

**MARIANA SATURNINO DE NORONHA**

**AVALIAÇÃO DE MASTÓCITOS EM REAÇÃO LIQUENOIDE AO  
AMÁLGAMA E LÍQUEN PLANO ORAL**

**Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2018**

Mariana Saturnino de Noronha

**AVALIAÇÃO DE MASTÓCITOS EM REAÇÃO LIQUENOIDE AO  
AMÁLGAMA E LÍQUEN PLANO ORAL**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em odontologia – área de concentração em Estomatologia

Orientador: Prof. Ricardo Alves Mesquita

Coorientadora: Profa. Giovanna Ribeiro Souto

Belo Horizonte

2018

## Ficha Catalográfica

N852a Noronha, Mariana Saturnino de.  
2018 Avaliação de mastócitos em reação liquenoide ao amálgama  
T e líquen plano oral / Mariana Saturnino de Noronha. -- 2018.

47 f. : il.

Orientador: Ricardo Alves de Mesquita .  
Coorientadora: Giovanna Ribeiro Souto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Mastócitos. 2. Líquen plano bucal. 3. Erupções liquenoides. 4. Amálgama dentário. 5. Mucosa bucal. I. Mesquita , Ricardo Alves de. II. Souto, Giovanna Ribeiro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047

Dedico este trabalho à minha mãe Luciane,  
ao meu irmão Victor e ao meu  
companheiro Rafa. Vocês são o meu porto  
seguro.

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, por ter iluminado meu caminho. Por ter me dado alegria nas conquistas e aprendizado nas dificuldades.

À minha mãe, pelo exemplo de honestidade, determinação, amor pelo próximo e pela profissão. Antes de tudo, uma mulher guerreira, que lutou ao meu lado pelos meus sonhos. Ao meu irmão pelo amor incondicional e cuidado com a caçula. Muitas vezes me apoiando e dando o suporte de pai. Ao meu companheiro Rafa, exemplo de ser humano e de simplicidade. Pela presença e amor sincero, em todos os momentos. À minha família, padrasto, padrinhos, tios, primos, e sogros. Pela formação ética, suporte afetivo e exemplo diário.

Aos meus amigos, alguns de convivência diária e outros à distância, todos sempre presentes de uma maneira especial na minha vida. Em especial à Camila, pelo exemplo de pessoa e profissional.

Ao meu orientador, professor Ricardo Mesquita, pelo conhecimento transmitido e por ser uma referência de dedicação e ética no trabalho. À minha coorientadora, professora Giovanna, pelo apoio e confiança no meu trabalho.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Domenico, Dani e Mara, pela paciência, disponibilidade e gentileza.

Aos professores da patologia, pela dedicação e excelência no trabalho. Ao professor Lucas, pela contribuição indispensável no trabalho.

À Universidade Federal de Minas Gerais, por toda minha formação acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, pelo suporte financeiro.

## RESUMO

Mastócitos são células originadas na medula óssea e encontram-se presentes em lesões inflamatórias como o líquen plano oral (LPO) e a reação liquenoide ao amálgama (RLA). Tais lesões são imunologicamente mediadas e apresentam características clínicas e histológicas semelhantes. O objetivo do trabalho é avaliar e comparar a densidade e degranulação de mastócitos em amostras de LPO e RLA. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. Treze amostras de LPO e RLA, diagnosticadas clinicamente e histologicamente, foram obtidas do arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG. Seis fragmentos de mucosa bucal normal foram utilizados como controle. Os cortes histológicos foram submetidos às reações de azul de toluidina e imunoistoquímica para anti-c-kit e anti-triptase. Os resultados mostraram maior densidade de mastócitos marcados por anti-c-kit, anti-triptase e azul de toluidina nas lesões comparado à mucosa saudável ( $p < 0,05$ ). Também foi observado um aumento na densidade de células inflamatórias mononucleadas na região A da RLA em relação ao LPO ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que os mastócitos são células importantes na etiopatogênese das lesões, mas a avaliação quantitativa dessas células não é um parâmetro consistente para diferenciar as lesões.

**Palavras chave:** Mastócitos. Líquen plano oral. Reação liquenoide.

## ABSTRACT

### Evaluation of mast cells in amalgam lichenoid reaction and in oral lichen planus

Mast cells are originate in the bone marrow and are present in inflammatory lesions such as oral lichen planus (OLP) and amalgam lichenoid reaction (ALR). These lesions are immunologically mediated and have similar clinical and histological characteristics. The aim of this study is to evaluate and compare the density and degranulation of mast cells in OLP and ALR sample. The study was approved by the Research Ethics Committee of UFMG. Thirteen OLP and ALR sample, diagnosed clinically and histologically, were obtained from the archive of the Oral and Maxillofacial Pathology Service of the Dental School of UFMG. Six fragments of normal buccal mucosa were used as control. The histological sections were submitted to toluidine blue reactions and immunohistochemistry for anti-c-kit and anti-tryptase. The results showed a higher density of mast cells marked by anti-c-kit, anti-tryptase and toluidine blue in the lesions compared to healthy mucosa ( $p < 0.05$ ). An increase in the density of mononuclear inflammatory cells in the A region of the ALR in relation to OLP ( $p < 0.05$ ) was also observed. It is concluded that mast cells are important cells in the etiopathogenesis of lesions, but the quantitative evaluation of these cells is not a consistent parameter to differentiate the lesions.

**Key-words:** Mast cells. Lichen planus, Oral. Lichenoid reaction.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- (A) Reação liquenoide ao amálgama e (B) líquen plano oral, ambos mostrando infiltrado inflamatório linfocítico em banda abaixo do epitélio (hematoxilina-eosina, aumento original x50). 33
- Figura 2- (A) Líquen plano oral mostrando infiltrado inflamatório linfocítico em banda abaixo do epitélio (azul de toluidina, aumento original x50) e (B) seta preta indicando mastócito não-degranulado e seta vermelha indicando mastócito degranulado (azul de toluidina, aumento original x400). 33
- Figura 3- (A) Marcação imunohistoquímica para c-kit em líquen plano oral (aumento original x50) e (B) marcação imunohistoquímica para c-kit em líquen plano oral mostrando mastócitos (aumento original x200). 33
- Figura 4- (A) Marcação imunohistoquímica para triptase em líquen plano oral e (B) marcação imunohistoquímica para triptase em líquen plano oral mostrando mastócitos (aumento original x200). 34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos primários utilizados, diluição, temperatura e tempo de incubação, agente de recuperação antigênica.	19
----------	--	----

### **Tabelas artigo**

Tabela 1-	Dados clínicos dos indivíduos e sítio da coleta dos tecidos	35
-----------	---	----

Tabela 2-	Densidade média de mastócitos degranulados e não-degranulados em LPO, RLA e MON na lâmina própria, região A e região B.	36
-----------	---	----

Tabela 3-	Densidade média de células marcadas por c-kit e triptase em LPO, RLA e NOM, na região A, região B e lâmina própria.	37
-----------	---	----

Tabela 4-	Densidade média das células do infiltrado inflamatório mononuclear em LPO, RLA e MON, na região A, região B e lâmina própria.	38
-----------	---	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b>	<b>8</b>
1.1	Mastócitos etiopatogênese de lesões orais	9
1.2	Reação liquenoide ao amálgama	11
1.3	Líquen plano oral	12
1.4	Diferenças entre líquen plano oral e reação liquenoide ao amálgama	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
2.1	Objetivos gerais	16
2.1	Objetivos específicos	16
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA EXPANDIDA</b>	<b>17</b>
3.1	Submissão ao Comitê de Ética e cálculo amostral	17
3.2	Obtenção da amostra	17
3.3	Coloração com azul de toluidina	18
3.4	Imunoistoquímica	18
3.5	Análise da imuno-expressão e contagem das células	20
3.6	Análise da inflamação	20
3.7	Análise estatística	21
<b>4</b>	<b>ARTIGO</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>42</b>

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Mastócitos são células originadas da medula óssea, onde se diferenciam parcialmente e, quando presentes na mucosa e nos tecidos periféricos, terminam sua diferenciação (AROCK *et al.*, 1994). Os mastócitos desempenham papel importante na inflamação, defesa e reparo tecidual através da reação de hipersensibilidade tipo I (METZGER, 1992). Quando recrutados nos tecidos, por meio de ação de citocinas e produtos de bactérias, produzem grânulos contendo histamina, heparina, serotonina, proteases como triptases, peroxidases, quimases, caroxidases e mediadores primários (SCHWARTZ; AUSTEN, 1980). A histamina é um dos mediadores inflamatórios produzidos pelos mastócitos e, a regulação da resposta imune pela histamina é feita via receptores H1, H2, H3 e, o mais recentemente descrito, H4.

Os mastócitos estão presentes em lesões que apresentam inflamação tecidual, assim como o líquen plano oral (LPO) e a reação liquenoide ao amálgama (RLA) (JOSE *et al.*, 2001). O LPO e a RLA podem apresentar-se de forma semelhante tanto clinicamente como histologicamente. São lesões caracterizadas clinicamente pela presença de placas ou estrias brancas na mucosa, geralmente múltiplas e histologicamente apresentam um infiltrado inflamatório subepitelial composto principalmente por linfócitos, mastócitos e eosinófilos (EISENBERG, 2000). Acredita-se que o LPO tenha origem autoimune, já a RLA é uma reação alérgica aos produtos da oxidação de restaurações metálicas. Geralmente se apresenta unilateralmente, o que auxilia no processo de diagnóstico diferencial do líquen plano (SCULLY *et al.*, 1998).

Uma maior densidade de mastócitos foi observada em reações liquenoides e LPO, quando comparados à mucosa normal (SHARMA *et al.*, 2011). Além disso, já foi demonstrado que há uma diferença na densidade de mastócitos no LPO quando comparado às reações liquenoides. No entanto, foram avaliadas reações liquenoides por fatores diversos como medicamentos e materiais restauradores, não sendo considerada separadamente a reação liquenoide ao amálgama (JOSE *et al.*, 2001). Essas lesões, apesar da apresentação clínica ser semelhante, possuem agentes etiológicos distintos (NAGARAJ, 2013). No entanto, estudos que avaliem a RLA isoladamente são escassos na literatura. Desta forma, este estudo poderá melhorar o

entendimento da etiopatogênese dessas lesões, fornecendo informações que contribuirão, no futuro, para o tratamento das mesmas.

### 1.1 Mastócitos etiopatogênese de lesões orais

Os mastócitos foram descritos inicialmente por Paul Ehrlich(1878), como parte da resposta alérgica, presentes principalmente na fase primária, de sensibilização. São células de origem hematopoiética presentes na mucosa e tecido conjuntivo, localizadas principalmente ao redor de vasos sanguíneos em locais de maior contato com patógenos, como pele, mucosas e trato gastrointestinal. A diferenciação nos tecidos periféricos depende de estímulos de fatores de crescimento como IL-3, IL-4 e IL-9, entre outros (BABAEL *et al.*, 2016). Ao receber esses estímulos químicos, se diferenciam e liberam seus grânulos na matriz extracelular e ativam a resposta imunológica. Os mastócitos também estão presentes em doenças crônicas imunologicamente mediadas como a artrite reumatoide, esclerose sistêmica, fibroses e possuem papel importante na resposta imunológica tardia. Os mastócitos atuam na infiltração de leucócitos, imunidade adquirida, inflamação e remodelação tecidual (FODINGER *et al.* 1994; da SILVA *et al.*,2014; BEGHDADI *et al.*, 2011).

O processo de degranulação dos mastócitos é responsável por estimular ou inibir células vizinhas (WALSH *et al.*, 1995). Os grânulos contêm grande quantidade de mediadores, entre eles estão a triptase, quimase, histamina, serotonina, heparina, IL-16, IL-6, IL-8, prostaglandina. A triptase é o mediador mais abundante na degranulação e atua na inflamação, remodelação tecidual e é considerada um fator angiogênico importante (STONE *et al.*, 2010). A ativação de matriz de metaloproteinases, como quimase e triptase derivados de mastócitos, degradam proteínas estruturais da membrana basal, causando a sua degradação (JOSE *et al.*, 2001). Mastócitos que migraram de vasos sanguíneos no tecido conjuntivo mais profundo para a matriz extracelular, posteriormente migram para a zona subepitelial onde atuam nos vasos sanguíneos e no recrutamento de células inflamatórias para a área lesionada (WALSH, 2003).

Outro grânulo importante na resposta inflamatória secretado principalmente por mastócitos é a histamina. A histamina tem seu efeito mediado por meio de receptores H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e, o mais recentemente descrito, H<sub>4</sub>. O H<sub>4</sub>R está presente em leucócitos, baço, timo e cólon (ODA *et al.*, 2000). Jemima *et al.* (2014) comprovam que receptores

H<sub>4</sub> são expressos em mastócitos e induzem a produção de mediadores inflamatórios não somente em asma, mas também em outras doenças inflamatórias. A atuação dos mastócitos em lesões inflamatórias inclui as lesões bucais e maxilofaciais. Já foi demonstrada a presença de mastócitos em lesões periapicais, granuloma piogênico, gengivite e LPO. O estudo feito por Perrini e Fonzi (1985), já demonstrou que mastócitos estão presentes em lesões periapicais. O estudo avaliou 25 lesões e observou um número elevado de mastócitos na maioria delas.

O estudo feito por Myint *et al.* (2002), avalia a quantidade e a distribuição de mastócitos, neutrófilos e macrófagos em amostras de mucosa de 15 pacientes HIV-positivo comparando a 7 amostras de pacientes HIV-negativo, todos com periodontite crônica. Os resultados mostraram um aumento significativo na quantidade de mastócitos em pacientes HIV-positivo e os autores concluem que essas células aumentadas nesses pacientes predispõem à maior degradação decidual devido aos mediadores inflamatórios e efeitos moleculares. Para contagem dos mastócitos foi utilizada imunohistoquímica com anticorpo para triptase.

O estudo feito por Sharma *et al.* (2011), utilizou a coloração de azul de toluidina para avaliar o papel de mastócitos em lesões de LPO e comparar com reações liquenoide. O estudo analisou 10 casos de LPO, 10 casos de reação liquenoide e comparou com 5 amostras de mucosa normal. Os resultados mostraram um aumento significativo do número de mastócitos nas lesões em relação às amostras de mucosa normal, mas não houve diferença significativa na quantidade de mastócitos no LPO e na reação liquenoide.

Além dessas lesões, já foi descrito que os mastócitos atuam na angiogênese em lesões tumorais como o carcinoma de células escamosas, facilitando a infiltração e metástase (GAJE *et al.*, 2016).

Em lesões inflamatórias, os mastócitos podem ser visualizados por meio de marcadores histoquímicos como o azul de toluidina que cora por metacromasia os grânulos contidos no citoplasma da célula (KRISHNASWAMY, 2001). Outro marcador de presença e desenvolvimento de mastócitos é o receptor de fator de célula-tronco c-kit (CD117), uma vez que é expresso tanto por células progenitoras de mastócitos, mastócitos imaturos e maduros nos tecidos (STEINSVOLL *et al.*, 2004). Embora a expressão do c-kit seja geralmente perdida durante a diferenciação de células

hematopoiéticas, alguns tipos de células diferenciadas, como mastócitos mantêm a expressão desse receptor (Lennartsson et al., 2005).

## 1.2 Reação liquenoide ao amálgama

As reações liquenoides são respostas inflamatórias crônicas que acometem a mucosa oral. Na literatura estão descritas como lesões relativamente frequentes, que acometem cerca de 2,4% da população em geral (ROBLEDO-SIERRA *et al.*, 2013) e são relacionadas a certos medicamentos, materiais restauradores, doença do enxerto *versus* hospedeiro, em pacientes com hepatite C crônica e vacinados contra hepatite B (PEMBERTON *et al.*, 2000). Os locais mais acometidos são mucosa jugal, borda lateral e dorso de língua e mucosa labial. Clinicamente se apresentam na forma de estrias brancas, placas, lesões eritematosas, úlceras ou bolhas assintomáticas. O paciente pode relatar desconforto associado a alimentos condimentados e pimenta e sensação de queimação (GROSSMANN *et al.*, 2015). As lesões associadas a uso prolongado de medicamentos são descritas em pacientes que usam hipoglicêmicos, antiinflamatórios não esteroidais e inibidores de enzima conversora de angiotensina (AL-HASHIMI *et al.*, 2007). A doença do enxerto *versus* hospedeiro é uma frequente complicação em pacientes que foram submetidos a transplante de medula óssea. O sistema imunológico do doador identifica os tecidos do hospedeiro como estranho e ataca os constituintes celulares (SEDGHIZADEH *et al.*, 2004). As manifestações bucais dessa doença são similares a reações liquenoides autoimunes, apresentando em forma de placas e estrias brancas, úlceras e áreas eritematosas (GROSSMANN *et al.*, 2015).

As reações liquenoides mais comuns são as reações alérgicas a materiais restauradores e apresentam prevalência de 2% na população. Estas lesões se apresentam como estrias brancas em mucosa jugal, gengiva e mucosa alveolar, em regiões que estão em contato íntimo com restaurações metálicas com algum grau de oxidação (DUNSCHE *et al.*, 2003). Geralmente se apresentam unilateralmente, a não ser que o paciente apresente restaurações metálicas em ambos os lados, o que dificulta a diferenciação clínica do LPO (ISSA *et al.*, 2004).

Histologicamente, as reações liquenoides apresentam infiltrado inflamatório em banda na lâmina própria, composto predominantemente por linfócitos e, ocasionalmente, plasmócitos. A presença de desorganização da camada de células

basais é bastante frequente. A superfície epitelial pode estar atrófica, ulcerada ou hiperkeratizada, características muito semelhantes ao LPO (STOOPLER *et al.*, 2003). O diagnóstico diferencial das reações liquenoide ao amálgama e o LPO se dá pelo conjunto de aspectos clínicos, histológicos e pela remissão do quadro com a substituição da restauração. O uso do teste de contato para diagnóstico dessas lesões vem sendo discutido na literatura. O estudo feito por Thornhill *et al.* (2003) avalia 81 pacientes com lesões em mucosa oral, sendo que 51 pacientes foram diagnosticados com LPO e 30 pacientes com RLA. Todos os pacientes foram submetidos ao teste de contato e as restaurações metálicas dos pacientes diagnosticados com RLA foram substituídas. Os resultados mostraram que em 93% dos pacientes com RLA, as lesões involuíram com a substituição das restaurações. Dos pacientes com LPO apenas 3,9% responderam ao teste de contato e dos pacientes com RLA, 70% responderam positivamente. Os autores concluem que o teste de contato associado a outros parâmetros clínicos pode auxiliar no diagnóstico dessas lesões.

No estudo publicado em 2013, foram avaliados 102 pacientes com lesões de estrias ou placas brancas em mucosa. Desses pacientes, 51 foram diagnosticados com LPO e pertenciam ao grupo controle e 51 apresentaram algum fator predisponente para reação liquenoide como presença de restaurações de amálgama e uso de medicamentos. O objetivo foi avaliar se há resolutividade do quadro ao se remover o fator causal da reação liquenoide e o tempo demandado para essa resolução. Em 80% dos casos houve remissão total da lesão e em 11% remissão parcial da lesão numa avaliação de 18 meses após a remoção do fator causal (NAGARAJ *et al.*, 2013).

Lartitegui-Sebastián *et al.* (2012) avaliaram 100 pacientes acima de 30 anos de idade no Serviço de Odontologia da Universidade do País Basco. A cavidade oral e as restaurações dos pacientes foram avaliadas e foram realizados testes de alergia nos pacientes. Dos 100 pacientes avaliados, 7 apresentaram RLA, apenas 2 apresentaram resposta positiva ao teste alérgico e 5 lesões involuíram após a substituição das restaurações.

### 1.3 Líquen plano oral

Líquen plano é uma doença mucocutânea, crônica, que afeta entre 1 a 2% da população (DEROSSO; CIARROCCA, 2005). A doença ocorre predominantemente em adultos e tem predileção pelo sexo feminino. Apesar da etiopatogenia não ser bem

definida, acredita-se que esteja associada a alguma disfunção autoimune (LU *et al.*, 2015). O estudo feito por Lavanya *et al.* (2011) descreve o LPO como uma doença autoimune mediada por células T, em que as células TCD8+ desencadeiam a apoptose de células basais, além da expressão de antígenos contra queratinócitos.

Estudo feito por Santoro *et al.* (2005) avalia esse componente imunológico por meio da análise imunoistoquímica de células dendríticas em 16 casos de LPO. O estudo encontrou um aumento significativo de células dendríticas maduras e imaturas em amostras de LPO comparado a valores de referência em mucosa normal.

As variantes clínicas do LPO são reticular, papular, atrófico, bolhoso e erosivo e podem se manifestar na forma de gengivite descamativa, estrias de Wickhan, placas brancas, úlceras ou erosões. Podem estar localizadas em qualquer área da mucosa oral, mas principalmente em mucosa jugal. As principais características histológicas do LPO são a desorganização da camada basal, infiltrado inflamatório denso de linfócitos T em forma de banda, maturação normal do epitélio, proeminências anatômicas com aparência de dentes de serra, corpos de Civatte (colóides) e hiperqueratose (CANTO *et al.*, 2010). O diagnóstico de LPO é dado pelos aspectos clínicos e histológicos da lesão, além do histórico do paciente (MYERS *et al.*, 2002). A maioria dos autores considera importante a exclusão de outras lesões de diagnóstico diferencial por meio da análise histológica (EISEN *et al.*, 2005).

Cortés-Ramírez *et al.* (2014), avaliaram lesões inflamatórias crônicas imunologicamente mediadas, como o LPO e as reações liquenoides. O estudo avaliou 44 amostras de lesões por meio da técnica de imunoistoquímica para expressão do receptor de fator de crescimento epidérmico. Todas as lesões apresentaram aumento da expressão do receptor de crescimento epidérmico, e os autores discutem o potencial de malignização dessas lesões.

#### 1.4 Diferenças entre líquen plano oral e reação liquenoide ao amálgama

A RLA e o LPO são lesões semelhantes clinicamente e histologicamente e, estudos anteriores vêm tentando estabelecer métodos para diferenciação. A maioria dos estudos não especifica qual tipo de reação liquenoide foi avaliada e se está relacionada a algum material específico. Portanto, mais estudos específicos para RLA são necessários. SOUTO *et al.* (2016), avaliando 7 amostras de LPO, 7 amostras de RLA e 7 amostras de mucosa normal, utilizou reação de imunoistoquímica para

marcação de células dendríticas e considerou na quantificação as células presentes no epitélio e na lâmina própria. Foi demonstrado que a quantidade de células dendríticas CD1a+ foi maior em lesões de LPO do que RLA e mucosa normal. Os autores concluem que as células dendríticas podem desempenhar papéis diferentes nas lesões e que a diferença na quantidade de células pode ajudar na distinção dessas lesões.

Outros estudos avaliam as reações liquenoides, mas não identificam se estão relacionadas a restaurações metálicas como o estudo feito por Ghalayani *et al.* (2009) que avalia a quantidade e distribuição de IgG em 30 amostras de LPO e 30 amostras de reação liquenoide por meio de reação imunoistoquímica e os resultados não mostraram diferença significativa entre as lesões. Em outro estudo, Ghalayani *et al.* (A 2012) comparam 50 amostras de LPO, 50 amostras de reação liquenoide e 50 amostras de mucosa normal, avaliando a quantidade de IgG e IgA. Houve diferença significativa entre as lesões e a mucosa normal, mostrando que a quantidade de IgG e IgA nessas lesões está alterada.

O estudo de Prucktrakul *et al.* (2015) avaliou a presença de anticorpos antinucleares circulantes em 23 pacientes diagnosticados com LPO, 20 pacientes com reação liquenoide medicamentosa e em 24 saudáveis, como controle. Os resultados mostraram níveis significativamente elevados nos pacientes com LPO e reação liquenoide medicamentosa em relação ao grupo controle.

Outros estudos mostraram a presença de mastócitos em lesões de LPO e reações liquenoide. Essa diferença na quantidade de mastócitos degranulados em reações liquenoide foi significativamente maior do que em LPO em estudo feito por Ghalayani *et al.* (B 2012). O estudo avaliou 30 amostras de reação liquenoide e 30 amostras de LPO. Foram usadas as técnicas de azul de toluidina para contagem de mastócitos intactos e imunoistoquímica para avaliação de TNF- $\alpha$  para mastócitos degranulados. Segundo os autores, essa diferença poderia ser um parâmetro histológico para diferenciar essas lesões.

Outro estudo avalia a espessura do epitélio e membrana basal, densidade de mastócitos intactos e degranulados e a vascularização em lesões de reação liquenoide e LPO. O estudo utilizou as técnicas de azul de toluidina e PAS para avaliar 20 amostras de LPO, 20 amostras de reação liquenoide e 5 amostras de mucosa normal. Os autores mostraram que tanto a vascularização quanto a quantidade de

mastócitos foram maiores em LPO do que em RLA e concluem enfatizando a importância dos parâmetros de diferenciação histológica (JUNEJA, 2006).

Reddy *et al.* (2012) avaliam a quantidade de eosinófilos, vasos sanguíneos, mastócitos intactos e degranulados em 30 amostras de LPO, 30 amostras de reação liquenoide e 10 amostras de mucosa normal. Este estudo mostra um aumento significativo de mastócitos nas lesões comparados com mucosa normal, também encontra maior quantidade de mastócitos intactos e infiltrado inflamatório em LPO comparado à reação liquenoide. Porém, encontra um aumento de mastócitos degranulados, vasos sanguíneos e eosinófilos nas reações liquenoides em relação ao LPO. Os autores concluem que essas diferenças podem ser usadas como critérios histológicos para distinção das lesões, porém o estudo não avalia as reações liquenoides relacionadas ao amálgama separadamente.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

Avaliar e comparar a densidade e degranulação de mastócitos em amostras de LPO e RLA.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Comparar a densidade de células positivas para c-kit e triptase entre as lesões de LPO e RLA, assim como comparar as lesões com a mucosa normal.
- Comparar a densidade de mastócitos degranulados e não degranulados entre as lesões de LPO e RLA, assim como comparar as lesões com a mucosa normal.
- Comparar a densidade do infiltrado inflamatório entre as lesões de LPO e RLA, assim como comparar as lesões com a mucosa normal.

### 3 METODOLOGIA EXPANDIDA

#### 3.1 Submissão ao Comitê de Ética e cálculo amostral

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais com parecer número 2.361.404. Para o cálculo amostral foi utilizado o estudo prévio de Ramalingam *et al.* (2018) que comparou a densidade de mastócitos entre LPO e reações liquenoides. Os dados mostraram uma diferença média entre os grupos de 7,2 e o maior valor de desvio padrão de 5,16. Foi utilizado o software Power e Sample Size Calculation (PS, version 3.0, Nashville, TN, EUA). Levando em consideração um alfa =0,05 e o poder de teste de 80%, a amostra mínima requerida foi de 6 indivíduos em cada grupo para rejeitar a hipótese nula de nenhuma diferença entre os grupos.

#### 3.2 Obtenção da amostra

Foram utilizadas 19 amostras obtidas do arquivo do Serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG. Seis amostras diagnosticadas clinicamente e histologicamente como LPO, sete amostras de RLA e 6 amostras de mucosa normal como controle. Após revisão das lâminas por dois patologistas experientes, os espécimes fixados em solução de formaldeído a 10% e incluídos em parafina, foram submetidos a cortes histológicos para confecção das lâminas de vidro. Foram excluídas amostras que não apresentavam material suficiente.

As lesões que apresentavam características clínicas e histopatológicas compatíveis com os critérios de diagnóstico foram incluídas no estudo. Foram utilizados os critérios clínicos da Academia Americana de Patologia Oral e Maxilofacial para inclusão de lesões com diagnóstico de LPO (CHENG *et al.*, 2016). Foram incluídas lesões que clinicamente apresentavam distribuição multifocal e simétrica, lesões leucoplásicas ou eritroplásicas, com apresentação reticular/papular, atrófica, erosiva, placa ou bolhosa. A RLA é diferenciada clinicamente do LPO pela íntima relação com uma restauração metálica e pela tendência de ser localizada e assimetricamente distribuída (DEROSSI; CIARROCCA, 2005). Os critérios histológicos de inclusão do LPO e da RLA são a presença de infiltrado inflamatório predominantemente linfocítico na interface do epitélio com a lâmina própria, degeneração liquefativa das células basais, exocitose linfocítica, ausência de displasia epitelial e ausência de alteração epitelial verrucosa (CHENG *et al.*, 2016).

Seis amostras de mucosa normal recobrando terceiros molares totalmente inclusos e com indicação para exodontia foram coletadas e usadas como controle. Amostras apresentando algum grau de inflamação foram excluídas do estudo.

### 3.3 Coloração com azul de toluidina

Foram feitos cortes de 4 $\mu$ m nos blocos de parafina que foram submetidos à despafinização e à desidratação. Posteriormente, foi feita a coloração utilizando-se azul de toluidina a 0,3%. O azul de toluidina cora de azul as estruturas do tecido e, por metacromasia, os grânulos dos mastócitos (SHARMA *et al.*, 2011). A densidade de mastócitos foi determinada pelo número de células por mm<sup>2</sup> através da contagem de mastócitos que apresentaram o núcleo claramente visível. Para análise da densidade de células positivas/mm<sup>2</sup>, as amostras foram escaneadas utilizando o sistema da Zeiss (Pannoramic MIDI II, 3DHistech, Budapest, Hungary). As imagens digitalizadas foram utilizadas para medida da área obtida em um aumento de 400x através do software Pannoramic viewer (versão 1.15.4, 3DHistech, Budapest, Hungary) e a contagem de células foi feita manualmente utilizando-se o software Image J (versão 1.45 National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Os mastócitos foram quantificados em toda extensão do tecido conjuntivo da lâmina própria. A avaliação foi realizada na região da banda subepitelial (A) e abaixo da banda subepitelial (B), e foi obtida a densidade de mastócitos/mm<sup>2</sup>. A porcentagem de mastócitos degranulados foi obtida utilizando os critérios de Ghalayani *et al.* (2012). Os mastócitos foram categorizados em dois grupos:

1 – Degranulados: mastócitos com núcleo evidente, metacromasia menos intensa, pouco corados ou presença de grânulos do lado de fora da célula, próximo da membrana celular.

2 – Intactos: metacromasia intensa e sem extrusão de grânulos para fora da célula.

As análises foram realizadas por um examinador calibrado com intervalo de 15 dias entre as avaliações e, em seguida, foi realizado teste ICC para avaliação da concordância.

### 3.4 Imunoistoquímica

A partir dos blocos de parafina, foram confeccionadas duas lâminas para análise imunoistoquímica. As reações de imunoistoquímica foram feitas usando o

método indireto. Os mastócitos foram marcados pelos anticorpos anti-c-kit e anti-triptase.

Foram obtidos, a partir de blocos de parafina, cortes histológicos de 3µm de espessura, sendo estes estendidos sobre lâminas previamente gelatinizadas e colocados em estufa a 55°C durante 24 horas. Os cortes foram desparafinizados em banhos de xilol: um de 24 horas e outro de 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram hidratados em banhos decrescentes de etanol (100%, 90% e 70%) por 5 minutos cada. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em soluções apresentadas na tabela 1 e incubadas em banho maria (ManttraInc, Índia) por 30 minutos, à 98°C. Após a recuperação antigênica, essas lâminas foram mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente para resfriar, e posteriormente lavadas em cinco banhos de água destilada.

Tabela 1- Anticorpos primários utilizados, diluição, temperatura e tempo de incubação, agente de recuperação antigênica.

<b><i>Anticorpo (Clone)</i></b>	<b><i>Diluição</i></b>	<b><i>Temperatura de incubação/ tempo</i></b>	<b><i>Agente de recuperação / pH</i></b>
<b>c-kit (clone A4502)<sup>1</sup></b>	1:200	Ambiente/ 1 hora	Ácidocítrico/ pH:6,0 <sup>3</sup>
<b>triptase (clone G3)<sup>2</sup></b>	1:500	Ambiente/ 1 hora	Ácidocítrico/ pH:6,0 <sup>3</sup>

<sup>1</sup>(Dako, Carpinteria, CA, EUA); <sup>2</sup>(Cell Marque, Hot Springs, AR, EUA); <sup>3</sup>(LabSynth, Diadema, SP, Brazil)

A inibição da peroxidase endógena foi realizada com peróxido de hidrogênio 0,3% (Spring bioscience, Pleasanton, CA, USA) em um banho de 10 minutos e, em seguida, as lâminas foram lavadas com cinco banhos de água destilada. Em seguida, as lâminas foram incubadas em três banhos de solução tampão com 2,42g de TRIS (hidroximetil amino metano) P.A. (Nuclear, São Paulo, Brasil, código 318768) e 8,5 g de cloreto de sódio P.A. (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil, código 106) em 1000 mL de água destilada (TRIS-HCL), pH 7,4 por cinco minutos. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários monoclonais cujas diluições, temperaturas e tempo de incubação encontram-se dispostos na tabela 1. Após a incubação com

anticorpo primário, os cortes foram submetidos a três banhos de solução tampão TRIS-HCL, pH 7,4 e incubação com o anticorpo secundário, seguido pelo complexo terciário usando o sistema Reveal (Spring bioscience, Pleasanton, CA, EUA) à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos e lavagem em três banhos em solução tampão TRIS-HCL, pH 7,4 após o anticorpo secundário e terciário. A revelação da reação foi executada com sistema de substrato cromógeno constituído de uma gota de DAB-cromógena (3,3' diaminobenzidina em solução) em 1mL de substrato tamponado (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 2 minutos. Após a lavagem com 5 banhos de água destilada, a contra coloração foi realizada com solução de hematoxilina de Mayer por 40 segundos. Os cortes foram desidratados em soluções de etanol em concentrações crescentes: 70%, 90% e 100% por cinco minutos e mais duas vezes a 100% por dez minutos, diafanizados em um banho de cinco minutos e outro de dez minutos em xilol. As lâminas foram montadas com lamínulas de vidro e Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA).

### 3.5 Análise da imuno-expressão e contagem das células

A análise da imuno-expressão de c-kit e triptase foi feita em toda a extensão da lâmina própria. A avaliação foi realizada na região da banda subepitelial (A) e abaixo da banda subepitelial (B) e foram obtidas as densidades/mm<sup>2</sup>. Para análise da densidade de células positivas/mm<sup>2</sup> as amostras foram escaneadas utilizando o sistema da Zeiss (Pannoramic MIDI II, 3DHistech, Budapest, Hungary). As imagens digitalizadas foram utilizadas para medida da área obtida em um aumento de 400x através do software Pannoramic viewer (versão 1.15.4, 3DHistech, Budapest, Hungary) e a contagem de células foi feita manualmente utilizando-se o software Image J (versão 1.45 National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). A avaliação quantitativa da imunomarcação foi realizada por um observador calibrado e, 15 dias após, a contagem foi novamente realizada. Em seguida, foi realizado teste de correlação intraclasses para avaliação da concordância entre as avaliações. A intensidade de expressão foi comparada entre as lesões.

### 3.6 Análise da inflamação

A avaliação quantitativa do infiltrado inflamatório foi realizada por um observador calibrado e, 15 dias após, a contagem foi novamente realizada. Em seguida, foi realizado teste ICC para avaliação da concordância entre as avaliações. As células inflamatórias do infiltrado foram contadas em toda a lâmina própria, na

região A e B, em cortes corados em HE e obtida a média de densidade de células por  $\text{mm}^2$ . As amostras foram escaneadas utilizando o sistema da Zeiss (Pannoramic MIDI II, 3DHistech, Budapest, Hungary). As imagens digitalizadas foram utilizadas para medida da área obtida em um aumento de 400x através do software Pannoramic viewer (versão 1.15.4, 3DHistech, Budapest, Hungary) e a contagem de células foi feita manualmente utilizando-se o software Image J (versão 1.45 National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Os valores de densidade do infiltrado inflamatório foram comparados entre os grupos.

### 3.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o software SPSS (versão 17.0, Chicago, IL, USA). As avaliações de normalidade usando o teste Shapiro-Wilk foram realizadas. Em amostras com distribuição normal foram aplicados os testes teste-t de Student. Significância estatística foi alcançada quando os valores de P foram  $<0,05$ . Em amostras com distribuição não-normal foram aplicados os testes Kruskal–Wallis, e após correção de Bonferroni, significância estatística foi alcançada quando os valores de P foram  $<0,016$ . Nas amostras não-normais foram aplicados os testes Mann-Whitney U.

A confiabilidade das medidas foi obtida pelo teste de ICC. Uma ótima correlação foi obtida para um  $\text{ICC} > 0.91$ ; uma boa correlação para  $0.71 < \text{ICC} < 0.91$ ; moderada para  $0.51 < \text{ICC} < 0.71$ ; correlação ruim para  $0.31 < \text{ICC} < 0.51$  e péssima correlação para  $\text{ICC} < 0.31$  (BRESSENOT *et al.*, 2015).

## 4 ARTIGO

### Avaliação de mastócitos em reação liquenoide ao amálgama e líquen plano oral

#### Mastócitos, reação liquenoide e líquen plano

##### Resumo

**Objetivo:** avaliar a densidade e a degranulação de mastócitos, assim como avaliar a densidade do infiltrado inflamatório na RLA e LPO.

**Materiais e métodos:** O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. Treze casos de RLA e LPO, com diagnóstico clínico e histopatológico, foram obtidos do arquivo do Serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG. Seis fragmentos de mucosa oral normal foram utilizados como controle. Os cortes histológicos foram submetidos às reações de azul de toluidina e imunohistoquímica para anti-c-kit e anti-triptase.

**Resultados:** Maior densidade de mastócitos marcados por anti-c-kit, anti-triptase e azul de toluidina foi encontrada nas lesões comparadas à mucosa normal ( $p < 0,05$ ). Foi também observado um aumento da densidade do infiltrado inflamatório mononuclear na região A da RLA em comparação ao LPO ( $p < 0,05$ ).

**Conclusão:** Mastócitos são células importantes na etiopatogênese do RLA e LPO, entretanto, a avaliação quantitativa destas células não é um parâmetro consistente para diferenciar as lesões.

**Palavras-chave:** Mastócitos. Líquen plano, Oral. Reação liquenoide.

## INTRODUÇÃO

Líquen plano oral (LPO) é uma doença inflamatória crônica, mucocutânea, que afeta cerca de 1 a 2% na população no mundo. As lesões ocorrerem em mucosa oral e podem também envolver lesões em pele <sup>1</sup>. Apesar da etiopatogênese não ser bem esclarecida, a lesão pode estar associada a uma disfunção autoimune mediada por células T. Clinicamente o LPO apresenta diferentes formas, como: reticular, papular, atrófica, bolhosa e erosiva. A análise histológica mostra epitélio orto ou paraqueratinizado, desorganização da camada basal e infiltrado inflamatório linfocítico em banda na lâmina própria <sup>2</sup>. Histologicamente, o LPO é semelhante à reação liquenoide ao amálgama (RLA), porém, a etiopatogênese da RLA está relacionada ao íntimo contato com restaurações metálicas com algum grau de oxidação. RLA e LPO são também semelhantes clinicamente. O diagnóstico diferencial entre essas duas lesões baseado em características clínicas e histológicas é um desafio.

Mastócitos estão presentes em lesões imunomediadas como LPO e RLA. Estas células, originadas da medula óssea, liberam grânulos quando ativadas pelo sistema imune. O processo de degranulação de mastócitos é responsável por estimular ou inibir células vizinhas <sup>3</sup>. A Triptase é o mediador mais abundante na degranulação e age na inflamação, remodelação tecidual e é considerada um importante fator angiogênico <sup>4</sup>. A ativação da matriz de metaloproteinases, como quimase e triptase derivadas de mastócitos, levam à degradação de proteínas estruturais da membrana basal, causando sua desorganização <sup>5</sup>. C-kit é um receptor expresso por variados tipos celulares, como precursores hematopoiéticos, melanócitos e mastócitos <sup>6,7</sup>. Ao nosso conhecimento, a literatura não mostra especificamente os tipos de reação liquenoide na avaliação da degranulação de mastócitos. A avaliação das diferenças na densidade e degranulação de mastócitos pode ser útil na diferenciação destas

lesões. Além disso, o entendimento do papel dos mastócitos na etiopatogênese de ambas as lesões pode contribuir para o desenvolvimento de futuras terapias voltadas para lesões autoimunes, como o LPO. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a densidade e a degranulação de mastócitos, assim como avaliar a densidade do infiltrado inflamatório na RLA e no LPO.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil, sob protocolo número 2.361.404. Os princípios estabelecidos pela Declaração de Helsinki para pesquisa com seres humanos foram seguidos. Amostras incluídas em parafina com diagnóstico clínico e histopatológico de LPO e RLA foram obtidas do arquivo do Serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da UFMG. Os critérios de inclusão para LPO de acordo com a Academia Americana de Patologia Oral e Maxilofacial foram os seguintes: lesões multifocais e simétricas, lesões leucoplásicas ou eritroplásicas, podendo apresentar-se de forma reticular, placa, atrófica, erosiva, pápula ou bolhosa. Clinicamente o LPO pode ser diferenciado da RLA que apresenta íntima relação com restauração metálica e tendência de ser focal e ter distribuição assimétrica <sup>8</sup>. Os critérios de inclusão histológicos foram a presença de infiltrado inflamatório linfocítico em banda, desorganização das células da camada basal, exocitose linfocítica, ausência de displasia epitelial e ausência de alteração epitelial verrucosa (Figura 1A e 1B) <sup>2</sup>. Após a substituição das restaurações, o diagnóstico clínico de RLA foi confirmado pela remissão de lesões residuais da biópsia incisional <sup>9</sup>. Amostras de mucosa oral normal (MON) que recobriam terceiros molares impactados com indicação de exodontia foram utilizadas como controle.

## **Cálculo amostral**

O cálculo amostral foi realizado utilizando dados de estudo prévio <sup>10</sup>. O tamanho da amostra foi determinado utilizando o programa *Power and Sample Size Calculation* (PS, versão 3.0, Nashville, TN, USA). Os dados de estudo prévio comparando densidade de células em LPO e reações liquenoides indicaram uma diferença média entre os grupos de 7,02 e desvio padrão de 5,16. Considerando um alfa =0,05 e poder de teste de 80%, a amostra mínima requerida foi de seis indivíduos em cada grupo para rejeitar a hipótese nula de que não há diferença entre os grupos.

### **Avaliação do infiltrado inflamatório**

Cortes corados em hematoxilina e eosina (HE) foram utilizados para análise do infiltrado inflamatório. As lâminas coradas em HE foram escaneadas utilizando um escaner automático digital (Pannoramic MIDI II, 3DHistech, Carl Zeiss Vision GmbH, Gottingen, Germany). As imagens escaneadas foram utilizadas para medida da área. Foi utilizado o programa Image J (versão 1.45 National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) para contagem manual do infiltrado inflamatório mononuclear na lâmina própria em um aumento de 400x. A avaliação quantitativa da imunoexpressão e da marcação do azul de toluidina foi realizada utilizando o mesmo programa. A contagem das células do infiltrado inflamatório e das células marcadas por imunohistoquímica e azul de toluidina foi realizada por um observador calibrado em dois momentos diferentes. A confiabilidade das medidas foi acessada pelo coeficiente de correlação intraclassa (CCI).  $CCI > 0,91$  indicava correlação muito boa;  $0,71 < CCI < 0,91$  indicava correlação boa;  $0,51 < CCI < 0,71$  indicava correlação moderada;  $0,31 < CCI < 0,51$  indicava correlação baixa e  $CCI < 0,31$  correlação muito baixa <sup>11</sup>.

### **Coloração e análise do azul de toluidina**

Cortes histológicos (4µm de espessura) foram obtidos dos blocos de parafina e utilizados para coloração com azul de toluidina. Os cortes foram desparafinizados, hidratados e subsequentemente corados com azul de toluidina a 0,3%. Os cortes foram lavados, desidratados, diafanizados e montados com lamínulas de vidro e *Permount* (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA). O azul de toluidina cora as estruturas do tecido e, por metacromasia, os grânulos dos mastócitos <sup>12</sup>. A densidade de mastócitos foi determinada por mm<sup>2</sup> pela contagem de células com núcleo visível. Os mastócitos foram quantificados no tecido conjuntivo da lâmina própria. A avaliação foi realizada na região da banda subepitelial (A) e na região abaixo da banda subepitelial (B). A densidade de mastócitos por mm<sup>2</sup> foi obtida (Figura 2A). A densidade de mastócitos degranulados (Figura 2B) foi obtida utilizando o critério de Ghalayani *et al.* (2012) <sup>13</sup>.

### **Imunohistoquímica e análise da imunoexpressão**

Dois cortes histológicos (3µm de espessura) foram obtidos dos blocos de parafina e utilizados para marcação anti-c-kit e anti-triptase. A imunohistoquímica foi realizada utilizando o método indireto. Os cortes histológicos foram desparafinizados e hidratados. A recuperação antigênica foi realizada utilizando solução citrato a 10mM (pH 6,0, 30 minutos à 98°C). O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com um banho em peróxido de hidrogênio a 0,3% por 10 minutos. Na sequência, os cortes foram incubados com anticorpos para c-kit (Dako, Carpinteria, CA, EUA) e triptase (Cell Marque, Hot Springs, AR, EUA) em diluição de 1:200 e 1:500 respectivamente, por uma hora à temperatura ambiente. A detecção foi realizada utilizando o sistema LSAB, Kit HRP Peroxidase (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA, K0690) e substrato cromógeno constituído de uma gota de DAB-cromógena (3,3' diaminobenzidina em solução) em 1mL de substrato tamponado (Dako, Carpinteria,

CA, EUA) por 2 minutos. Hematoxilina de Mayer foi utilizada para contracoloração. Os cortes foram desidratados, diafanizados e montados em lâminulas de vidro e *Permount* (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA).

A análise da imunexpressão de c-kit e triptase foi realizada considerando toda a extensão da lâmina própria, incluindo as regiões A e B.

### **Análise estatística**

O programa *Statistical Package for the Social Sciences* - SPSS (IBM Inc, version 17.0 Chicago, IL, USA) foi utilizado para análise estatística. Foram coletadas informações de idade e sexo dos participantes, assim como sítio da coleta do tecido e, em seguida, realizada análise descritiva. Foram realizadas comparações entre os grupos LPO, RLA e MON das variáveis quantitativas: densidade de mastócitos degranulados, não-degranulados e mastócitos totais (azul de toluidina), células positivas para c-kit, triptase e densidade de células do infiltrado inflamatório mononuclear (HE). O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para determinar se os dados quantitativos apresentavam distribuição normal ou não-normal. Em amostras com distribuição normal, o teste t de Student foi utilizado para comparação das médias. Em amostras com distribuição não-normal, o teste Mann-Whitney U foi utilizado. Foi considerada significância estatística ( $\alpha$ ) valores menores que 0,05. Utilizando a coloração de azul de toluidina, foram realizadas comparações da densidade de mastócitos degranulados, não-degranulados e mastócitos totais entre as amostras de LPO, RLA e MON considerando as regiões A, B e toda lâmina própria. Para a análise da expressão de c-kit e triptase, foram feitas comparações das densidades de células marcadas entre as amostras de LPO, RLA e MON considerando as regiões A, B e toda lâmina própria. Também foram realizadas comparações entre a densidade do

infiltrado inflamatório mononuclear em amostras de LPO, RLA e MON considerando as regiões A, B e toda lâmina própria.

## RESULTADOS

A contagem de células nos cortes histológicos foi realizada por um examinador (MSN) em dois tempos diferentes, com intervalo de duas semanas. A confiabilidade das medidas foi acessada e o coeficiente de correlação intraclasse foi de 0,99.

Os dados clínicos dos participantes são apresentados na Tabela I. A média de idade dos indivíduos com LPO foi de 63,1 ( $\pm 9,3$ ) anos. Para os indivíduos com RLA, a média de idade foi de 48,6 ( $\pm 15,1$ ) anos e para os doadores de MON, a média de idade foi de 25,5 ( $\pm 7,7$ ) anos. Características histopatológicas do LPO incluíram desorganização das células da camada basal, infiltrado inflamatório em banda, exocitose linfocítica, ausência de displasia epitelial e ausência de alteração epitelial verrucosa (Figura 1B). Em algumas lâminas de RLA, foi possível observar formações de folículos linfoides entremeando o infiltrado inflamatório linfocítico denso (Figura 1A).

A análise do azul de toluidina mostrou diferença significativa entre LPO e MON assim como entre RLA e MON para densidade total de mastócitos e para mastócitos degranulados. A densidade média total e de mastócitos degranulados foi maior em LPO e RLA comparado à MON ( $p < 0,05$ ). Foi também observada diferença estatisticamente significativa em mastócitos não-degranulados entre LPO e MON. A densidade média de mastócitos não-degranulados foi maior no LPO comparado à MON ( $p < 0,05$ ) (Tabela II). A figura 2A ilustra a marcação de azul de toluidina e, a figura 2B ilustra mastócitos degranulados e não-degranulados.

As figuras 3A e 3B ilustram a identificação de células positivas para c-kit e as figuras 4A e 4B ilustram a identificação de células positivas para triptase. Na avaliação

do c-kit, a densidade média do número total de mastócitos e a densidade média de mastócitos na lâmina própria no LPO foi maior em comparação à MON ( $p < 0,05$ ). Assim como a densidade média de mastócitos na lâmina própria nos casos de RLA foi maior comparado à MON ( $p < 0,05$ ). Em relação à triptase, a densidade média de mastócitos na lâmina própria para o LPO foi maior comparado à densidade média na MON ( $p < 0,05$ ). A densidade média de mastócitos na lâmina própria foi maior na RLA comparado à MON ( $p < 0,05$ ) (Tabela III).

A tabela IV mostra os resultados das comparações entre LPO, RLA e MON para a densidade média de células do infiltrado inflamatório mononuclear. A densidade média do total das células inflamatórias mononucleares foi maior no LPO e na RLA comparado à MON ( $p < 0,05$ ). A densidade média das células do infiltrado inflamatório mononuclear na Região A do LPO foi maior em relação à RLA ( $p < 0,05$ )

## **DISCUSSÃO**

RLA e LPO são semelhantes clinicamente e histologicamente, exceto pela presença do amálgama. Uma vez que RLA está diretamente relacionada ao amálgama, acredita-se que a etiopatogênese das lesões seja diferente. A literatura mostra que o LPO pode ter origem autoimune, mas ainda não é totalmente esclarecido. Já foi demonstrado que células dendríticas são células importantes na resposta imune inata e desempenham papel importante na etiopatogênese do LPO. Estas células são encontradas em maior densidade na RLA comparado à MON <sup>14</sup>. No presente estudo, foi hipotetizado que haveria um aumento na densidade de mastócitos na RLA e no LPO. Além disso, haveria diferença entre as duas lesões, sendo que a RLA teria maior densidade de mastócitos, uma vez que se trata de uma reação alérgica ao amálgama <sup>8</sup>. Os mastócitos e sua degranulação desempenham papel importante no processo alérgico <sup>15</sup>. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a

densidade de mastócitos e sua degranulação, assim como avaliar a densidade do infiltrado inflamatório mononuclear em RLA e LPO.

No presente estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre LPO e RLA para a densidade de mastócitos marcados pelo c-kit, triptase e azul de toluidina. Estudos prévios avaliaram mastócitos em ambas as lesões <sup>(5,10,12,16,17)</sup>. Entretanto, nenhum estudo avaliou esses parâmetros separadamente na RLA. Os resultados do presente estudo foram similares ao de Sharma *et al.* (2011) e Balci *et al.* (2016) <sup>(12, 16)</sup> que avaliaram LPO e reações liquenoides, mas não especificamente em lesões relacionadas ao amálgama. Em contraposição, Juneja, em 2006 <sup>17</sup>, observou que o grupo LPO mostrou número total de mastócitos maior em relação aos três grupos (LPO, reações liquenoides e MON) e encontrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos LPO e reações liquenoides. Além disto, os autores encontraram que o grupo LPO apresentou maior quantidade de mastócitos degranulados comparado ao grupo de reações liquenoides e a quantidade média de mastócitos intactos foi menor no LPO em relação às reações liquenoides. A diferença, porém, não foi estatisticamente significativa, assim como no presente estudo. No estudo de JUNEJA, não foram avaliadas as expressões de c-kit e triptase.

Foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão de todos os marcadores de mastócitos entre LPO e MON e entre RLA e MON. Corroborando os achados publicados na literatura <sup>18</sup>, nosso estudo mostrou maior degranulação de mastócitos no LPO comparado à MON. Mesmo não havendo diferença entre as lesões, os mastócitos são importantes na etiopatogênese de ambas as lesões. Mastócitos têm papel importante no LPO, porém a avaliação destas células no LPO e RLA ainda é limitada, comprovando o ineditismo do presente estudo.

Além disso, células do infiltrado inflamatório mononuclear foram contadas a fim de analisar a morfologia das lâminas em HE. Mesmo não sendo possível caracterizar qualitativamente as células do infiltrado inflamatório por meio de marcadores específicos, um aumento da densidade de células do infiltrado inflamatório mononuclear foi observado na RLA comparado ao LPO. A possível justificativa é pelo fato de que foram observados folículos linfoides devido ao número expressivo de linfócitos nos folículos <sup>19</sup>. A presença desses folículos linfoides na RLA já foi demonstrada em estudo prévio do nosso grupo <sup>14</sup>. O ligante c-kit é um precursor de fator de crescimento hematopoiético e a utilização desse anticorpo mostra marcação citoplasmática e de membrana em mastócitos <sup>16</sup>. Triptase é um fator pro-angiogênico que pode ser secretado posteriormente à ativação do c-kit <sup>6</sup>. Acreditava-se que a quantidade média de marcação de c-kit e triptase seria diferente devido à natureza dos anticorpos. Uma vez que triptase é o mediador mais abundante dos mastócitos, o anti-triptase marcaria uma quantidade diferente de mastócitos degranulados <sup>4</sup>. Os resultados, porém, não mostraram diferença estatisticamente significativa.

É possível concluir que não há diferença entre densidade de mastócitos entre LPO e RLA, porém o aumento de mastócitos em relação à MON mostra que estas células desempenham papel importante na etiopatogênese de ambas as lesões. A diferenciação do LPO e RLA é um aspecto importante na rotina de laboratório de patologia e a análise quantitativa das células do infiltrado inflamatório mononuclear pode ser um fator promissor para diferenciação das lesões. Além disso, estudos que possibilitem o desenvolvimento de metodologias de análise do infiltrado inflamatório por meio de programas de contagem automática são importantes, uma vez que os resultados podem ser úteis para o patologista oral e maxilofacial no diagnóstico acertado de ambas as lesões.

### **Conflitos de interesse**

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse.

### **Contribuição dos autores**

M. Noronha e G. Souto trabalharam no desenho do estudo e executaram os experimentos. M.C. Aguiar e A. Batista revisaram os casos. M. Noronha, L. Abreu e R. Mesquita analisaram os dados e escreveram o artigo. Todos os autores leram o artigo e aprovam a sua submissão.

**FIGURA 1: (A)** Reação liquenoide ao amálgama e **(B)** líquen plano oral, ambos mostrando infiltrado inflamatório linfocítico em banda abaixo do epitélio (hematoxilina-eosina, aumento original x50).

**FIGURA 2: (A)** Líquen plano oral mostrando infiltrado inflamatório linfocítico em banda abaixo do epitélio (azul de toluidina, aumento original x50) e **(B)** seta preta indicando mastócito não-degranulado e seta vermelha indicando mastócito degranulado (azul de toluidina, aumento original x400).

**FIGURA 3: (A)** Marcação imunohistoquímica para c-kit em líquen plano oral (aumento original x50) e **(B)** marcação imunohistoquímica para c-kit em líquen plano oral mostrando mastócitos (aumento original x200).

**FIGURA 4: (A)** Marcação imunohistoquímica para triptase em líquen plano oral e **(B)** marcação imunohistoquímica para triptase em líquen plano oral mostrando mastócitos (aumento original x200).

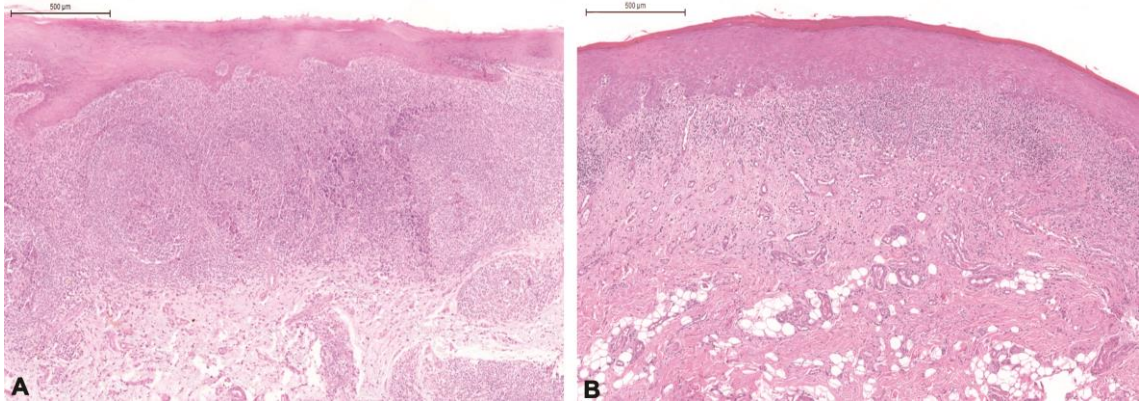


Figura 1

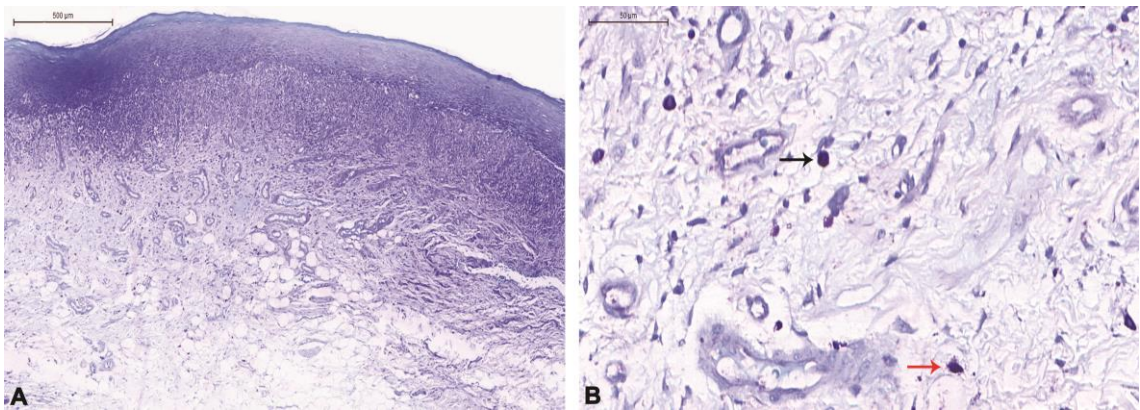


Figura 2

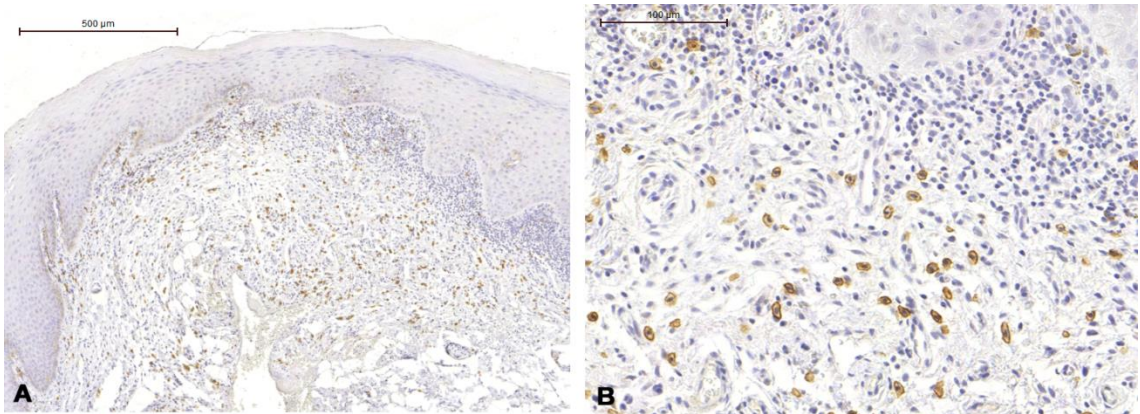


Figura 3

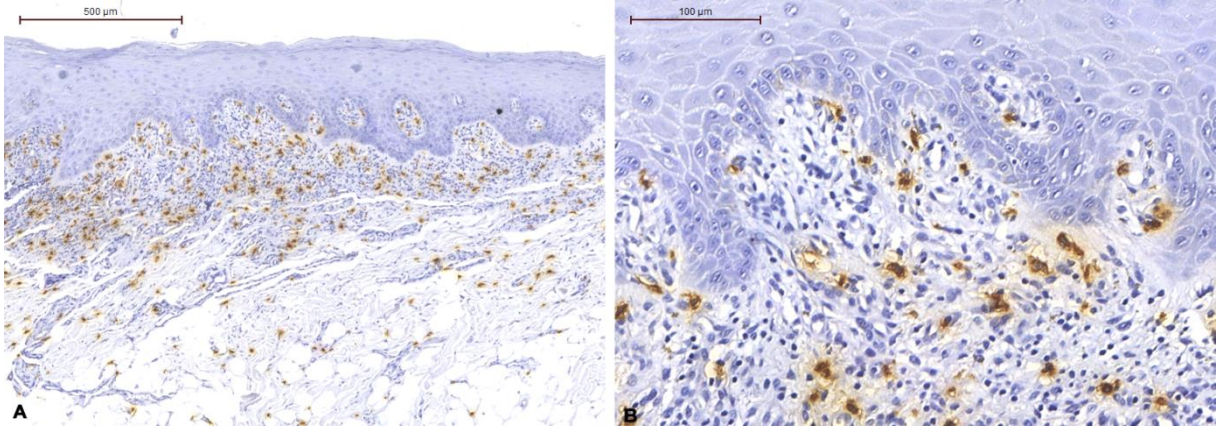


Figura 4

**Tabela 1-** Dados clínicos dos indivíduos e sítio da coleta dos tecidos

	Sexo	Idade (anos)	Sítio
Líquen	M	78	Mucosa jugal bilateral
plano oral	F	58	Mucosa jugal bilateral
(n=6)	M	53	Mucosa jugal bilateral
	M	66	Mucosa jugal bilateral
	M	56	Mucosa jugal bilateral
	F	68	Mucosa jugal bilateral
Reação	F	38	Mucosa jugal do lado direito
liquenoide	F	77	Mucosa jugal do lado esquerdo
ao	F	34	Mucosa jugal do lado esquerdo
amálgama	F	50	Mucosa jugal do lado direito
(n=7)	F	17	Gengiva
	F	47	Mucosa jugal bilateral
	M	46	Mucosa jugal do lado esquerdo
Mucosa oral	M	23	Mucosa normal recobrindo terceiro molar
normal	F	23	Mucosa normal recobrindo terceiro molar
(n=6)	F	23	Mucosa normal recobrindo terceiro molar
	F	27	Mucosa normal recobrindo terceiro molar
	M	-	Mucosa normal recobrindo terceiro molar
	F	40	Mucosa normal recobrindo terceiro molar

**Tabela 2-** Densidade média de mastócitos degranulados e não-degranulados em LPO, RLA e MON na lâmina própria, região A e região B.

	Densidade média (cels/mm <sup>2</sup> )		
	LPO	RLA	MON
	Média±DP	Média±DP	Média±DP
<b>Azul de toluidina</b>			
Mastócitos degranulados e não-degranulados			
Lâmina própria	124,5 ±54,5 <sup>1</sup>	81,5 ±43,2 <sup>2</sup>	25,8 ±15,3
Região A	123,1 ±96,2	86,8 ±52,9	-
Região B	130,3 ±55,5	87,6 ±66,8	-
Mastócitos degranulados			
Lâmina própria	101,2 ±43,4 <sup>1</sup>	58,4 ±29,5 <sup>2</sup>	17,2 ±9,1
Região A	103,6 ±81,1	65,9 ±41,0	-
Região B	104,3 ±54,1	60,7 ±61,4	-
Mastócitos não-degranulados			
Lâmina própria	22,7 ±12,9 <sup>3</sup>	23,0 ±23,2	8,6 ±8,2
Região A	19,4 ±16,9	20,8 ±23,8	-
Região B	25,9 ±9,4	26,8 ±23,7	-

<sup>1</sup>p<0,05 Teste *t student* entre LPO e MON

<sup>2</sup>p<0,05 Teste *t student* entre RLA e MON

<sup>3</sup>p<0,05 Teste *Mann Whitney* entre LPO e MON

**Tabela 3-** Densidade média de células marcadas por c-kit e triptase em LPO, RLA e NOM, na região A, região B e lâmina própria.

	Densidade média (cels/mm <sup>2</sup> )		
	LPO	RLA	MON
	Média ±DP	Média ±DP	Média ±DP
<b>C-KIT</b>			
Região A	74,83±43,97	75,33±22,08	-
Região B	74,33±49,51	62,17±27,79	-
Lâmina própria	78,17±40,33 <sup>1</sup>	67,00±15,13 <sup>2</sup>	17,00±16,19
<b>TRIPTASE</b>			
Região A	236,9 ±73,8	251,4 ±128,6	-
Região B	130,8 ±65,7	128,4 ±668	-
Lâmina própria	195,0 ±56,0 <sup>1</sup>	171,5 ±79,3	94,2 ±59,9

<sup>1</sup>p<0,05 Teste *t student* entre LPO e MON

<sup>2</sup>p<0,05 Teste *t student* entre RLA e MON

**Table 4-** Densidade média das células do infiltrado inflamatório mononuclear em LPO, RLA e MON, na região A, região B e lâmina própria.

	Densidade média (cels/mm <sup>2</sup> )		
	LPO	RLA	MON
	Média ±DP	Média ±DP	Média ±DP
HE			
Lâmina própria	768,6 ±240,0 <sup>1</sup>	1228,9 ±518,0 <sup>2</sup>	15,5 ±15,2
Região A	1740,3 ±491,6 <sup>3</sup>	2812,2 ±866,3	-
Região B	95,3 ±64,8	170,6 ±100,2	-

<sup>1</sup>p<0,05 Teste *t student* entre LPO e MON

<sup>2</sup>p<0,05 Teste *t student* entre RLA e MON

<sup>3</sup>p<0,05 Teste *t student* entre LPO e RLA

## REFERÊNCIAS

- 1- Kurago ZB. Etiology and pathogenesis of oral lichen planus: an overview. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016; Jul;122(1);72-80.
- 2- Cheng YS, Gould A, Kurago Z, Fantasia J, Muller S. Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016; 122(3); 332-54.
- 3- Walsh L.J., Davis M.F., Xu L.J., Savage N.W. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. *J Oral Pathol Med.* 1995; 24(6); 266-72.
- 4- Stone K.D., Prussin C., Metcalfe D.D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(5); 73-80.
- 5- Jose M., Raghu A.R., Rao N.N. Evaluation of mast cells in oral lichen planus and oral lichenoid reaction. *Indian J Dent Res.* 2001;12(3).
- 6- Marech I, Ammendola M, Leporini C, Patruno R, Luposella M, Zizzo N, Passantino G, Sacco R, Farooqi AA, Zuccalà V, Leo S, Dentamaro R, Porcelli M, Gadaleta P, De Sarro G, Gadaleta CD, Ranieri G. C-Kit receptor and tryptase expressing mast cells correlate with angiogenesis in breast cancer patients. *Oncotarget.* 2017 Dec 22;9(8):7918-7927.
- 7- Oliveira-Neto HH, Leite AF, Costa NL, Alencar RC, Lara VS, Silva TA, Leles CR, Mendonça FE, Batista AC. Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: possible failure in the migration of these cells. *Oral Oncol.* 2007 May;43(5):484-90.
- 8- Montebugnoli L, Venturi M, Gissi DB, Cervellati F. Clinical and histologic healing of lichenoid oral lesions following amalgam removal: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012 Jun;113(6):766-72.
- 9- Issa Y., Brunton P.A., Gleny A.M., Duxbury A.J. Healing of oral lichenoid lesions after replacing amalgam restorations: a systematic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod.* 2004; 98;553-65.
- 10-Ramalingam S, Malathi N, Thamizhchelvan H, Sangeetha N, Rajan ST. Role of Mast Cells in Oral Lichen Planus and Oral Lichenoid Reactions. *Autoimmune Dis.* 2018 Jan 17;2018:7936564. doi: 10.1155/2018/7936564. eCollection 2018.
- 11-Bressenot A, Salleron J, Bastien C, Danese S, Boulagnon-Rombi C, Peyrin-Biroulet L. Comparing histological activity indexes in UC. *Gut.* 2015; 64(9); 1412-8.
- 12-Sharma R., Sircar K., Singh S., Rastogi V. Role of mast cells in pathogenesis of oral lichen planus. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2011; 15; 267-271.

- 13-Ghalayani P., Jahanshahi G., Saberi Z. Degranulated mast cells and TNF- $\alpha$  in oral lichen planus and oral lichenoid reactions diseases. *Adv Biomed Res.* 2012; 1; 52.
- 14-Souto GR, Nunes LF, Tanure BB, Gomez RS, Mesquita RA. CD1a+ dendritic cells in oral lichen planus and amalgam lichenoid reaction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016; 121(6); 651-6.
- 15-Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med.* 2012 Jan;106(1); 9-14.
- 16-Mahi Balci and Mustafa Emre Ercin. Evaluation of Mast Cell Distribution in Oral Lichen Planus and Lichenoid Lesions by Immunohistochemical and Histochemical Analysis. *American Journal of Immunology.* 2016; 12(4); 99.106.
- 17-Juneja M, Mahajan S, Rao NN, George T, Boaz K. Histochemical analysis of pathological alterations in oral lichen planus and oral lichenoid lesions. *J Oral Sci.* 2006; 48(4) 185-93.
- 18-Salem A., Al-Samadi A., Stegajev V., Stark H., Hayrinen-Immonen R., Ainola M., Hietanen J.,Kontinen Y.T. Histamine H4 receptor in oral lichen planus. *Oral diseases.* 2015; 21; 378-85.
- 19-Grossmann S.M.C., Oliveira C.N.A., Souto G.R., Góes C., Mesquita R.A. Oral lichenoid lesion: A review of the literature. *World J Stomatol.* 2015; 4(2); 103-107.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A RLA e o LPO são semelhantes clinicamente, exceto pela presença do amálgama e também histologicamente. Uma vez que a RLA tem relação direta com o amálgama sugere-se uma etiopatogenia diferente para as lesões. A literatura mostra que o LPO pode ter origem autoimune, porém, isso ainda não é bem esclarecido. Sabe-se que as células dendríticas são células da resposta imune inata e tem papel importante na etiopatogenia do LPO e são encontradas em maior densidade em comparação com o RLA e com a mucosa normal (SOUTO *et al.*, 2016). No presente trabalho a nossa hipótese foi que os mastócitos estariam em densidade aumentada na RLA e no LPO e, além disso, haveria uma diferença entre as duas lesões com maior densidade na RLA, por se tratar de uma reação alérgica ao amálgama. Como os mastócitos e sua degranulação desempenham papel importante no processo alérgico, o objetivo do trabalho foi avaliar a expressão dos mastócitos e sua degranulação, assim como avaliar a presença de inflamação na RLA e no LPO.

Os resultados não mostraram diferença estatisticamente significativa entre LPO e RLA para a marcação de c-kit, triptase e azul de toluidina. Ou seja, não há diferença significativa para mastócitos independentemente do marcador. Esses dados são semelhantes aos estudos de SHARMA *et al.* (2011) and BALCI *et al.*, 2016. Já o estudo de JUNEJA *et al.*, 2006 observou que amostras de LPO mostraram a maior densidade total de mastócitos entre os três grupos e houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de LPO e RLA. Também neste estudo, o grupo de casos de LPO mostrou maior densidade de mastócitos degranulados e menor quantidade de mastócitos intactos em comparação com as amostras de RLA, mas os resultados não foram estatisticamente significativos. Esses achados são semelhantes ao do presente estudo. Até o presente momento, porém, não há estudos que fizeram essas avaliações para reações liquenoides relacionadas ao amálgama separadamente.

Foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão de todos os marcadores de mastócitos entre as lesões e a mucosa bucal. Assim como o estudo de Salem *et al.*, 2015, nosso estudo mostrou maior degranulação de mastócitos em amostras de LPO em comparação à mucosa normal. Embora não haja diferença entre as lesões, mastócitos desempenham papel importante na etiopatogênese dessas lesões.

Além disso, as células mononucleares do infiltrado inflamatório foram contadas através da análise de sua morfologia em lâminas H & E. Embora não tenha sido possível avaliar qualitativamente as células desse infiltrado inflamatório através de marcadores específicos, foi observado aumento significativo da densidade de células mononucleares em RLA em relação ao LPO. A possível explicação é dada pelo fato de ter sido observado que na RLA, a presença de folículos linfóides é comum, devido ao grande número de linfócitos nesses folículos (referência). A presença desses folículos linfóides na RLA já foi observada no estudo anterior do nosso grupo (SOUTO *et al.*, 2016).

O c-kit é um receptor de fator de célula-tronco e os resultados mostraram uma marcação citoplasmática e de membrana citoplasmática em mastócitos, assim como descrito na literatura (BALCI *et al.*, 2016). A triptase é um fator pró-angiogênico que pode ser secretado após a ativação do c-Kit-R (AMMENDOLA *et al.*, 2017). Devido à natureza dos anticorpos, a densidade da marcação seria diferente. Uma vez que a triptase é o mediador mais abundante dos mastócitos, a expressão deste marcador em células degranuladas em relação ao c-kit, seria diferente (STONE *et al.*, 2010), mas os resultados não foram estatisticamente significativos.

É possível concluir que não há diferença na densidade de mastócitos entre o LPO e o RLA, mas o aumento de mastócitos em relação à mucosa saudável mostra que essas células desempenham um papel importante na etiopatogenia de ambas as lesões. A diferenciação entre LPO e RLA é um aspecto importante da rotina da patologia e a análise quantitativa de células de infiltrado inflamatório mononuclear pode ser uma forma incipiente de distinção das lesões. Portanto, futuros estudos que permitam o desenvolvimento de análises do infiltrado inflamatório através de instrumentos de contagem automática podem contribuir para o diagnóstico de ambas as lesões.

## REFERÊNCIAS

1. ABBASPOUR BABAEI M, KAMALIDEHGHAN B, SALEEM M, HURI HZ, AHMADIPOUR F. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. **Drug Des Devel Ther.**, v.1, n.10, p. 2443-59, Ago. 2016.
2. AL-HASHIMI I, SCHIFTER M, LOCKHART PB, WRAY D, BRENNAN M, MIGLIORATI CA, AXÉLL T, BRUCE AJ, CARPENTER W, EISENBERG E, EPSTEIN JB, HOLMSTRUP P, JONTELL M, LOZADA-NUR F, NAIR R, SILVERMAN B, THONGPRASOM K, THORNHILL M, WARNAKULASURIYA S, VAN DER WAAL I. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v.103, n.12, Supl:S25.e1p., Jan, 2007.
3. AMMENDOLA M, SACCO R, SAMMARCO G, DONATO G, ZUCCALÀ V, LUPOSELLA M, PATRUNO R, MARECH I, MONTEMURRO S, ZIZZO N, GADALETA CD, RANIERI G. Mast cells density positive to tryptase correlates with angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma patients having undergone surgery. **Gastroenterol Res Pract.**, p. 951-957, 2014.
4. AROCK M., HERVATIN F., GUILLOSSON J.J., MENCIA-HUERTA J.M., THIERRY D. Differentiation of human mast cells from bone-marrow and cord-blood progenitor cells by factors produced by a mouse stromal cell line. **Ann N Y Acad Sci.**, v.28, p.59-68, May. 1994.
5. BEGHDADI W, MADJENE LC, BENHAMOU M, CHARLES N, GAUTIER G, LAUNAY P, BLANK U. Mast cells as cellular sensors in inflammation and immunity. **Front Immunol.** n.6, v.2, p.37, Sep. 2011.
6. BRESSENOT A, SALLERON J, BASTIEN C, DANESE S, BOULAGNON-ROMBI C, PEYRIN-BIROULET L. Comparing histological activity indexes in UC. **Gutn.** **64**, v.9, p.1412-8, 2015.
7. CANTO AM, MÜLLER H, FREITAS RR, SANTOS PS. Oral lichen planus (OLP): clinical and complementary diagnosis. **An Bras Dermatol.** v.85, n.5, p.669-75, Sep-Oct. 2010.

8. CHENG YS, GOULD A, KURAGO Z, FANTASIA J, MULLER S. Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.**, v.122, n.3, p.332-54, Sep. 2016.
9. CORTÉS-RAMÍREZ DA, RODRÍGUEZ-TOJO MJ, COCA-MENESES JC, MARICHALAR-MENDIA X, AGUIRRE-URIZAR JM. Epidermal growth factor receptor expression in different subtypes of oral lichenoid disease. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** v.19, n.5, p.451-8, Sep, 2014.
10. DA SILVA E.Z., JAMUR M.C., OLIVER C. Mast cell function: a new vision of an old cell. **J Histochem Cytochem.** v.16, n.10, p.698-738, Oct. 2014.
11. DEROSI S.S., CIARROCCA K.N. Lichen planus, lichenoid drug reactions, and lichenoid mucositis. **Dent Clin North Am.** v.49, n.1, p.77-89, Jan, 2005.
12. DUNSCHÉ A., KASTEL I., TERHEYDEN H., SPRINGER I.N., CHRISTOPHERS E., BRASCH J. Oral lichenoid reactions associated with amalgam: improvement after amalgam removal. **Br J Dermatol.** v.148, p.70–76, 2003.
13. EHRLICH, P. Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Deutschland: Universität Leipzig. 1878.
14. EISEN D., CARROZZO M., BAGAN SEBASTIAN J.V., THONGPRASOM K. NUMBER V. Oral lichen planus: Clinical features and management. **Oral Dis.** v.11, p.338-49, 2005.
15. EISENBERG E. Oral lichen planus: a benign lesion. **J Oral Maxillofac Surg.** v.58, n.11, p.1278-85, nov. 2000.
16. FODINGER, M., FRITSCH, G., WINKLER, K., EMMINGER, W., MITTERBAUER, G., GADNER, H., VALENT, P., MANNHALTER, C. Origin of human mast cells: development from transplanted hematopoietic stem cells after allogeneic bone marrow transplantation. **Blood** v.84, p.2954–2959, 1994.
17. GAJE P.N., AMALIA CEAUSU R., JITARIU A., STRATUL S.I., RUSU L.C., POPOVICI R.A., RAICA M. Mast Cells: Key Players in the Shadow in Oral Inflammation and in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. **Biomed Res Int.** v. 2016, ID 9235080, 2016.

- 18-GHALAYANI P., JAHANSHAHI G., SABERI Z. Degranulated mast cells and TNF- $\alpha$  in oral lichen planus and oral lichenoid reactions diseases. **Adv Biomed Res.**, n.1, p.52, 2012.
- 19-GHALAYANI P, SARDARI F, AKBARI M. Salivary IgA and IgG in oral lichen planus and oral lichenoid reactions diseases. **Adv Biomed Res.** v.1, p.73, 2012.
- 20-GROSSMANN S.M.C., OLIVEIRA C.N.A., SOUTO G.R., GÓES C., MESQUITA R.A. Oral lichenoid lesion: A review of the literature. **World J Stomatol.** v.4, n.2, p.103-107, 2015.
- 21-GHALAYANI P, RAZAVI SM, GHOLAMI D. Comparative study of number and distribution of IgG cells in oral lichen planus and oral lichenoid lesions. **Dent Res J.** v.6, n.1, p.1-5, 2009.
- 22-ISSA Y., BRUNTON P.A., GLENY A.M., DUXBURY A.J. Healing of oral lichenoid lesions after replacing amalgam restoraions: a systematic review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod.** v.98, p.553-65, 2004.
- 23-JEMIMA EA, PREMA A, THANGAM EB. Functional characterization of histamine H4 receptor on human mast cells. **Mol Immunol.** v.62 n.1 p.19-28, Nov. 2014
- 24-JOSE M., RAGHU A.R., RAO N.N. Evaluation of mast cells in oral lichen planus and oral lichenoid reaction. **Indian J Dent Res**, v.12, n.3, 2001.
- 25-JUNEJA M, MAHAJAN S, RAO NN, GEORGE T, BOAZ K. Histochemical analysis of pathological alterations in oral lichen planus and oral lichenoid lesions. **J Oral Sci.** v.48, n.4, p.185-93, Dec. 2006.
- 26- Krishnaswamy G, Kelley J, Johnson D, Youngberg G, Stone W, Huang SK, et al. The human mast cell: functions in physiology and disease. *Front Biosci.* 2001;6:D1109–27
- 27-LARTITEGUI-SEBASTIÁN M.J., MARTÍNEZ-REVILLA B., SAIZ-GARCIA C., EGUIZABAL-SARACHO S., AGUIRRE-URIZAR J.M. Oral lichenoid lesions associated with amalgam restorations: a prospective pilot study addressing the adult population of the Basque Country. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** v.17, n.4, p.545-9, Jul, 2012.

- 28-LAVANYA N., JAYANTHI P., RAO U.K., RANGANATHAN K. Oral lichen planus: An update on pathogenesis and treatment. **J Oral Maxillofac Pathol.** v.15, n.2, p.127-32, May, 2011.
- 29-LENNARTSSON J, JELACIC T, LINNEKIN D, SHIVAKRUPA R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. **Stem Cells.** v.23, n.1, p. 16-43, 2005.
- 30-LU R., ZHANG J., SUN W., DU G., ZHOU G. Inflammation-related cytokines in oral lichen planus: an overview. **J Oral Pathol Med.** n.44, v.1, p.1-14, Jan, 2015.
- 31-Metzger H. The receptor with high affinity for IgE. **Immunol Rev.** v.125, p.37-48, 1992.
- 32-MYERS S.L., RHODUS N.L., PARSONS H.M., HODGES J.S., KAIMAL S. A retrospective survey of oral lichenoid lesions: revisiting the diagnostic process for oral lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v.93, n.6, p.676–81, 2002.
- 33-MYINT M., STEINSVOLL S., YUAN Z.N., JOHNE B., HELGELAND K., SCHENCK K. Highly increased numbers of leukocytes in inflamed gingiva from patients with HIV infection. **AIDS.** v. 16, n.2, p.235-43, Jan. 2002.
- 34-NAGARAJ E., ESWAR P., KAUR R.P. Etiogenic study on oral lichenoid reactions among Tamil Nadu population: a prospective cohort study. **Indian J Dent Res.** v.24, n.3, p.309-15, May, 2013.
- 35-ODA T, MORIKAWA N, SAITO Y, MASUHO Y, MATSUMOTO S. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. **J Biol Chem.** v.24 n.275(47) p.36781-6 Nov. 2000.
- 36-PEMBERTON M.N., SLOAN P., THAKKER N.S. Oral lichenoid lesions after hepatitis B vaccination. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 89, n. 6, p.717-9, Jun. 2000.
- 37-PERRINI N., FONZI L. Mast cells in human periapical lesions: ultrastructural aspects and their possible physiopathological implications. **J Endod.** v.11, n.5, p.197-202, May. 1985.
- 38-PRUCKTRAKUL C, YOUNGNAK-PIBOONRATANAKIT P, KANJANABUCH P, PRUEKSRISAKUL T, THONGPRASOM K. Oral lichenoid lesions and serum

- antinuclear antibodies in Thai patients. **J Oral Pathol Med.** v. 44, n.6, p.468-74, Jul. 2015.
- 39-RAMALINGAM S, MALATHI N, THAMIZHCHELVAN H, SANGEETHA N, RAJAN ST. Role of Mast Cells in Oral Lichen Planus and Oral Lichenoid Reactions. **Autoimmune Dis.** v.17, ID. 7936564, Jan, 2018.
- 40-REDDY DS, SIVAPATHASUNDHARAM B, SARASWATHI TR, SRIRAM G. Evaluation of mast cells, eosinophils, blood capillaries in oral lichen planus and oral lichenoid mucositis. **Indian J Dent Res.** n.23, v.5, p.695-6, Sep-Oct, 2012.
- 41-ROBLEDO-SIERRA J., MATTSSON U., SVEDENSTEN T., JONTELL M. The morbidity of oral mucosal lesions in an adult Swedish population. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** v.18, n. 5, p.766-72, Sep. 2013.
- 42-SALEM A., AL-SAMADI A., STEGAJEV V., STARK H., HAYRINEN-IMMONEN R., AINOLA M., HIETANEN J.,KONTTINEN Y.T. Histamine H4 receptor in oral lichen planus. **Oral diseases.** v.21, p.378-85, 2015.
- 43-SANTORO A., MAJORANA A., ROVERSI L., GENTILI F., MARRELLI S., VERMI W., BARDELLINI E., SAPELLI P., FACCHETTI F. Recruitment of dendritic cells in oral lichen planus. **J Pathol.** v.205, n.4, p.426-34, Mar, 2005.
- 44-SCHWARTZ L.B., AUSTEN K.F. Enzymes of the mast cell granule. **J Invest Dermatol.** v.74, n.5, p.349-53, May. 1980.
- 45-SCULLY C., BEYLI M., FERREIRO M.C., FICARRA G., GILL Y., GRIFFITHS M., HOLMSTRUP P., MUTLU S., PORTER S., WRAY D.. Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. **Crit Rev Oral Biol Med.**v.9, n.1, p.86-122, 1998.
- 46-SEDGHIZADEH PP, ALLEN CM, ANDERSON KE, KIM DH, KALMAR JR, LANG JC. Oral graft-versus-host disease and programmed cell death: pathogenetic and clinical correlates. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v.97, n.4, p. 491-8, Apr, 2004.
- 47-SHARMA R., SIRCAR K., SINGH S., RASTOGI V. Role of mast cells in pathogenesis of oral lichen planus. **J Oral Maxillofac Pathol.** v.15, p.267-271, 2011.

- 48-SOUTO GR, NUNES LF, TANURE BB, GOMEZ RS, MESQUITA RA. CD1a+ dendritic cells in oral lichen planus and amalgam lichenoid reaction. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.** v.121, n.6, p.651-6, Jun, 2016.
- 49-STEINSVOLL S., HELGELAND K., SCHENCK K. Mast cells a role in periodontaldiseases? **J ClinPeriodontol.** v.31, n.6, p.413-19, Jun. 2004.
- 50-STONE K.D., PRUSSIN C., METCALFE D.D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **J Allergy ClinImmunol.** v.125, n. 2, p.73-80, Feb. 2010. Suppl. 2
- 51-STOOPLER E.T., SOLLECITO T.P., DE ROSSI S.S. Oral lichen planus. Update for the general practitioner. **N Y State Dent J** v.69, n.6, p.26-8, 2003.
- 52-THORNHILL M.H., PEMBERTON M.N., SIMMONS R.K., THEAKER E.D. Amalgam-contact hypersensitivity lesions and oral lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod.** v.95, n.3, p.291-9, Mar, 2003.
- 53-WALSH L.J. Mast cells and oral inflammation. **Crit Rev Oral Biol Med.** v.14, n.3, p.188-98, 2003.
- 54-WALSH L.J., DAVIS M.F., XU L.J., SAVAGE N.W. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. **J Oral Pathol Med.** v.24, n.6, p.266-72 Jul. 1995.