upregulation of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor gene

- and protein expression in cyclosporin-induced overgrown edentulous gingiva in rats. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 76, n. 12, p. 2267-75, Dec. 2005.
- DALEY, T. D.; WYSOCKI, G. P.; DAY, C. Clinical and pharmacologic correlations in cyclosporine-induced gingival hyperplasia. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 62, n. 4, p. 417-21, Oct. 1986.
- DARLING, M. R.; ARENDORF, T. M.; SHAIKH, A. B.; STEPHEN, L. X. Gingival hyperplasia of an edentulous alveolar ridge in an epileptic--a case report. **N. Z. Dent. J.**, Dunedin, v. 84, n. 378, p. 114-6, Oct. 1988.
- DAS, S. J.; NEWMAN, H. N.; OLSEN, I. Keratinocyte growth factor receptor is up-regulated in cyclosporin A-induced gingival hyperplasia. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 81, n. 10, p. 683-7, Oct. 2002.
- DAS, S. J.; OLSEN, I. Keratinocyte growth factor is upregulated by the hyperplasia-inducing drug nifedipine. **Cytokine**, New York, v. 12, n. 10, p. 1566-9, Oct. 2000.
- DAYAN, D.; KOZLOVSKY, A.; TAL, H.; KARIV, N.; SHEMESH, M.; NYSKA, A. Castration prevents calcium channel blocker-induced gingival hyperplasia in beagle dogs. **Hum. Exp. Toxicol.**, Basingstoke, v. 17, n. 7, p. 396-402, July 1998.
- DENDA, M.; FUJIWARA, S.; HIBINO, T. Expression of voltage-gated calcium channel subunit $\alpha 1C$ in epidermal keratinocytes and effects of agonist and antagonists of the channel on skin barrier homeostasis. **Exp. Dermatol.**, Copenhagen, v. 15, n. 6, 455-460, June 2006.
- DREYER, W. P.; THOMAS, C. J. Diphenylhydantoinate-induced hyperplasia of the masticatory mucosa in an edentulous epileptic patient. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 45, n. 5, p. 701-6, May, 1978.
- ELLIOTT, A. C. Recent developments in non-excitabile cell calcium entry. **Cell Calcium**, Edinburgh, v. 30, n. 2, p. 73-93, Aug. 2001.
- ELLIS, J. S.; SEYMOUR, R. A.; MONKMAN, S.; IDLE, J. R. Disposition of nifedipine in plasma and gingival fluid in relation to drug-induced gingival overgrowth. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 28, n. 5, p. 373-8, Sept. 1993.
- ELLIS, J. S.; SEYMOUR, R. A.; STEELE, J. G.; ROBERTSON, P.; BUTLER, T. J.; THOMASON, J. M. Prevalence of gingival overgrowth induced by calcium channel blockers: a community-based study. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 63-7, Jan. 1999.
- ELLIS, J. S.; SEYMOUR, R. A.; THOMASON, J. M.; BUTLER, T. J.; IDLE, J. R. Periodontal variables affecting nifedipine sequestration in gingival fluid. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 30, n. 4, p. 272-6, July 1995.
- ESPOSITO, C.; FORNONI, A.; CORNACCHIA, F.; BELLOTTI, N.; FASOLI, G.; FOSCHI, A.; MAZZUCHELLI, I.; MAZZULLO, T.; SEMERARO, L.; DAL CANTON, A. Cyclosporine induces different responses in human epithelial, endothelial and fibroblast cell cultures. **Kidney Int.**, Cambridge, v. 58, n. 1, p. 123-30, July 2000.
- ESTERBERG, H. L. WHITE, P. H. Sodium dilantin gingival hyperplasia. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 32, n. 1, 16-24, Jan. 1945.

- EVANS, T.; ROSENTHAL, E. T.; YOUNGBLOM, J.; DISTEL, D.; HUNT, T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. **Cell**, Cambridge, v. 33, n. 2, p. 389-96, June 1983.
- FATTORE, L.; STABLEIN, M.; BREFDFELDT, G.; SEMLA, T.; MORAN, M.; DOHERTY-GREENBERG, J. M. Gingival hyperplasia: a side effect of nifedipine and diltiazem. **Spec. Care Dentist.**, Chicago, v. 11, n. 3, p. 107-9, May-June 1991.
- FEWTRELL, C. Ca²⁺ oscillations in non-excitabile cells. **Annu Rev Physiol**, Palo Alto, v. 55, n. 4, p. 427-54, Apr. 1993.
- FORSBURG, S. L.; NURSE, P. Cell Cycle Regulation in the Yeasts *Saccharomyces Cerevisiae* and *Schizosaccharomyces-Pombe*. **Annu Rev Cell Dev Biol**, Palo Alto, v. 7, n. 3, p. 227-256, Mar. 1991.
- FU, E.; HSIEH, Y. D.; SHEN, E. C.; NIEH, S.; MAO, T. K.; CHIANG, C. Y. Cyclosporin-induced gingival overgrowth at the newly formed edentulous ridge in rats: a morphological and histometric evaluation. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 72, n. 7, p. 889-94, July 2001.
- FUJII, A.; MATSUMOTO, H.; NAKAO, S.; TESHIGAWARA, H.; AKIMOTO, Y. Effect of calcium-channel blockers on cell proliferation, DNA synthesis and collagen synthesis of cultured gingival fibroblasts derived from human nifedipine responders and non-responders. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 99-104, Feb. 1994.
- FUJIMORI, Y.; MAEDA, S.; SAEKI, M.; MORISAKI, I.; KAMISAKI, Y. Inhibition by nifedipine of adherence- and activated macrophage-induced death of human gingival fibroblasts. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 415, n. 1, p. 95-103, Mar. 2001.
- GERDES, J.; BECKER, M. H.; KEY, G.; CATTORETTI, G. Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. **J Pathol**, Chichester, v. 168, n. 1, p. 85-6, Sept. 1992.
- HALL, P. A.; WOODS, A. L. Immunohistochemical markers of cellular proliferation: achievements, problems and prospects. **Cell Tissue Kinet**, Tokyo, v. 23, n. 6, p. 505-22, Nov. 1990.
- HANCOCK, R. H.; SWAN, R. H. Nifedipine-induced gingival overgrowth. Report of a case treated by controlling plaque. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 19, n. 1, p. 12-4, Jan. 1992.
- HANDAJANI, J.; SANTOSO, A. L.; HANIASTUTI, T.; UTORO, T.; SOSROSENO, W. Effect of nifedipine on the expression of bcl-2 protein in rat gingiva. **Clin. Oral Investing.**, Berlin, v. 7, n. 1, p. 56-8, Jan. 2003.
- HASSEL, T. M.; STANEK, E. J. Evidence that healthy human gingiva contains functionally heterogenous fibroblasts subpopulations. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 617-625, Nov. 1983.
- HEFTI, A. F.; ESHENAUER, A. E.; HASSELL, T. M.; STONE, C. Gingival overgrowth in cyclosporine A treated multiple sclerosis patients. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 65, n. 8, p. 744-9, Aug. 1994.

- HEIJL, L.; SUNDIN, Y. Nitrendipine-induced gingival overgrowth in dogs. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 60, n. 2, p. 104-12, Feb. 1989.
- HENRY, P. D. Comparative pharmacology of calcium antagonists: nifedipine, verapamil and diltiazem. **Am. J. Cardiol.**, New York, v. 46, n. 6, p. 1047-58, Dec. 1980.
- HUANG, W. T.; LU, H. K.; CHOU, H. H.; KUO, M. Y. Immunohistochemical analysis of Th1/Th2 cytokine profiles and androgen receptor expression in the pathogenesis of nifedipine-induced gingival overgrowth. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 38, n. 4, p. 422-7, Aug. 2003.
- HUNT, T. Cell biology. Cell cycle gets more cyclins. **Nature**, London, v. 350, n. 6318, p. 462-3, Apr. 1991.
- HWANG, A.; MAITY, A.; MCKENNA, W. G.; MUSCHEL, R. J. Cell cycle-dependent regulation of the cyclin B1 promoter. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 270, n. 47, p. 419-24, Nov. 1995.
- HYLAND, P. L.; MCKEOWN, S. T.; MACKENZIE, I. C.; IRWIN, C. R. Regulation of keratinocyte growth factor and scatter factor in cyclosporin-induced gingival overgrowth. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 33, n. 7, p. 391-7, Aug. 2004.
- ISHIDA, H.; KONDOH, T.; KATAOKA, M.; NISHIKAWA, S.; NAKAGAWA, T.; MORISAKI, I.; KIDO, J.; OKA, T.; NAGATA, T. Factors influencing nifedipine-induced gingival overgrowth in rats. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 66, n. 5, p. 345-50, May 1995.
- JACOBS, T. Control of the cell cycle. **Dev Biol**, Orlando, v. 153, n. 1, p. 1-15, Sept. 1992.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. O núcleo celular. In : JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- JOHNSON, D. G.; WALKER, C. L. Cyclins and cell cycle checkpoints. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, Palo Alto, v. 39, n. 3, p. 295-312, Mar. 1999.
- KATZUNG, B.G.; CHATERJEE, K. Vasodilatadores e o tratamento da angina de peito. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- KIMBALL, O. The treatment of epilepsy with sodium diphenylhydantoinate. **J. Am. Med. Assoc.**, New York, v. 112, n. 3, p. 1244-1245, Mar. 1939.
- LEDERMAN, D.; LUMERMAN, H.; REUBEN, S.; FREEDMAN, P. D. Gingival hyperplasia associated with nifedipine therapy: report of a case. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 57, n. 6, p. 620-2, June 1984.
- LEUNG, W. K.; YAU, J. Y.; JIN, L. J.; CHAN, A. W.; CHU, F. C.; TSANG, C. S.; CHAN, T. M. Subgingival microbiota of renal transplant recipients. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 18, n. 1, p. 37-44, Feb. 2003.
- LOHKA, M. J.; HAYES, M. K.; MALLER, J. L. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 85, n. 9, p. 3009-13, May 1988.

- LUCAS, R. M.; HOWELL, L. P.; WALL, B. A. Nifedipine-induced gingival hyperplasia. A histochemical and ultrastructural study. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 56, n. 4, p. 211-5, Apr. 1985.
- MACKENZIE, I. C.; HILL, M. W. Connective tissue influences on patterns of epithelial architecture and keratinization in skin and oral mucosa of the adult mouse. **Cell. Tissue Res.**, Berlin, v. 235, n. 3, p. 551-9, Mar. 1984.
- MC KEVITT, K. M. B.; IRWIN, C. R. Phenotypic differences in growth, matrix synthesis and response to nifedipine between fibroblasts derived from clinically healthy and overgrown gingival tissue. **J. Oral Pathol Med.**, Copenhagen, v. 24, n. 2, p. 66-71, Feb. 1995.
- MESA, F.; AGUILAR, M.; GONZALEZ-MOLES, M. A.; GUERRERO, A.; SANCHEZ-ALVAREZ, J. C.; DELMORAL, R. G.; O'VALLE, F. Vigabatrina-induced modification of Ki-67 expression in gingival epithelium: immunohistochemical study of a short series. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 39, n. 1, p. 66-71, Feb. 2004.
- MILLER, K. Immunocytochemical techniques. In: BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. 4. ed. London: Churchill Livingstone, 1996. p. 435-470.
- MORISAKI, I.; KATO, K.; LOYOLA-RODRIGUEZ, J. P.; NAGATA, T.; ISHIDA, H. Nifedipine-induced gingival overgrowth in the presence or absence of gingival inflammation in rats. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 28, n. 1, p. 396-403, Nov. 1993.
- MUELLER, H. S.; ANTMAN, E. M.; FERST, J. A.; MULLER, J. E. Nifedipine in the treatment of cardiovascular disease. **Pharmacotherapy**, New York, v. 1, n. 2, p. 78-94, Sept./Oct. 1981.
- MURRAY, A. W.; HUNT, T. Cells and the Cell Cycle. In : MURRAY, A. W.; HUNT, T. **The cell cycle: an introduction**. New York: Oxford University Press, 1993.
- NAKOU, M.; KAMMA, J. J.; ANDRONIKAKI, A.; MITSIS, F. Subgingival microflora associated with nifedipine-induced gingival overgrowth. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 69, n. 6, p. 664-9, June 1998.
- NERY, E. B.; EDSON, R. G.; LEE, K. K.; PRUTHI, V. K.; WATSON, J. Prevalence of nifedipine-induced gingival hyperplasia. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 66, n. 7, p. 572-8, Jul. 1995.
- NICKOLOFF, B. J.; FISHER, G. J.; MITRA, R. S.; VOORHESS, J. J. Additive and synergistic antiproliferative effects of cyclosporin A and gamma interferon on cultured human keratinocytes. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 131, n. 1, p. 12-8, Apr. 1988.
- NIIMI, A.; TOHNAL, I.; KANEDA, T.; TAKEUCHI, M.; NAGURA, H. Immunohistochemical analysis of effects of cyclosporin A on gingival epithelium. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 19, n. 9, p. 397-403, Oct. 1990.
- NISHIKAWA, S.; TADA, H.; HAMASAKI, A.; KASAHARA, S.; KIDO, J.; NAGATA, T.; ISHIDA, H.; WAKANO, Y. Nifedipine-induced gingival hyperplasia: a clinical and in vitro study. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 62, n. 1, p. 30-5, Jan. 1991.

- NISHIMURA, F.; NARUISHI, H.; NARUISHI, K.; YAMADA, T.; SASAKI, J.; PETERS, C.; UCHIYAMA, Y.; MURAYAMA, Y. Cathepsin-L, a key molecule in the pathogenesis of drug-induced and I-cell disease-mediated gingival overgrowth: a study with cathepsin-L-deficient mice. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 161, n. 6, p. 2047-52, Dec. 2002.
- NORBURY, C.; NURSE, P. Animal Cell Cycles and Their Control. **Annu Rev Biochem**, Palo Alto, v. 61, n. 5, p. 441-470, Apr. 1992.
- NORRIS, V. A calcium flux at the termination of replication triggers cell division in Escherichia coli Hypothesis. **Cell Calcium**, London, v. 10, n. 8, p.511-7, Nov-Dec.1989.
- NORRIS, V.; GRANT, S.; FREESTONE, P.; CANVIN, J.; SHEIKH, F. N.; TOTH, I.; TRINEI, M.; MODHA, K.; NORMAN, R. I. Calcium signalling in bacteria. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 178, n. 13, p. 3677-82, July 1996.
- NURMENNIEMI, P. **Inflammatory cells and mitotic activity of keratinocytes in gingival overgrowth induced by immunosuppressive and nifedipine medication**. 2006. 73 f. (Dissertation) Faculty of Medicine, Institute of Dentistry, University of Oulu. Oulu-Finland.
- NURMENNIEMI, P. K.; PERNU, H. E.; KNUUTTILA, M. L. Mitotic activity of keratinocytes in nifedipine-and immunosuppressive medication-induced gingival overgrowth. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 72, n. 2, p. 167-73, Feb. 2001.
- O'VALLE, F.; MESA, F. L.; GOMEZ-MORALES, M.; AGUILAR, D.; CARACUEL, M. D.; MEDINA-CANO, M. T.; ANDUJAR, M.; LOPEZ-HIDALGO, J.; GARCIA DEL MORAL, R. Immunohistochemical study of 30 cases of cyclosporin A-induced gingival overgrowth. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 65, n. 7, p. 724-30, July 1994.
- OPIE, L. H.; BUHLER, F. R.; FLECKENSTEIN, A.; HANSSON, L.; HARRISON, D. C.; POOLE-WILSON, P. A.; SCHWARTZ, A.; VANHOUTTE, P. M.; BRAUNWALD, E.; NAYLER, W. G. et al. International Society and Federation of Cardiology: Working Group on Classification of Calcium Antagonists for Cardiovascular Disease. **Am. J. Cardiol.**, New York, v. 60, n. 7, p. 630-632, Sept. 1987.
- OZAKI, Y.; KUNIMATSU, K.; TAJIRI, K.; HARA, Y.; KATO, Y., AOKI, Y.; KATO, I. Role of medullasin in nifedipine-induced gingival overgrowth in rats. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 43, n. 10, p. 801-10, Oct. 1998.
- PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 34, n. 3, p. 235-49, Mar. 1976.
- PARKAR, M. H.; HUSSAIN, F.; WICKRAMARATNA, A. The immunosuppressant and hyperplasia-inducing drug cyclosporin A regulates the cell cycle and cyclin B1 gene expression in gingival fibroblasts in vitro. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v. 317, n. 2, p. 221-5, Aug. 2004.
- PINES, J. Four-dimensional control of the cell cycle. **Nat Cell Biol**, New York, v. 1, n. 3, p. E73-9, July, 1999.
- PISANTY, S.; RAHAMIM, E.; BEN-EZRA, D.; SHOSHAN, S. Prolonged systemic administration of cyclosporin A affects gingival epithelium. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 61, n. 2, p. 138-41, Feb. 1990.

- POPPELL, T. D.; COLLINS, J. F. Phenytoin-induced gingival hyperplasia of edentulous spaces: a case report. **Spec. Care Dentist.**, Chicago, v. 7, n. 3, p. 106-7, May-June 1987.
- RAMON, Y.; BEHAR, S.; KISHON, Y.; ENGELBERG, I. S. Gingival hyperplasia caused by nifedipine--a preliminary report. **Int. J. Cardiol.**, Limerick, v. 5, n. 2, p. 195-206, Feb. 1984.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Mecanismos celulares : excitação, contração e secreção. In : RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.
- RATEITSCHAK-PLUSS, E. M.; HEFTI, A.; LORTSCHER, R.; THIEL, G. Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 10, n. 3, p. 237-46, May 1983.
- RIBEIRO, J. M.; CARSON, D. A. Ca²⁺/Mg²⁺-dependent endonuclease from human spleen: purification, properties, and role in apoptosis. **Biochemistry**, New York, v. 32, n. 35, p. 9129-36, Sept. 1993.
- SAITO, K.; MORI, S.; TANDA, N.; SAKAMOTO, S. Expression of p53 protein and Ki-67 antigen in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 70, n. 6, p. 581-6, June 1999.
- SAITO, K.; MORI, S.; TANDA, N.; SAKAMOTO, S. Immunolocalization of c-Myc and bcl-2 proto-oncogene products in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, n. 1, p. 44-9, Jan. 2000.
- SATO, N.; MATSUMOTO, H.; AKIMOTO, Y.; FUJII, A. The effect of IL-1 α and nifedipine on cell proliferation and DNA synthesis in cultured human gingival fibroblasts. **J. Oral Sci.**, Tokyo, v. 47, n. 2, p. 105-10, June 2005.
- SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J. Cell Physiol.**, New York, v. 182, n. 3, p. 311-22, Mar. 2000.
- SEYMOUR, R. A.; ELLIS, J. S.; THOMASON, J. M. Risk factors for drug-induced gingival overgrowth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 27, n. 4, p. 217-23, Apr. 2000.
- SEYMOUR, R. A.; THOMASON, J. M.; ELLIS, J. S. The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 23, n. 1, p. 165-75, Mar. 1996.
- SHIMIZU, Y.; KATAOKA, M.; SETO, H.; KIDO, J.; NAGATA, T. Nifedipine induces gingival epithelial hyperplasia in rats through inhibition of apoptosis. **J. Periodontol.**, Copenhagen, v. 73, n. 8, p. 861-7, Aug. 2002.
- STONE, P. H.; ANTMAN, E. M.; MULLER, J. E. Calcium channel blocking agents in the treatment of cardiovascular disorders. Part II: Hemodynamic effects and clinical applications. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 93, n. 6, p. 886-904, Dec. 1980.
- SUGANO, M.; TSUCHIDA, K.; MAKINO, N. Nifedipine prevents apoptosis of endothelial cells induced by oxidized low-density lipoproteins. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, New York, v. 40, n. 1, p. 146-52, July 2002.

- TAKEUCHI, R. The effect of basic fibroblast growth factor on cell cycle in human gingival fibroblasts from nifedipine responder and non-responder. **J. Oral Sci.**, Tokyo, v. 46, n. 1, p. 37-44, Mar. 2004.
- TAVARES, A.; PERDIGÃO, J. Ciclo celular e as novas terapias contra o cancro (o ano do Nobel). **Boletim de Biotecnologia**, n.70, p. 7-14, Dez. 2001.
- TAVASSOLI, S.; YAMALIK, N.; CAGLAYAN, F.; CAGLAYAN, G.; ERATALAY, K. The clinical effects of nifedipine on periodontal status. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 69, n. 2, p. 108-12, Feb. 1998.
- THOMASON, J. M.; SEYMOUR, R. A.; SOAMES, J. V. Severe mucosal hyperplasia of the edentulous maxilla associated with immunosuppressant therapy: a clinical report. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 72, n. 1, p. 1-3, July 1994.
- TIPTON, D. A.; FRY, H. R.; DABBOUS, M. K. Altered collagen metabolism in nifedipine-induced gingival overgrowth. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 29, n. 6, p. 401-9, Nov. 1994.
- VAN DER WALL, EE. TUINZING, D. B.; HES, J. Gingival hyperplasia induced by nifedipine, an arterial vasodilating drug. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 60, n. 1, p. 38-40, July 1985.
- VINELLA, D.; D'ARI, R. Overview of Controls in the Escherichia Coli Cell Cycle. **Bioessays**, Cambridge, v. 17, n. 6, p. 527-36, 1995.
- WESTBROOK, P.; BEDNARCZYK, E. M.; CARLSON, M.; SHEEHAN, H.; BISSADA, N. F. Regression of nifedipine-induced gingival hyperplasia following switch to a same class calcium channel blocker, isradipine. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 68, n. 7, p. 645-50, July 1997.
- WIDROW, R. J.; RABINOVITCH, P. S.; CHO, K.; LAIRD, C. D. Separation of cells at different times within G2 and mitosis by cyclin B1 flow cytometry. **Cytometry**, New York, v. 27, n. 3, p. 250-4, Mar. 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, INTERNATIONAL SOCIETY OF HYPERTENSION WRITING GROUP. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hipertension (ISH) statement on management of hypertension. **J Hypertens**. Philadelphia, v. 21, n. 11, p. 1983-1992, 2003.
- YAMAGISHI, S.; INAGAKI, Y.; ABE, R.; KIKUCHI, S.; SASAKI, N.; TAKEUCHI, M. Nifedipine inhibits apoptotic cell death of cultured endothelial cells induced by tumor necrosis factor-alpha. **Drugs Exp. Clin. Res.**, New York, v. 29, n. 4, p. 141-5, 2003.
- ZAITUNE, M. P.; BARROS, M. B.; CESAR, C. L.; CARANDINA, L.; GOLDBAUM, M. Arterial hypertension in the elderly: prevalence, associated factors, and control practices in Campinas, Sao Paulo, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 285-94, Feb. 2006.
- ZLOTOGORSKI, A.; NYSKA, M.; SELA, M.; NYSKA, A.; GOTSMAN, M. Nifedipine-induced gingival hyperplasia: case reports and literature review. **Isr. J. Med. Sci.**, Dublin, v. 25, n. 8, p. 453-5, Aug. 1989.

APÊNDICE I

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a), em uma pesquisa. Os avanços na área da saúde ocorrem através de trabalhos como este, por isto a sua participação é importante. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir e caso aceite fazer parte do estudo, assine ao final deste documento que estará em duas vias, sendo uma delas sua e a outra, do pesquisador responsável. Caso você se recuse a participar da pesquisa, não será penalizado de forma alguma, além disto, se quiser esclarecer qualquer dúvida a respeito, poderá procurar o Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Goiás, localizado no Prédio da Reitoria, 1º andar. Campus II. Goiânia-Go ou pelos telefones (62)521- 1076 ou (62)521- 1340.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do projeto: Análise imunoistoquímica da expressão dos marcadores ki 67 e ciclina B1 no epitélio gengival de pacientes sob terapia com nifedipina.

Pesquisador responsável: Luciano Alberto de Castro

Telefones para contato: (62) 215 4359 – (63) 225 5032 – (63) 9973 1507

Pesquisadores participantes:

Professor Elismauro Francisco de Mendonça – Orientador
Professora Aline Carvalho Batista – Co-orientadora

Você usa regularmente a medicação nifedipina para o tratamento e controle da sua pressão ou problema cardíaco. Embora este seja um remédio importante para o seu controle médico, ele pode causar alterações na sua gengiva. Algumas pessoas podem apresentar alterações na forma e tamanho da gengiva que além de ficar com um aspecto feio e pode ainda ocasionar infecção e destruição do osso que sustenta os dentes. Mesmo que você não apresente um aumento gengival muito grande, internamente sua gengiva pode também estar afetada, pelo menos em parte.

Assim, o objetivo desta pesquisa é analisar através de exames de laboratório, as alterações que se passam dentro do tecido gengival das pessoas que usam nifedipina. Em todo o mundo são feitas pesquisas como esta e o objetivo final de todas elas é prestar uma contribuição para o entendimento de como o crescimento gengival se instala e, conseqüentemente, buscar formas de tratamento para essa complicação medicamentosa.

Para a sua participação no estudo, inicialmente, será feito um exame odontológico completo, incluindo avaliação da sua gengiva. Em seguida, você receberá instruções de higiene bucal e remoção de tártaro com o objetivo de melhorar a inflamação gengival. Para a realização deste estudo, será necessária a remoção de um pequeno pedaço da sua gengiva de cerca de 0,5 cm. Essa remoção não causará nenhum prejuízo à sua saúde, este é um procedimento cirúrgico bastante simples, porém, todos os cuidados pré-operatórios serão observados e todos os ajustes em relação ao uso de anestésicos locais e outras medicações serão feitos em acordo com o seu médico assistente. Durante esta pequena cirurgia, serão feitos cuidados para que o seu desconforto seja o mínimo possível e, após a remoção do pedaço da gengiva, você retornará após sete dias para remoção dos pontos. Neste período após a cirurgia, caso você necessite, receberá assistência pela equipe da pesquisa. As amostras de gengiva obtidas serão utilizadas unicamente para este estudo.

Após a obtenção da amostra de gengiva, se você apresentar crescimento gengival será encaminhado para tratamento especializado em centros de referência da cidade de Goiânia-GO. Do mesmo modo, se você não exibir aumento gengival, mas tiver alguma outra doença na gengiva, também será encaminhado. Você será atendido (a) de acordo com a disponibilidade de vagas desses serviços.

Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro como forma de remuneração, mas também não terá nenhum gasto extra, pois toda despesa com transporte e alimentação decorrentes exclusivamente desta pesquisa será custeada pelo pesquisador. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo e os dados obtidos serão mantidos em sigilo e utilizados para compor a dissertação de Mestrado em Odontologia do pesquisador.

Luciano Alberto de Castro

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu,-----,RG-----
CPF-----, abaixo assinado, concordo em participar da pesquisa **Análise imunoistoquímica Da Expressão Dos Marcadores ki 67 e Ciclina B1 No Epitélio Gengival De Pacientes Sob Terapia Com Nifedipina**, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador Luciano Alberto de Castro sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data

Assinatura do responsável

APÊNDICE II

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CENTRO GOIANO DE DOENÇAS DA BOCA-CGDB
TRABALHO DE PESQUISA

FICHA CLÍNICA

GRUPO I: PACIENTES USUÁRIOS DE NIFEDIPINA

DATA _____

I - IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome _____ Gênero () M () F

Data do nascimento ___/___/___ Idade _____ Estado civil _____

Naturalidade _____ Profissão _____

Endereço _____

Cidade _____ Telefones _____

II – HISTÓRIA MÉDICA

Quais os medicamentos está usando neste momento?

TIPO	DOSE	TEMPO (MESES)

Já houve mudanças na dose de nifedipina ? () Sim () Não. Qual ?

Tem alergia a algum medicamento ? () Sim () Não. Qual ?

Teve alguma reação indesejável após anestesia local ? () Sim () Não () Qual ?

Teve algum tipo de hemorragia após procedimento cirúrgico ? () Sim () Não

É ou já foi fumante ? () Sim () Não

Tem diabetes mellitus ? () Sim () Não

Observações relevantes sobre a história médica:

Declaro serem verdadeiras as informações prestadas,

Assinatura do paciente

III- EXAME FÍSICO – LOCO-REGIONAL

Pressão arterial _____

Exame Extrabucal _____

Exame intrabucal (Mucosas - Dentes – Periodonto - Oclusão)

IV-2 ÍNDICE DE CRESCIMENTO GENGIVAL (ICG) (Modificado de Ellis et al, 2001)

13/12	12/11	11/21	21/22	22/23

33/32	32/31	31/41	41/42	42/43

Valor em porcentagem _____

Observações

Serão avaliadas as 10 papilas dos dentes anteriores. Se houver algum dente perdido, a papila adjacente será considerada. Cada papila poderá receber os seguintes scores : 0 = nenhum crescimento da papila interdental. 1 = crescimento leve, produzindo aparência romba da ponta da papila. 2 = crescimento moderado, envolvendo aumento lateral da papila através da coroa do dente, porém menos que $\frac{1}{4}$ da largura da coroa. 3 = severo crescimento da papila atingindo mais de $\frac{1}{4}$ largura da coroa. O score máximo de crescimento gengival será 30, representando 100%.

