

Rodrigo Lamounier Araújo de Melo Faria

**AVALIAÇÃO DE KI-67, IL-10, TGF- β , FGF E INFILTRADO INFLAMATÓRIO
EM TECIDOS GENGIVAIS DE PACIENTES COM CRESCIMENTO
GENGIVAL ASSOCIADO AO USO DE FENITOÍNA**

Belo Horizonte

2014

Rodrigo Lamounier Araújo de Melo Faria

**AVALIAÇÃO DE KI-67, IL-10, TGF- β , FGF E INFILTRADO INFLAMATÓRIO
EM TECIDOS GENGIVAIS DE PACIENTES COM CRESCIMENTO
GENGIVAL ASSOCIADO AO USO DE FENITOÍNA**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Luís Otavio de Miranda

Cota

Belo Horizonte

2014

Ficha Catalográfica

F224a Faria, Rodrigo Lamounier Araújo de Melo.
2014 Avaliação de KI-67, IL-10, TGF- β , FGF e infiltrado
T inflamatório em tecidos gengivais de pacientes com
crescimento gengival associado ao uso de fenitoína / Rodrigo
Lamounier Araújo de Melo Faria. -- 2014.

53 f. : il.

Orientador: Luís Otávio de Miranda Cota.

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

1. Crescimento excessivo da gengiva. 2. Fenitoína. 3. Citocinas. I. Cota, Luís Otávio de Miranda. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação de Ki-67, IL-10, TGF- β , FGF e infiltrado inflamatório em tecidos gengivais de pacientes com crescimento gengival associado ao uso de fenitoína.

RODRIGO LAMOUNIER ARAÚJO DE MELO FARIA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, área de concentração PERIODONTIA.

Aprovada em 29 de julho de 2014, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Luis Otavio de Miranda Cota - Orientador
FO Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Tarcília Aparecida da Silva
FO Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Paula Rocha Moreira
ICB Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 29 de julho de 2014.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO
RODRIGO LAMOUNIER ARAÚJO DE MELO FARIA

Realizou-se, no dia 29 de julho de 2014 às 08:30 horas, Faculdade de Odontologia da UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Avaliação de Ki-67, IL-10, TGF- β , FGF e infiltrado inflamatório em tecidos gengivais de pacientes com crescimento gengival associado ao uso de fenitoína.*, apresentada por RODRIGO LAMOUNIER ARAÚJO DE MELO FARIA, número de registro 2012753340, graduado no curso de ODONTOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Luis Otavio de Miranda Cota - Orientador (FO Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Tarcília Aparecida da Silva (FO Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Paula Rocha Moreira (ICB Universidade Federal de Minas Gerais).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 29 de julho de 2014.

Prof(a). Luis Otavio de Miranda Cota (Doutor)

Prof(a). Tarcília Aparecida da Silva (Doutora)

Prof(a). Paula Rocha Moreira (Doutora)

Homologado pelo Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Em reunião de 05/08/14

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora Aparecida,

À minha noiva Mariana,

Aos meus pais, meus irmãos e família,

Aos colegas da UFMG, a Jôice, a Marcela e amigos,

Aos professores Dra. Tarcília e Dr. Luís,

Aos pacientes.

“Mas tudo que aprendo me faz ser feliz
E essa vida que levo de um jeito muito simples
É a vida que eu sempre quis”

Victor Chaves

RESUMO

Objetivos: Os mecanismos envolvidos na patogênese do crescimento gengival (CG) induzido pela fenitoína ainda são pouco elucidados, mas tem sido sugerida uma alteração do metabolismo da matriz extracelular associada a fatores inflamatórios. Assim, o objetivo deste estudo foi comparar os níveis de IL-10, TGF- β , FGF, a expressão de Ki-67, bem como o infiltrado inflamatório, em amostras de tecido com CG induzido pela fenitoína com amostras de tecido sem CG. **Metodologia:** O grupo caso foi composto de 9 amostras de tecido gengival de indivíduos em uso regular de fenitoína que apresentavam CG clinicamente significativo (score $\geq 30\%$), e o grupo controle composto por 15 amostras de tecido gengival de pacientes sem uso de fenitoína. A concentração das citocinas IL-10, TGF- β , e FGF foi mensurada através de método ELISA e a expressão de Ki-67 através de análise imunohistoquímica. Foi também realizada a contagem de células do infiltrado inflamatório. Casos e controles foram comparados em relação a variáveis de interesse pelo teste Mann-Whitney. Correlações entre os níveis dos fatores inflamatórios avaliados e a expressão de Ki-67 foram testadas. **Resultados:** não houve diferença significativa entre casos e controles em relação aos níveis de IL-10, TGF- β , FGF e contagem do infiltrado inflamatório. A expressão de Ki-67 foi maior em amostras de tecido com CG. Não houve correlação entre a expressão de Ki-67 e os níveis de IL-10, TGF- β , FGF. **Conclusão:** a expressão de Ki-67 em amostras de tecido com CG induzido pela fenitoína indica maiores índices de atividade mitótica. Entretanto, esta atividade mitótica não se relacionou aos níveis encontrados de IL-10, TGF- β e FGF, requerendo investigações futuras.

Palavras chaves: crescimento gengival, fenitoína, Ki-67, citocinas.

ABSTRACT

Objectives: The mechanisms involved in the pathogenesis of gingival overgrowth (GO) induced by phenytoin are still poorly understood, but a change in the metabolism of extracellular matrix associated with inflammatory factors has been suggested. The objective the present study was to compare the levels of IL-10, TGF- β , FGF, the expression of Ki-67, and the inflammatory infiltrate in tissue samples with gingival overgrowth (GO) induced by phenytoin with tissue samples without GO.

Methodology: The case group comprised 9 samples of gingival tissue from individuals under regular use of phenytoin presenting clinically significant GO (score $\geq 30\%$), and the control group comprised 15 gingival tissue samples from individuals not medicated with phenytoin. The concentration of IL-10, TGF- β , and FGF was measured by ELISA, and the expression of Ki-67 through immunohistochemistry analysis. The evaluation of inflammatory infiltrate cells count was also performed. Cases and controls were compared in relation to variables of interest through Mann-Whitney test. Correlations between levels of inflammatory factors evaluated and expression of Ki-67 were tested. **Results:** There was no significant difference between cases and controls in relation to the levels of IL-10, TGF- β , FGF, and inflammatory infiltrate cells count. The Ki-67 expression was higher in tissue samples with GO. There was no correlation between the expression of Ki-67 and IL-10, TGF- β , FGF levels. **Conclusion:** The expression of Ki-67 in tissue samples with GO induced by phenytoin indicates higher rates of mitotic activity. However, this mitotic activity was not related to the levels of IL-10, TGF- β , and FGF, requiring further investigation.

Key-words: gingival overgrowth, phenytoin, Ki-67, cytokines.

LISTA DE ABREVIATURAS

CG – Crescimento gengival

BCC – Bloqueador de Canais de Cálcio

Ki-67 – Antígeno KI-67

FGF – Fator de Crescimento de Fibroblasto

IL-10 – Interleucina 10

TGF- β – Fator de Crescimento Transformador Beta

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

AAP – Academia Americana de Periodontia

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1. Crescimento gengival medicamentoso

2.2. Patogênese do Crescimento Gengival

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

3.2. Objetivos específicos

4. HIPÓTESES

5. ARTIGO CIENTÍFICO

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. REFERÊNCIAS

ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

O crescimento gengival (CG) induzido por medicamentos é uma reação adversa associada ao uso sistêmico de diferentes drogas. Este efeito colateral tem sido relacionado principalmente a agentes imunossupressores (ciclosporina, tacrolimus, sirolimus) (Costa, 2006; Cota, 2010), anti-hipertensivos bloqueadores de canais de cálcio (BCC) (nifedipina, verapamil, diltiazem, amlodipina) (Guare, 1998; Vieira, 2001; Souza, 2009; McLeod, 2009) e anticonvulsivantes (fenitoína, valproato de sódio) (Correa et al, 2011).

O primeiro relato associando CG ao uso contínuo de fenitoína foi feito por Kimball et al.(1939) em pacientes epiléticos. A fenitoína é utilizada em pacientes com condição epilética parcial simples ou complexa, generalizada secundariamente ou tônico-clônica generalizada (Treiman, 1987; Trevisol-Bittencourt et al, 1999; Pedroso e Oliveira, 2007). A epilepsia é o mais comum dos distúrbios neurológicos crônicos graves. É uma alteração temporária e reversível do funcionamento do cérebro (que não tenha sido causada por febre, drogas ou distúrbios metabólicos). Durante alguns segundos ou minutos, uma parte do cérebro emite sinais incorretos, que podem ficar restritos a esse local ou espalhar-se. Se ficarem restritos, a crise será chamada parcial; se envolverem os dois hemisférios cerebrais, será denominada generalizada (International League Against, 1993).

Sua prevalência no Brasil foi descrita em estudo de 2007, onde ao longo da vida foi de 9,2/1000 e a epilepsia ativa de 5,4/1000. Há grande variação na distribuição da epilepsia entre as classes sociais, 7,5/1000 em classes menos favorecidas contra 1,6/1000 em classes mais favorecidas. Em idosos também foi encontrada prevalência maior, 8,5/1000 (Noronha et al, 2007). É sabido que este distúrbio ocorre com maior frequência nos países em desenvolvimento, mais

acometidos por desnutrição, doenças infecciosas e atendimento médico deficiente. Em países mais desenvolvidos, a incidência é de aproximadamente 1%, subindo para 2% em nações menos desenvolvidas (Sander e Shorvon, 1996).

Estima-se que cerca de 30 a 50% dos pacientes que fazem uso da fenitoína desenvolvam alterações gengivais significativas (Modeér et al, 2000). O CG causa um comprometimento funcional e estético ao paciente, podendo gerar um odor desagradável, sangramento, dificultar a higiene oral e até desconforto na alimentação (Matsumura et al, 2012), além de prejudicar a autoestima e o estado psicológico do paciente.

Os efeitos colaterais associados ao uso da fenitoína muitas vezes pode dificultar o seu uso contínuo, mesmo que sua atuação nas crises seja satisfatória. Controlar os efeitos colaterais torna-se então importante para evitar que se perca a estabilidade do tratamento.

O que se conhece da patogênese do CG medicamentoso é que este envolve um declínio da degradação do colágeno. Este declínio está relacionado com alterações no metabolismo do cálcio, nos níveis das metaloproteinases da matriz extracelular e seus antagonistas, na expressão de algumas integrinas e na apoptose de fibroblastos, bem como entre outros fenômenos de proliferação e apoptose celulares envolvendo epitélio (Correa et al, 2011). Entretanto, os mecanismos envolvidos não foram totalmente elucidados. Apesar de vários estudos tentaram determinar os mecanismos envolvidos na patogênese do CG e alguns achados importantes serem relatados (Ruhlet al, 2004; Nițulescu et al, 2012), ainda não foi possível definir os mecanismos que desencadeiam esse efeito. Desta forma, um maior entendimento destes mecanismos envolvidos na patogênese do CG e da participação de mediadores inflamatórios torna-se importante.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1. Crescimento Gengival Medicamentoso

O CG inicia entre os três primeiros meses de uso, evoluindo durante 12 a 18 meses e parece ter um equilíbrio após este primeiro ano do início da dosagem (Seymour et al, 2000). Uma maior incidência em relação ao gênero ou etnia não foi relatada. Usualmente, acomete mais adolescente e crianças (Lin, et al, 2007).

Clinicamente o CG inicia-se nas papilas interdentais que ficam hiperplásicas, de consistência firme, móvel e triangular, podendo interferir na oclusão dental. (Kanno et al, 2008). A gengiva inserida apresenta nódulos firmes e de aparência granular. Geralmente é indolor, exceto quando houver inflamação. A coloração vai de normal a hiperemiada (Hassel & Hefti, 1991). O crescimento é lento e em casos mais severos pode chegar a recobrir toda a coroa clinica e levar ao deslocamento de dentes (Seymour et al, 2000).

A incidência e severidade são maiores nas superfícies vestibulares dos dentes anteriores, tanto superiores quanto inferiores (Marshall et al, 1998).

Determinar os valores de prevalência de CG induzido para cada medicação é muito difícil devido às diferenças nos achados dos estudos. A estimativa mais frequentemente reportada é dependente para cada droga. Nos anticonvulsivantes, a fenitoína apresenta prevalência de CG próxima a 50%, fenobarbital menor que 5%, valproato de sódio e vigabatrin são considerados raros, e não existem relatos para carbamazepina. Na categoria dos imunossuppressores, o CG induzido pela Ciclosporina atinge de 25 a 30% em adultos e mais de 70% em crianças. Já nos bloqueadores de canais de cálcio (BCC), é relatado de 5 a 20 % de CG positivo

vinculado ao uso de diltiazem e entre 6 a 15 % para nifedipina. A prevalência no uso de verapamil é menor que 5%, e CG associado ao uso de amlodipina e felodipina é considerado raro (AAP, 2004).

Dentre as medicações utilizadas para o tratamento da epilepsia a fenitoína é o mais comum, também podendo ser utilizados em neuralgias e arritmias cardíacas (Guncu et al, 2006). Em 2000, estimou-se que cerca de 30 a 50% dos pacientes que fazem uso da fenitoína desenvolvam alterações gengivais significativas (Modeér et al, 2000). No ano de 2004 a Academia Americana de Periodontia (AAP) reportou prevalência de 50% de CG em pacientes utilizando a fenitoína (AAP, 2004).

Existem poucos relatos em pacientes edêntulos ou na dentição decídua. Foram relatados casos de crescimento em áreas de implantes em pacientes utilizando a fenitoína (Martorelli et al, 2008; Lin et al, 2007).

A fenitoína é utilizada em pacientes com condição epilética parcial simples ou complexa, generalizada secundariamente ou tônico-clônica generalizada (Pedroso e Oliveira, 2007). A epilepsia é o mais comum dos distúrbios neurológicos crônicos graves. É uma alteração temporária e reversível do funcionamento do cérebro (que não tenha sido causada por febre, drogas ou distúrbios metabólicos). Durante alguns segundos ou minutos, uma parte do cérebro emite sinais incorretos, que podem ficar restritos a esse local ou espalhar-se. Se ficarem restritos, a crise será chamada parcial; se envolverem os dois hemisférios cerebrais, generalizada (International League Against Epilepsy, 1993).

A fenitoína tem diversos efeitos. Dentre estes, o de inibir canais de sódio, potássio e cálcio (presentes na membrana dos neurônios). (Borowicz & Banach, 2014).

Fatores de risco como idade e placa dental, não aumentaram o risco de CG induzido pela fenitoína, quando analisados sozinhos. Foram estatisticamente significativos quando considerados combinados (Majola et al. 2000). O fator de risco inflamação gengival foi associado com o crescimento gengival em pacientes tratados com anticonvulsivantes (Brunet et al. 2001).

2.2. Patogênese do Crescimento Gengival

Os mecanismos envolvidos no crescimento gengival são ainda pobremente conhecidos (AAP, 2004). Achados ultra estruturais demonstraram que o aumento do volume gengival causado por drogas é primariamente devido a uma resposta do tecido conjuntivo (Mariani *et al.*, 1993). De fato, os mecanismos de ação no CG induzido por drogas ainda não foram completamente elucidados e os vários dados na literatura são muitas vezes conflitantes e dispersos.

A histopatologia das lesões em todas as categorias de drogas parece ser semelhante e caracterizada por um acúmulo excessivo de proteínas de matriz extracelular, principalmente colágeno (Trackman & Kantarci, 2004; Kataoka *et al.*, 2005). Assim, alguns estudos citam o acúmulo de proteínas na matriz extracelular, principalmente do colágeno, como uma possibilidade para o CG e que desequilíbrios entre a síntese e a degradação da matriz extracelular podem favorecer o acúmulo de colágeno e outras macromoléculas no tecido gengival (Spoliodorio et al, 2000). Outros estudos demonstram que há uma diminuição da produção de colágeno após a administração da Fenitoína. A diminuição na expressão do RNA mensageiro (RNAm) de colágeno do tipo I e III é relatada, mas ocorre um aumento da densidade dessas fibras no tecido induzido pela fenitoína. Estes resultados indicam que o desequilíbrio

que leva ao aumento gengival pode estar associado a uma diminuição da degradação de colágeno e não ao aumento de sua síntese (Kato et al, 2005).

Pelo fato de apenas uma proporção dos indivíduos desenvolverem o CG, tem sido sugerido que estes indivíduos apresentam um perfil de fibroblastos com suscetibilidade específica, com elevado nível de síntese proteica (AAP, 2004).

Microscopicamente tem sido demonstrado, além de um aumento da matriz extracelular com tecido conjuntivo gengival, uma hiperplasia do epitélio juncional e hipertrofia do epitélio queratinizado (Kanno et al, 2008). Observam-se vários níveis de inflamação com presença de linfócitos mononucleares e células T (Brunet et al. 2001). Estudos sobre componentes da matriz extracelular de tecidos hiperplásicos comparados a tecidos normais mostraram que a distribuição de fibronectina, colágeno do tipo I, III, IV, V, VI e VII, e a produção de glicosaminoglicanas estão alteradas (Uzel et al, 2001).

O grau de inflamação, fibrose e celularidade dependem da quantidade e duração da dose, da qualidade da higiene oral e da susceptibilidade individual (Brunet et al. 2001). O crescimento gengival induzido pela Fenitoína apresenta maior fibrose nos tecidos gengivais e menores níveis de inflamação, quando comparado a outras medicações (Trackman & Kantarci, 2004).

Apesar do mecanismo de ação das diferentes drogas no tecido gengival ser ainda incerto, existem evidências da participação de citocinas e fatores de crescimento na patogênese das alterações (Ruhl et al, 2004; Morton & Dongari-Bagtzoglu, 1999; Das et al, 2002; Kataoka et al, 2005). Desta forma, parece que a ação das drogas parece alterar o balanço normal de citocinas nos tecidos gengivais (Trackman & Kantarci, 2004).

De fato, o papel de diferentes citocinas tem sido estudado na etiopatogênese do CG. Um efeito sinérgico no aumento da síntese de colágeno por fibroblastos gengivais relacionado à interleucina-1 β e exposição à BCC foi descrito (Johnson *et al.*, 2000). Níveis reduzidos de metaloproteinases (MMPs) de matriz, principalmente MMP-1 e MMP-3, foram também demonstrados (Bolzani *et al.*, 2000; Kataoka *et al.*, 2000), sendo assim sugerido um efeito das drogas sobre a ação das collagenases, que contribuiria para o acúmulo de componentes da matriz extracelular (AAP, 2004). Uma redução da fagocitose do colágeno pelos fibroblastos gengivais foi atribuída a uma redução na expressão da integrina α 2 β 1 (Kataoka *et al.*, 2005).

Parece existir um importante papel da interleucina-6 (IL-6) nos eventos fibróticos gengivais (Williamson *et al.*, 1994; Morton & Dongai-Bagtzoglu, 1999; Chae *et al.*, 2006). Diferentes autores reportaram que uma característica das lesões gengivais induzidas por CsA é um alto nível de IL-6 (AAP, 2004; Trackman & Kantarci, 2004, Kataoka *et al.*, 2005). Esta interleucina parece aumentar a proliferação e exercer uma regulação positiva na síntese de colágeno (AAP, 2004).

Foi também sugerido que o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) contribui para a liberação de IL-6 nos tecidos gengivais alterados pela CsA (Chae *et al.*, 2006). Existem evidências de níveis aumentados de TGF- β nos tecidos gengivais afetados, indicando um importante papel deste fator de crescimento na patogênese do CG (Cotrim *et al.*, 2003; Kuru *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2004; Radwan-Oczko *et al.*, 2006).

De fato, foi demonstrado que a fenitoína parece regular a expressão de citocinas no tecido gengival (Guncu *et al.*, 2006). Dentre as citocinas e fatores de crescimento que são encontrados em níveis aumentados podem ser destacados: interleucina 6 (IL-6), IL-1, fator de crescimento B derivado de plaqueta (PDGF- β), fator de

crescimento fibroblástico 2 (FGF-2), fator transformador de crescimento β (TGF- β) e fator de crescimento conjuntivo (CTGF) (Correa et al, 2011).

A fenitoína induz a resposta imune de células Th2 e macrófagos. Estes tipos celulares são responsáveis por aumentar os níveis de IL-10, FGF e TGF- β . Deste modo a fenitoína pode ser capaz de alterar a resposta inflamatória (Huang et al, 2003, Okada et al, 2001).

Não somente a fenitoína como as outras classes de drogas relacionadas ao CG, induzem uma diminuição no fluxo celular de Ca^{2+} , levando a uma redução na absorção do ácido fólico, limitando, assim, a produção da colagenase. O fármaco diminui a endocitose pelos fibroblastos do colágeno, através da indução de uma menor expressão da integrina $\alpha 2\beta 1$. Sugere-se uma estimulação dos miofibroblastos pela fenitoína. As citocinas são elementos importantes e diretamente envolvidos no CG associado ao uso da fenitoína. Os fibroblastos ativados pela fenitoína produzem grandes quantidades de IL-6, IL-1 e IL-8. Estes mediadores são capazes de ativar a proliferação de células T e o recrutamento de neutrófilos nos tecidos acometidos, criando uma interação direta entre o sistema imunitário e o tecido conjuntivo. Esta interação parece estar fortemente associada com as doenças fibróticas. A evidência aponta para um papel da placa dental na etiologia do CG através da indução de uma resposta inflamatória local, o que seria essencial para o CG. Fatores de crescimento, como CTGF, PDGF, FGF e TGF- β desempenham um papel no CG medicamentoso e são encontrados em níveis mais elevados em tecidos fibróticos. A fenitoína pode afetar a produção de IL-13 ativando as células Th2, como também pode induzir a liberação de TGF- β , CTGF e outros fatores de crescimento por macrófagos. Seus efeitos conduzem, de forma sinérgica, a proliferação de fibroblastos, biossíntese de

colágeno, ativação de TIMPs, inibição de síntese de MMPs e ECM, processos característicos observados em lesões fibróticas. (Correa et al, 2011).

A citocina TGF- β é secretada por vários tipos celulares, incluindo os macrófagos e apresenta um papel importante na regulação do metabolismo de colágeno nos tecidos conjuntivos. TGF- β estimula a biossíntese de colágeno e lisiloxidase (Hong et al, 1999). É armazenado dentro da célula como um homodímero, com ligação não covalente a uma proteína chamada LAP (latency-associated proteína) que mantém o TGF- β inativo. A dissociação do TGF- β com a LAP é catalisada por vários agentes, como catepsinas e MMPs. IL-13 induz a formação de TGF- β latente e ainda a formação de ambas catepsinas e MMPs que clivam a LAP e ativam TGF- β (Wynn, 2008). Segundo Feres-Filho os efeitos de TGF- β no tecido gengival são baixos se comparados com outros tipos de tecido conjuntivo (Feres-Filho et al, 1995).

A expressão do antígeno Ki-67 foi observada nos núcleos de células em proliferação localizados nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, e pode ser um dos marcadores para o estado de crescimento do tecido. Tem sido relatado que a expressão do antígeno Ki-67 esta aumentada em lesões orais displásicas e carcinomas de células escamosas orais, enquanto que a expressão do antígeno Ki-67 não tem sido examinada histoquimicamente em tecidos gengivais hiperplásicos (Saito et al., 1999). Takahashi et al em 1999 relacionou a presença do marcador de proliferação Ki-67 e a proliferação de células epiteliais em cistos periapicais. Uma expressão significativa de antígeno Ki-67 foi detectada em tumores primários de carcinoma de células basais (Kramer et al, 2014).

Produzida por monócitos, macrófagos e linfócitos, a IL-10 foi originalmente identificada por sua habilidade em antagonizar a imunidade. Entre as suas

características destaca-se a imunossupressão, deprimindo a ativação de células mononucleares e prevenindo a produção de mediadores da inflamação (De Waal et al., 1991). Essas ações são excelentes exemplos de reguladores de *feedback* negativo (Abbas et al, 2008); inibem a capacidade de apresentação de antígenos em monócitos, pela regulação negativa do MHC de classe II nessas células e a expressão de moléculas co-estimuladoras (De Waal et al, 1991). Seus efeitos biológicos seriam consequência de sua habilidade em inibir muitas das funções dos macrófagos ativados, como por exemplo, a produção de IL-12 e TNF- α (Abbas et al, 2008). Em buscas pela frequência do genótipo de IL-10 (-819TT/-592AA) em pacientes com CG utilizando a ciclosporina A, encontrou-se expressão estatisticamente maior em pacientes com CG quando comparados a pacientes sem CG ($p < 0,05$). Foi sugerido que este pode agravar a resposta inflamatória e causar excessivo CG (Luo et al, 2013).

Segundo Kitamura et al, 2010, os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) exibe potente atividade angiogênica e capacidade mitogênica sobre células mesenquimais. Podem ser secretados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais e fibroblastos. As duas formas do FGF (a e b) induzem a liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) potencializando o mecanismo da angiogênese. Angiogênese fisiológica e patologia influenciada por outros agentes que estimulam o VEGF como o TGF- β . O TGF- β também participa no processo de estabilização dos vasos recém-formados, tornando tubos endoteliais simples em estruturas vasculares elaboradas, e mantendo a quiescência endotelial (Kumar et al, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Comparar os níveis de IL-10, TGF- β e FGF, a contagem de células do infiltrado inflamatório e a expressão de marcador de proliferação celular Ki-67 em amostras de tecido gengival com CG induzido pela fenitoína com amostras de tecido gengival sem CG.

3.2. Objetivos Específicos

a. Comparar os níveis de IL-10, TGF- β e FGF em amostras de tecido gengival com CG induzido pela fenitoína com amostras de tecido gengival sem CG.

b. Comparar expressão Ki-67 em amostras de tecido gengival com CG induzido pela fenitoína com amostras de tecido gengival sem CG.

c. Comparar a contagem de células do infiltrado inflamatório em amostras de tecido gengival com CG induzido pela fenitoína com amostras de tecido gengival sem CG.

4. HIPÓTESES

Os níveis de IL-10, TGF- β e FGF em amostras de tecido com CG induzido pela fenitoína são maiores que em amostras de tecido sem CG.

A expressão de Ki-67 em amostras de tecido com CG induzido pela fenitoína são maiores que em amostras de tecido sem CG.

A contagem de células do infiltrado inflamatório em amostras de tecido com CG induzido pela fenitoína é maior que em amostras de tecido sem CG.

A metodologia, os resultados e a discussão desta dissertação serão apresentados na forma de um artigo científico.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

AVALIAÇÃO DE KI-67, IL-10, TGF- β , FGF E INFILTRADO INFLAMATÓRIO EM TECIDOS GENGIVAIS DE PACIENTES COM CRESCIMENTO GENGIVAL ASSOCIADO AO USO DE FENITOÍNA

RESUMO

Objetivos: Os mecanismos envolvidos na patogênese do crescimento gengival (CG) induzido pela fenitoína ainda são pouco elucidados, mas tem sido sugerida uma alteração do metabolismo da matriz extracelular associada a fatores inflamatórios. Assim, o objetivo deste estudo foi comparar os níveis de IL-10, TGF- β , FGF, a expressão de Ki-67, bem como o infiltrado inflamatório, em amostras de tecido com CG induzido pela fenitoína com amostras de tecido sem CG. **Metodologia:** O grupo caso foi composto de 9 amostras de tecido gengival de indivíduo sem uso regular de fenitoína que apresentavam CG clinicamente significativo (score $\geq 30\%$), e o grupo controle composto por 15 amostras de tecido gengival de pacientes sem uso de fenitoína. A concentração das citocinas IL-10, TGF- β , e FGF foi mensurada através de método ELISA e a expressão de Ki-67 através de análise imunohistoquímica. Foi também realizada a contagem de células do infiltrado inflamatório. Casos e controles foram comparados em relação a variáveis de interesse pelo teste Mann-Whitney. Correlações entre os níveis dos fatores inflamatórios avaliados e a expressão de Ki-67 foram testadas. **Resultados:** não houve diferença significativa entre casos e controles em relação aos níveis de IL-10, TGF- β , FGF e contagem do infiltrado inflamatório. A expressão de Ki-67 foi maior em amostras de tecido com CG. Não houve correlação entre a expressão de Ki-67 e os níveis de IL-10, TGF- β , FGF.

Conclusão: a expressão de Ki-67 em amostras de tecido com CG induzido pela fenitoína indica maiores índices de atividade mitótica. Entretanto, esta atividade mitótica não se relacionou aos níveis encontrados de IL-10, TGF- β e FGF, requerendo investigações futuras.

Palavras chave: crescimento gengival, fenitoína, Ki-67,

INTRODUÇÃO

O crescimento gengival (CG) induzido por medicamentos é uma reação adversa associada ao uso sistêmico de diferentes tipos de drogas (Bharti & Bansal, 2013). Este efeito colateral tem sido relacionado principalmente a agentes imunossupressores (ciclosporina, tacrolimus, sirolimus) (Costa, 2006; Cota, 2010), anti-hipertensivos bloqueadores de canais de cálcio (nifedipina, verapamil, diltiazem, amlodipina) (Guare, 1998; McLeod, 2009) e anticonvulsivantes (fenitoína, valproato de sódio) (Correa et al, 2011). Entre as drogas que induzem o CG, destaca-se a fenitoína.

A fenitoína é utilizada em pacientes com condição epilética parcial simples ou complexa, generalizada secundariamente ou tônico-clônica generalizada (Treiman, 1987; Trevisol-Bittencourt et al, 1999). A epilepsia é o mais comum dos distúrbios neurológicos crônicos graves. Estima-se que cerca de 30 a 50% dos pacientes que fazem uso da fenitoína desenvolvam alterações gengivais significativas (Modeér et al, 2000).

O CG pode causar um comprometimento funcional e estético do paciente, podendo dificultar a higiene oral, gerar sangramento, odor desagradável, e até prejudicar a alimentação e a estética (Matsumura, 2012; Bharti & Bansal, 2013), além de afetar a autoestima e o estado psicológico do paciente. Os efeitos colaterais associados ao uso da fenitoína muitas vezes pode dificultar o seu uso prolongado, mesmo que o controle das crises seja satisfatório. Assim, controlar os efeitos colaterais torna-se importante para evitar que se perca a estabilidade do tratamento. Nesse sentido, o entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese do CG é crucial.

Muitos estudos têm se concentrado no papel das citocinas inflamatórias e fatores de crescimento na patogênese do CG medicamentoso. Foi demonstrado que a fenitoína, a nifedipina e a ciclosporina podem regular a expressão de citocinas no tecido gengival (Guncuet al, 2006). As três classes de fármacos relacionadas ao CG interferem no metabolismo do cálcio, induzindo uma diminuição no fluxo celular de Ca^{2+} , que leva a uma redução na absorção do ácido fólico, limitando, a produção da colagenase ativa (Correa et al, 2011; Bharti & Bansal, 2013).

A fenitoína induz a resposta imune de células Th2 e macrófagos. Estes são responsáveis por aumentar os níveis de IL-10, FGF e TGF- β , tornando a fenitoína capaz de alterar a resposta inflamatória (Huang et al, 2003, Okada et al, 2001). Dentre as citocinas e fatores de crescimento que são encontrados em níveis aumentados podem ser destacados ainterleucina6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1), fator de crescimento B derivado de plaqueta (PDGF- β), fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2), fator transformador de crescimento β (TGF- β) e fator de crescimento conjuntivo (CTGF) (Correa et al, 2011).

Além disso, a expressão do antígeno Ki-67 foi observada nos núcleos de células em proliferação localizados nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, e pode ser um dos marcadores para o estado de crescimento do tecido (Saito et al., 1999).

Apesar de diferentes estudos na literatura, os mecanismos envolvidos na patogênese do CG ainda não foram totalmente elucidados. Assim, o objetivo deste foi avaliar e comparar os níveis da citocina IL-10, dos fatores de crescimento TGF- β e FGF, a expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 e da contagem celular de infiltrado inflamatório em amostras de tecido com CG induzido pela fenitoína com amostras de tecido gengival de pacientes saudáveis sem uso de fenitoína e sem CG.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho de estudo e estratégia amostral

O presente estudo apresentou um desenho transversal, incluindo indivíduos medicados com o anticonvulsivante fenitoína, que apresentavam CG (grupo caso), e indivíduos sem esta medicação e sem crescimento gengival (grupo controle).

A amostra caracterizou-se por uma amostra de conveniência, sendo os indivíduos selecionados na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e Faculdade de Medicina da UFMG, durante o período de janeiro de 2013 a julho de 2013.

Grupo caso

A amostra para o grupo caso incluiu 9 indivíduos entre 13 e 57 anos de idade ($37,53 \pm 14,20$), pacientes do Ambulatório Bias Fortes do Hospital das Clínicas da UFMG, que faziam uso regular de fenitoína e apresentavam crescimento gengival clinicamente significativo e necessitavam de tratamento cirúrgico.

A avaliação do CG foi realizada pelo método visual (Costa et al. 2006; Costa et al. 2007; Cota et al; 2008), em todas as papilas presentes. Os escores foram estabelecidos de acordo com Seymour et al. (1985). Resumidamente, escores de 0 a 5, dependendo da soma do crescimento horizontal (escores de 0 a 3) e vertical (escores de 0 a 2), foram atribuídos a cada papila bucal e lingual de todos os dentes presentes. Assim, de acordo com o número de dentes presentes, o escore obtido era expresso em percentual em relação aos escores máximo que pudesse ser obtido. Escores $\geq 30\%$ foram considerados clinicamente significativos como previamente estabelecido (Thomason et al, 1993).

Como critérios de inclusão, os indivíduos deveriam apresentar no mínimo 15 dentes e estar sob uso da droga por no mínimo 3 meses. Pacientes fumantes, indivíduos em uso de antibióticos até 3 meses anteriores ao estudo, e indivíduos com alterações sistêmicas que poderiam influenciar a condição gengival (hipofosfatasia, histiocitose X, síndrome de Down, síndrome de Papillon-Lefevre, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Chediak-Higashi, neutropenia, deficiência de adesão dos leucócitos, leucemias, infecção pelo vírus HIV, diabetes mellitus) foram excluídos do estudo.

Grupo controle

Foram selecionados 15 pacientes controles com idade entre 18 e 69 anos ($25,22 \pm 13,05$). Os controles foram pacientes sistemicamente saudáveis sem uso de fenitoína, das clínicas de Cirurgia e Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFMG, com necessidade de exodontia de terceiros molares ou de pré-molares com finalidade ortodôntica e também tratamento cirúrgico estético por gengivectomia e gengivoplastia (erupção passiva alterada). Foram excluídos do grupo controle pacientes fumantes, indivíduos em uso de antibióticos até 3 meses anteriores ao estudo, e indivíduos com alterações sistêmicas que poderiam influenciar a condição gengival (hipofosfatasia, histiocitose X, síndrome de Down, síndrome de Papillon-Lefevre, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Chediak-Higashi, neutropenia, deficiência de adesão dos leucócitos, leucemias, infecção pelo vírus HIV, diabetes mellitus).

É importante ressaltar que as amostras de tecido gengival foram removidas durante o ato cirúrgico sem nenhum malefício para o paciente.

Considerações éticas

Os participantes foram devidamente esclarecidos e informados sobre a pesquisa, seus métodos e objetivos, sendo incluídos somente após a obtenção de um consentimento livre e informado devidamente assinado (Anexo 01).

Este estudo foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais COEP/UFMG (número CAAE: 30941914.7.0000.5149).

Após os exames e coleta dos dados, os participantes foram devidamente orientados em relação a sua condição gengival, etiologia e possibilidades de tratamento. Todos os indivíduos do grupo caso foram encaminhados para tratamento nas clínicas de Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFMG, sendo garantido acesso direto à instituição e gratuidade de serviço.

Todas as informações colhidas tiveram finalidade exclusivamente científica e a não identificação do paciente na pesquisa foi preservada. A participação no estudo pode ser cancelada e o consentimento retirado pelo paciente a qualquer momento da pesquisa. Foi assegurado o encaminhamento para tratamento mesmo em caso de abandono da pesquisa.

Coleta e armazenamento das amostras

As amostras de tecido gengival foram removidas durante o ato cirúrgico que cada paciente necessitava, em condições adequadas de assepsia e biossegurança. O tecido foi dividido em dois fragmentos, sendo um fragmento acondicionado em Eppendorf estéril seco à temperatura de -80°C e o outro fragmento acondicionado em Eppendorf contendo solução de formaldeído tamponado 10% (p/v), e enviados para realização dos testes de ELISA e imunohistoquímica, respectivamente.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

A concentração das citocinas IL-10, TGF- β e FGF foram mensuradas nos tecidos gengivais por ELISA, utilizando kits disponíveis comercialmente (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

O teste foi realizado de acordo com as normas do fabricante. Em resumo, as amostras de tecido foram pesadas, homogeneizadas mecanicamente em solução tampão (0.4 mM NaCl, 10 mM NaPO₄, pH 7.4) contendo inibidores de proteases (0.1 mM phenylmethylsulfonyl — PMSF fluoride — 0.1 mM benzethoniumchloride, 10 mM EDTA e 0.01 mg/ml Laprotinin A) e Tween 20 (0.05%), pH 7.4 (normalização: 1000 μ L de solução por 100 mg de tecido húmido), e centrifugada (10,000 rpm, 10 min. 4°C).

Cada citocina foi detectada por um anticorpo anticitocina marcado com peroxidase de rabano monoclonal. O OPD (o-phenylenediaminedihydrochloride, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) kit de substrato de peroxidase foi utilizado para determinar a quantidade de peroxidase ligada a cada sitio. A reação foi parada pela adição de ácido sulfúrico 1M (H₂SO₄). As placas foram lidas a 492 nm. Os dados foram determinados utilizando uma curva padrão preparada para cada teste e expressa em picogramas de citocinas/quimiocinas por 100mg de tecido.

Análise Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi executado como previamente descrito por Costa et al. 2010. Para marcador de proliferação Ki-67 (MKI67), os cortes foram imersos em tampão de citrato (pH 6,0), durante 25 minutos. As lâminas foram incubadas com anticorpos monoclonais de rato seguintes as principais: anti-humano Ki-67 (clone MM1; Novocastra, Newcastle, Reino Unido, pelo 1:100). As secções que contêm

anticorpos anti-KI-67 foram incubado com um Kit LSAB (K0492; Dako). Os controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário, o qual foi substituído com 1% de solução salina tamponada com fosfato com albumina de soro de bovino e pré-imune de soro de rato (X501-1; Dako).

O número de células Ki-67 foi determinada na camada basal e suprabasal de tecido epitelial dos grupos casos e controles, usando microscópio de luz e uma retícula de integração (Axioskop 40 ZEISS; Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). Todas as células foram contadas em dez campos representativos e consecutivos em um microscópio de alta potência (x400) e com este aumento, cada campo tinha uma área de $0,0961\text{m}^2$. A média de células coradas foi obtida dividindo o número de células positivas pela área total (0.961mm^2). Todas as medições foram feitas pelo mesmo examinador seguindo a calibração.

Avaliação do Infiltrado Inflamatório

As amostras de tecido gengival também foram fixadas em formalina a 10% tamponada, embebidos em parafina e cortado longitudinalmente ($3\mu\text{m}$). Os cortes foram desparafinados, reidratados e corados com H & E para a avaliação do infiltrado inflamatória. As células inflamatórias foram contadas em quatro campos em duas seções independentes (total de área avaliada: $\sim 1\text{mm}^2$), utilizando-se microscópio de luz (Axioskop 40 ZEISS; Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) com aumento de 400x. Os dados foram expressos como o total de células inflamatórias / campo.

Análise estatística

Todos os dados coletados foram transcritos para uma planilha e analisados com o software SPSS 17 (Statistical Package for Social Sciences Inc., Chicago, IL, USA). A normalidade das variáveis foi testada através do teste Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors. Casos e controles foram comparados em relação a variáveis de interesse pelo teste de Mann-Whitney. A correlação entre a expressão de Ki-67 com os níveis da citocina IL-10, dos fatores de crescimento TGF- β e FGF, e contagem de células do infiltrado inflamatório foi testada pela correlação de Spearman. Os resultados foram considerados significativos se $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados da comparação dos grupos caso e controle em relação aos níveis de IL-10, TGF- β e FGF, e a contagem de células do infiltrado inflamatório pode ser visualizada no Gráfico 1, bem com a expressão de Ki-67 no Gráfico 2. A análise quantitativa não revelou diferença significativa entre os níveis das citocinas e da contagem do infiltrado inflamatório entre os dois grupos. A expressão da proteína Ki-67 foi significativamente diferente entre o grupo caso e o grupo controle, revelando uma maior contagem de células marcadas com Ki-67 no grupo caso ($p < 0,001$). Na figura 1 é possível observar imagens histológicas com a coloração imunohistoquímica para ki-67 nos queratinócitos da camada basal e suprabasal de pacientes do grupo controle e pacientes grupo caso, mostrando a variação quantitativa dos núcleos celulares caracteristicamente corados pelo ki-67.

Os resultados da correlação entre a expressão da proteína Ki-67 com os níveis de IL-10, TGF- β , FGF e infiltrado inflamatório podem ser visualizados na Tabela 1. Não houve correlações significativas entre nenhuma das variáveis avaliadas.

DISCUSSÃO

Embora os mecanismos envolvidos na patogênese do CG não sejam totalmente conhecidos, este efeito colateral medicamentoso parece ser induzido por um rompimento da homeostase entre a síntese e a degradação de colágeno e outros componentes da matriz extracelular, bem como entre outros fenômenos de proliferação e apoptose celulares envolvendo epitélio e tecido conjuntivo gengivais (Buduneli et al, 2007; Kantarci et al. 2007; Bharti & Bansal, 2013). Investigações sobre a patogênese do CG suportam a hipótese que esta alteração é multifatorial, envolvendo diferentes interações entre diferentes moléculas (Bharti & Bansal, 2013).

Os achados do presente estudo demonstraram uma maior expressão da proteína Ki-67 em tecidos com CG induzidos pela fenitoína quando comparados a tecidos sem CG, indicando um índice proliferativo epitelial mais baixo nos controles e sugerindo uma atividade mitótica aumentada nos casos. De fato, um aumento de células mitóticas tem sido relatado em amostras de tecido com CG, bem como um aumento epitelial associado a um aumento de atividade mitótica de ceratinócitos avaliados pela marcação da proteína Ki-67 (Saito et al, 2000, Nurmenniemi et al, 2001). Adicionalmente, o estudo de Buduneli et al. (2007) indicou uma expressão muito acentuada da proteína Ki-67 em ceratinócitos, leucócitos e fibroblastos, juntamente com um aumento na razão das células em divisão, em casos de CG induzido pela fenitoína e nifedipina. Em contrapartida, uma expressão similar de Ki-67 entre casos de CG e controles já foi também reportada (Castro et al., 2010).

O fator de crescimento de fibroblasto (FGF) exibe potente atividade angiogênica e capacidade mitogênica sobre células mesênquimais (Kitamura et al. 2010), podendo ser secretado por macrófagos, mastócitos, células endoteliais e fibroblastos. Alguns estudos sugeriram o envolvimento do FGF na proliferação

celular e metabolismo do tecido conjuntivo gengival (Hong & Trackman, 2002; Yoshida et al. 2005). Entretanto, os níveis de FGF encontrados no presente estudo não mostraram diferenças significativas entre caso de CG e controles, corroborando os achados de Sanaie (2000), que não encontraram expressão significativa nos níveis FGF em amostras de CG.

O estudo de Yoshida et al. (2005) também sugere o envolvimento do TGF- β na proliferação de células do tecido gengival. Os níveis de TGF- β no presente estudo, assim como o FGF, também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos caso e controle. Em contrapartida, diferentes estudos tem sugerido a participação deste fator de crescimento na patogênese do CG induzido por diferentes medicamentos, através da ativação de fibroblastos com diferentes fenótipos secretores (Pisoschi et al., 2014), do aumento da expressão de periostin pelos fibroblastos (Kim et al., 2013) e da intensificação do CTGF (fator de crescimento do tecido conjuntivo) (Nițulescu et al., 2012). O TGF- β é secretado por vários tipos celulares e apresenta um papel importante na regulação do metabolismo de colágeno nos tecidos conjuntivos, estimulando a biossíntese de colágeno e lisiloxidase (Hong et al, 1999). Entretanto, foi sugerido que os efeitos de TGF- β podem ser considerados baixos nos tecidos gengivais, quando comparado a outros tecidos conjuntivos (Feres-Filho et al, 1995). Mesmo assim, o uso de agentes que possam bloquear o TGF- β tem sido sugerido como um possível ferramenta terapêutica para o controle do CG (Subramani et al., 2013).

A fenitoína parece ser capaz de induzir uma resposta imune de células Th2 e macrófagos, levando a um aumento dos níveis de FGF, TGF- β e IL-10 (Huang et al, 2003, Okada et al, 2001). A IL-10 é conhecida originalmente como fator inibidor da síntese de citocinas, apresentando propriedades imuno-regulatórias e anti-

inflamatórias pela regulação da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e expansão de células T (de Vries, 1995). Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de IL-10 nas amostras de tecido gengival entre casos e controles. Dentro da concepção multifatorial da patogênese do CG, alguns fatores genéticos têm sido investigados e o polimorfismo na região promotora do gene da IL-10 foi associado a uma susceptibilidade aumentada ao CG (Luo et al. 2013).

De forma geral, os resultados do presente estudo demonstraram que os níveis encontrados de IL-10, TGF- β e FGF não foram diferentes entre casos e controles, sugerindo que os mecanismos envolvidos na patogênese do CG induzido pela fenitoína podem não envolver diretamente a participação destas citocinas estudadas. Os estudos atuais levam a compressão que os mecanismos envolvidos na patogênese do crescimento gengival podem estar relacionados a efeitos indiretos das diferentes drogas, como a fenitoína, ciclosporina e nifedipina, que de alguma forma modulam a resposta imune inata e adquirida e o desequilíbrio de citocinas. Este desequilíbrio combinado à resposta específica das células gengivais é sugerido como um mecanismo importante para conduzir e resultar no CG (Sume et al. 2010). Tem sido advogado que a presença, e mesmo a incidência, de diferentes citocinas em tecidos gengivais crescidos está associada a diferentes mecanismos (Vahabi et al., 2014). Assim, estudos futuros devem investigar a participação de outras moléculas e suas vias e mecanismos envolvidos nas alterações gengivais induzidas por medicamentos.

Podemos concluir que amostras de tecido com CG de pacientes tratados com fenitoína apresentaram maior expressão da proteína marcadora Ki-67, quando comparados com tecidos gengivais saudáveis, indicando maiores índices de

atividade mitótica. Embora o tamanho da amostra possa ser considerado uma limitação do presente estudo, seus achados sugerem a proliferação epitelial como uma importante característica do CG induzido pela fenitoína. Assim, estudos futuros deveriam investigar os fenômenos de proliferação e apoptose celulares envolvendo epitélio. Além disso, a utilização de um grupo controle de pacientes sem CG medicados com fenitoína poderia ser uma estratégia importante, embora, por questões éticas, a coleta de amostras de tecido neste novo grupo de pacientes é dificultada.

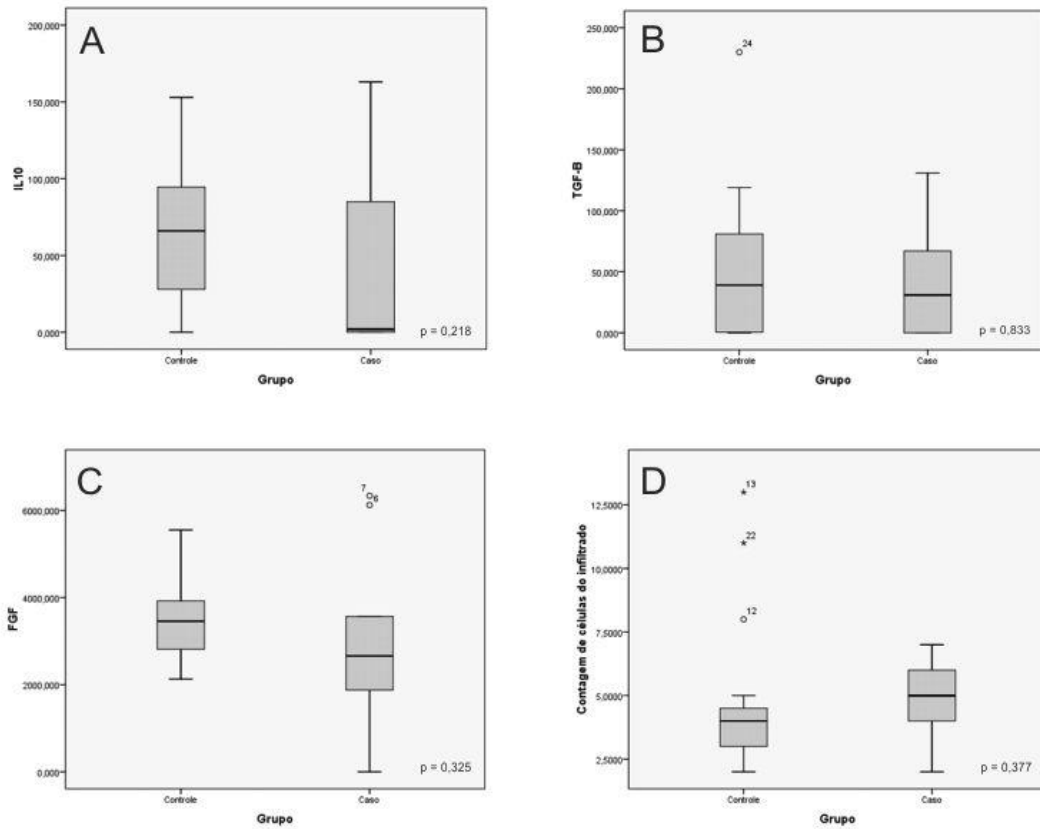


Gráfico 1. Comparação entre casos e controles, respectivamente, em relação a (valores médios \pm s.d.): A) IL-10 ($44,78 \pm 62,15$ x $66,27 \pm 47,40$; $p = 0,218$); B) TGF- β ($43,78 \pm 48,59$ x $53,33 \pm 65,26$, $p = 0,833$); C) FGF ($3012,85 \pm 2177,30$ x $3455,95 \pm 906,74$, $p = 0,325$); D) contagem de células do infiltrado ($4,78 \pm 1,64$ x $4,87 \pm 3,23$, $p = 0,377$); teste Mann-Whitney.

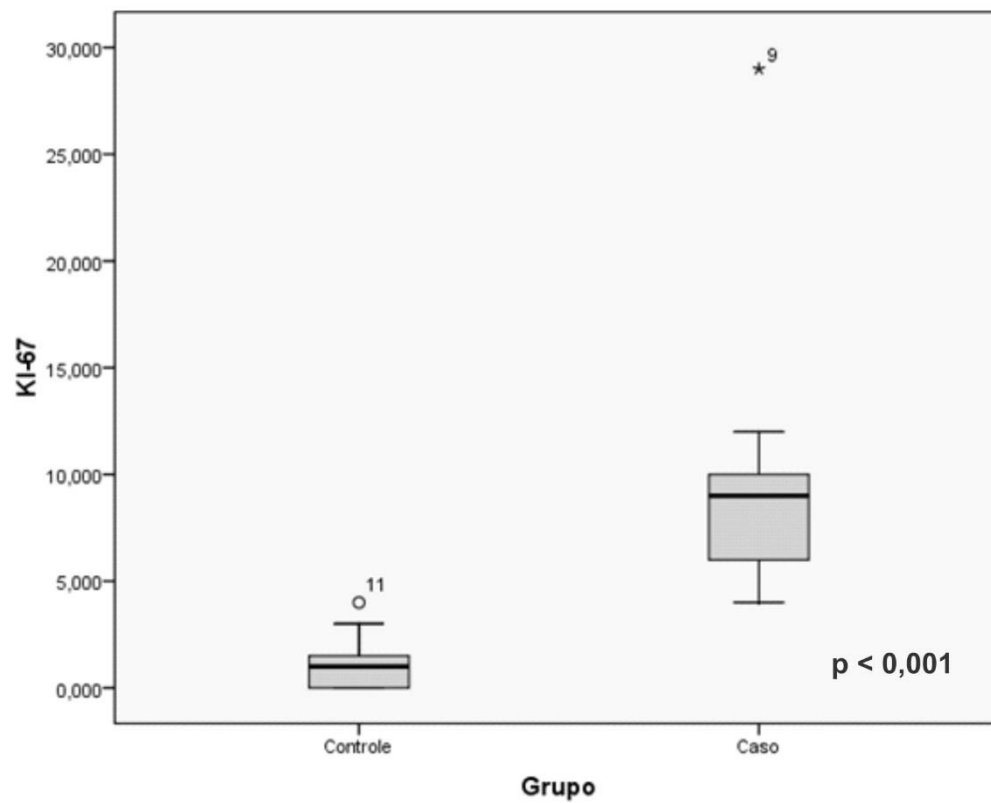


Gráfico 2. Comparação entre casos e controles, respectivamente, em relação a (valores médios \pm s.d.) Ki-67 ($10,59 \pm 7,55$ x $1,55 \pm 1,27$, $p < 0,001$); teste Mann-Whitney.

Tabela 1. Correlações entre a expressão de Ki-67 e os níveis de IL-10, TGF- β , FGF, e contagem de células do infiltrado inflamatório.

Variáveis	Ki-67	p*
IL-10	-0,329	0,387
TGF-β	-0,103	0,793
FGF	-0,017	0,966
Contagem de células do Infiltrado	0,124	0,750

*correlação de Spearman.

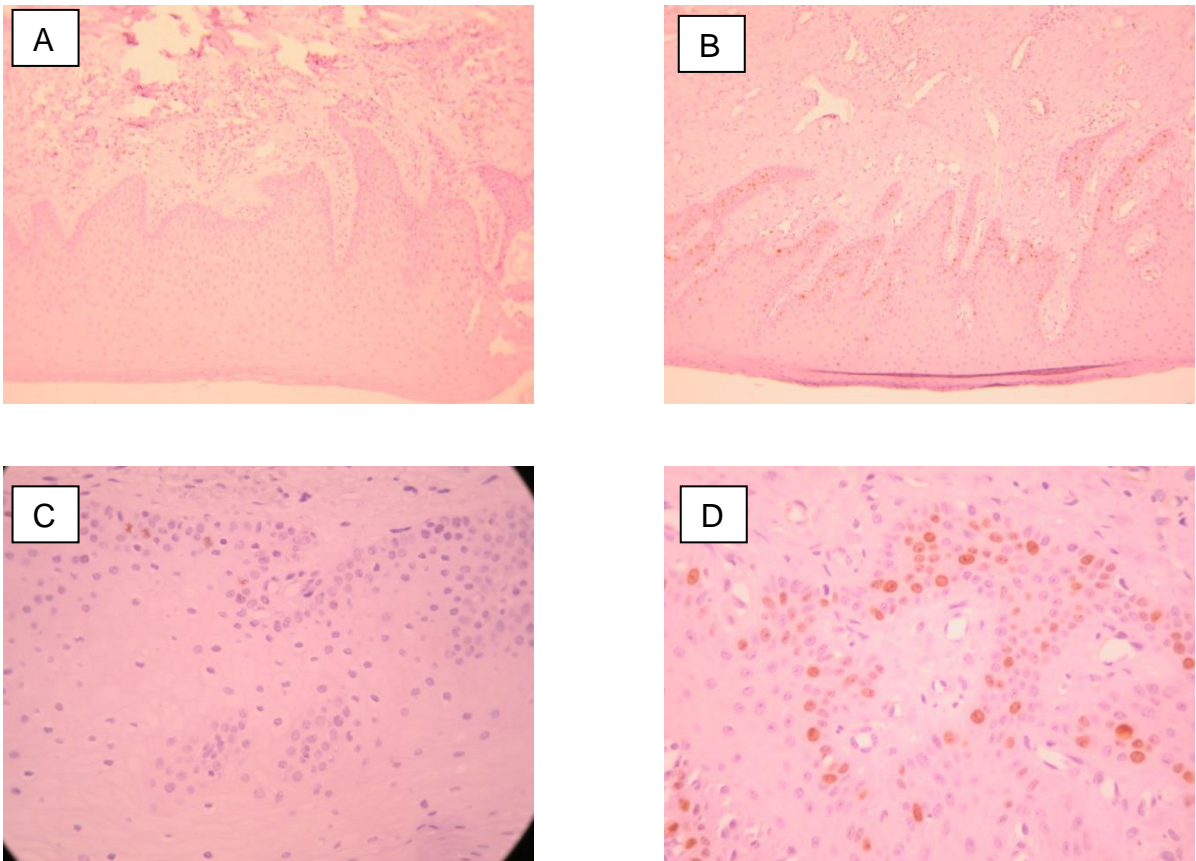


Figura 1. Coloração imunohistoquímica para Ki-67 nos queratinócitos da camada basal e suprabasal de pacientes do grupo controle (A e C) e pacientes grupo caso (B e D). (Coloração imunohistoquímica, aumento original de 100x para A e B, aumento de 400x para C e D).

REFERÊNCIAS

1. Bharti V, Bansal C. Drug-induced gingival overgrowth: The nemesis of gingiva unravelled. *J Indian Soc Periodontol*. 2013; 17(2):182-187.
2. Buduneli N, Buduneli E, Cinar S, Lappin D, Kinane DF. Immunohistochemical evaluation of Ki-67 expression and apoptosis in cyclosporin A-induced gingival overgrowth. *J Periodontol*. 2007; 78(2):282-289.
3. Castro LA, Elias LSA, Oton-Leite AF, Spindula-Filho JV, Leles CR, Batista AC, Mendonça EF. Long-term effects of nifedipine on human gingival epithelium: a histopathological and immunohistochemical study. *Journal of Oral Science*. 2010; 52(1):55-62.
4. Correa JD, Queiroz-Junior CM, Costa JE, Teixeira AL, Silva TA. Phenytoin-induced gingival overgrowth: a review of the molecular, immune, and inflammatory features. *ISRN Dentistry*. 2011; 2011:1-8.
5. Costa FO, Ferreira SD, Cota LOM, Costa JE, Aguiar MA. Prevalence, severity and risk variables associated with gingival overgrowth in renal transplant subjects treated under tacrolimus or cyclosporin regimens. *J Periodontol*, 2006; 77:969-975.
6. Costa FO, Ferreira SD, Lages EJP, Costa JE, Oliveira AMSD, Cota LOM. Demographic, pharmacologic, and periodontal variables for gingival overgrowth in subjects medicated with cyclosporin in the absence of calcium channel blockers. *J Periodontol*. 2007; 78(2):254-251.
7. Costa NL, Alencar R de C, Valadares MC, Silva TA, Mendonça EF, Batista AC. The clinicopathological significance of the expression of Granzyme B in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2010;46:185-189.

8. Cota LOM, Aquino DR, Franco GCN, Cortelli JR, Cortelli SC, Costa FO. Gingival overgrowth in subjects under immunosuppressive regimens based on cyclosporine, tacrolimus, or sirolimus. *Journal of Clinical Periodontology*. 2010; 37:894-902.
9. Cota LOM, Oliveira APL, Costa JE, Cortelli SC, Costa FO. Gingival status of Brazilian renal transplant recipients under sirolimus-based regimens. *J Periodontol*. 2008; 79(11): 2060-2068.
10. de Vries JE. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med*. 1995; 27(5):537-541.
11. Feres-filho EJ, Choi YJ, Han X, Takala TE, Trackman PC. Pre- and post-translational regulation of lysyl oxidase by transforming growth factor-beta 1 in osteoblastic MC3T3-E1 cells. 1995; 270:30797-30803.
12. Guare RO, Franco VB. Hiperplasia gengival em crianças: uso de anticonvulsivantes e higiene oral. *Rev Odontol Univ São Paulo*, 1998; 12(1): 39-45.
13. Güncü GN, Caglayan F, Dinçel A, Bozkurt A, Saygi S, Karabulut E. Plasma and gingival crevicular fluid phenytoin concentrations as risk factors for gingival overgrowth. *J Periodontol*. 2006; 77(12):2005-2010.
14. Hong HH, Trackman PC. Cytokine regulation of gingival fibroblast lysyl oxidase, collagen, and elastin. *J Periodontol*. 2002; 73(2):142-152.
15. Hong HH, Uzel MI, Duan C, Sheff MC, Trackman PC. Regulation of lysyl oxidase, collagen, and connective tissue growth factor by TGF-beta1 and detection in human gingiva. *Lab Invest*. 1999; 79(12):1655-1667.
16. Huang WT, Lu HK, Chou HH, Kuo MYO. Immunohistochemical analysis of Th1/Th2 cytokine profiles and androgen receptor expression in the

- pathogenesis of nifedipine-induced gingival overgrowth. *J Periodonto res* 2003; 38:422-427.
17. Kantarci A, Augustin P, Firatli E, Shef MC, Hasturk H, Graves DT, Trackman PC. Apoptosis in gingival overgrowth tissues. *J Dent Res*. 2007; 89(9):888-892.
18. Kim SS, Jackson-Boeters L, Darling MR, Rieder MJ, Hamilton DW. Nifedipine induces periostin expression in gingival fibroblast through tgf-beta . *J Dent Res*. 2013; 92(11):1022-1028.
19. Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, hara Y, Sakagami R, Hirofuji T, Hamachi T. FGF-2 Stimulate periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical Trial. *J Dent Res*. 2011; 90(1):35-40.
20. Luo Y, Gong Y, Yu Y. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms are associated with cyclosporin A-induced gingival overgrowth in renal transplant patients. *Arch Oral Biol*. 2013; 58(9):1199-1207.
21. Matsumura M, Suzuki Y, Yamagishi M, Kawano M. Nifedipine-induced gingival hypertrophy. *Intern Med*. 2012; 51(1):121.
22. McLeod DE, Stoeckel D, Contreras J, Reyes E. Severe postpartum gingival enlargement. *J Periodontol*. 2009; 80:1365-1369.
23. Modeér TG, Brunius M, Iinuma M, Lerner UH. Phenytoin potentiates interleukin-1- induced prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts. *Br. J Pharmacol*. 1992; 29:491-499.
24. Nițulescu EA, Crăițoiu MM, Baniță MI, Drăghici E, Crăițoiu Ș. The involvement of $\text{TGF-}\beta 1$ and CTGF in regional gingival overgrowth. *Rom J Morphol Embryol*. 2013; 53(1):143-150.

25. Nurmenniemi PK, Pernu HE, Knuutila ML. Mitotic activity of keratinocytes in Nifedipine- and immunosuppressive medication-induced gingival overgrowth. *J Periodontol.* 2001; 72(2):167-173.
26. Okada K, Sugiura T, Kuroda E, Tsuji S, Yamashita U. Phenytoin promotes Th2 type immune response in mice. *Clin Exp Immunol* 2001; 124:406-413.
27. Pisoschi CG, Stănciulescu CE, Andrei AM, Berbecaru-Iovan A, Munteanu C, Popescu F, BaniȚă IM. Role of transformation growth factor β -connective tissue growth factor pathway in dihydropyridine calcium channel blockers-induced gingival overgrowth. *Rom J Morphol Embryol.* 2014; 55(2):285-290.
28. 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.* 1999; 70(6):581-586.
29. Saito K, Mori S, Tanda N, Sakamoto S. Immunolocalization of cMyc and bcl-2 proto-oncogene products in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J Periodontol.* 2000; 71(1):44-49.
30. Sanaie AR. KGF and FGF-10 expression in human gingival fibroblast cells by serum, pro-inflammatory cytokines and drugs that are associated with gingival overgrowth. [dissertação de mestrado]. Vancouver: The University of British Columbia; 2000.
31. Seymour RA, Smith DG, Turnbull DN. The effects of phenytoin and sodium valproate in the periodontal health of adult epileptic patients. *J Clin Periodontol.* 1985; 12:413-419.
32. Subramani T, Rathnavelu V, Alitheen NB. The possible potential therapeutic targets for drug induced gingival overgrowth. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013.

33. Thomason JM, Seymour RA, Rice N. The prevalence and severity of cyclosporin and nifedipine induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1993; 20(1):37-40.
34. Trackman PC, Kantarci A. Connective tissue metabolism and gingival overgrowth. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15:165-175.
35. Treiman DM. Efficacy and safety of antiepileptic drugs: a review of controlled trials. *Epilepsia*. 1987; 28(S3):1-8.
36. Trevisol-Bittencourt PC, da Silva VR, Molinari MA, Troiano AR. Phenytoin as the first option in female epileptic patients? *Arq. Neuropsiquiatr*. 1999; 57(3B):784-786.
37. Vahabi S, Salman BN, Rezazadeh F, Namdari M. Effects of cyclosporine and phenytoin on biomarker expressions in gingival fibroblasts of children and adults: an in vitro study. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2014; 25(2):167-173.
38. Yoshida T, Nagata J, Yamane A. Growth factors and proliferation of cultured rat gingival cells in response to cyclosporine A. *J Periodontol Res*. 2005; 40(1):11-19.

6. REFERÊNCIAS

1. AAP - American Academy of Periodontology. Information paper: Drug-associated gingival enlargement. *J Periodontol*. 2004; 75(10):1424-1431.
2. Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. Cellular and molecular immunology. Pennsylvania: W. B. Saunders company, 2000; 4:553.
3. Bolzani G, Della Coletta R, Martelli Junior H, Graner E. Cyclosporin A inhibits production and activity of metalloproteinases by gingival fibroblasts. *J Periodontol Res*. 2000; 35:51-58.
4. Borowicz KK, Banach M. Antiarrhythmic drugs and epilepsy. *Pharmacol Rep*. 2014; 66(4):545-551.
5. Brunet L, Miranda J, Roset P, Berini L, Farre M, Mendieta C. Prevalence and risk of gingival enlargement in patients treated with anticonvulsant drugs. *Eur J Clin Invest*. 2001; 31:781-788.
6. Chae HJ, Ha MS, Yun DH, Pae HO, Chung HT, Chae SW, Jung YK, Kim HR. Mechanism of cyclosporine-induced overgrowth in gingival. *J Dent Res* 2006; 85:515-519.
7. Correa JD, Queiroz-Junior CM, Costa JE, Teixeira AL, Silva TA. Phenytoin-induced gingival overgrowth: a review of the molecular, immune, and inflammatory features. *ISRN Dentistry*. 2011; 2011:1-8.
8. Costa FO, Ferreira SD, Cota LOM, Costa JE, Aguiar MA. Prevalence, severity and risk variables associated with gingival overgrowth in renal transplant subjects treated under tacrolimus or cyclosporin regimens. *J Periodontol*, 2006;77:969-975.

9. Cota LOM, Aquino DR, Franco GCN, Cortelli JR, Cortelli SC, Costa FO. Gingival overgrowth in subjects under immunosuppressive regimens based on cyclosporine, tacrolimus, or sirolimus. *Journal of Clinical Periodontology*. 2010;37:894-902.
10. Cotrim P, Martelli-Junior H, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD. Cyclosporin A induces proliferation in human gingival fibroblasts via induction of transforming growth factor- β 1. *J Periodontol* 2003; 74:1625-1633.
11. Das SJ, Newman HN, Olsen I. Keratinocyte growth factor receptor is up-regulated in cyclosporine A-induced gingival hyperplasia. *J Dent Res*. 2002; 81:683-687.
12. de Waal MR, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991;174:1209-1220.
13. Feres-filho EJ, Choi YJ, Han X, Takala TE, Trackman PC. Pre- and post-translational regulation of lysyl oxidase by transforming growth factor-beta 1 in osteoblastic MC3T3-E1 cells. 1995; 270:30797-30803.
14. Guare RO, Franco VB. Hiperplasia gengival em crianças: uso de anticonvulsivantes e higiene oral. *Rev Odontol Univ São Paulo*, 1998; 12(1): 39-45.
15. Güncü GN, Caglayan F, Dinçel A, Bozkurt A, Saygi S, KarabulutE. Plasma and gingival crevicular fluid phenytoin concentrations as risk factors for gingival overgrowth. *J Periodontol*. 2006; 77(12):2005-2010.
16. International League Against – Epilepsy Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. Commission on Epidemiology and Prognosis, International League Against. *Epilepsia*. 1993; 34(4):592-596.

17. Hassel TM, Hefti AF. Drug-induced gingival overgrowth. Old problem, new problem. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991; 2:103-137.
18. Hong HH, Uzel MI, Duan C, Sheff MC, Trackman PC. Regulation of lysyl oxidase, collagen, and connective tissue growth factor by TGF-beta1 and detection in human gingiva. *Lab Invest*. 1999; 79(12):1655-1667.
19. Huang WT, Lu HK, Chou HH, Kuo MYO. Immunohistochemical analysis of Th1/Th2 cytokine profiles and androgen receptor expression in the pathogenesis of nifedipine-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2003; 38:422-427.
20. Johnson RB, Zebrowski EJ, Dai X. Synergistic enhancement of collagenous protein synthesis by human gingival fibroblasts exposed to nifedipine and interleukin-1-beta in vitro. *J Oral Pathol Med* 2000; 29:8-12.
21. Kanno CM, Oliveira JA, Garcia JF, Castro AL, Crivelini MM. Effects of cyclosporin, phenytoin and nifedipine on the synthesis and degradation of gingival collagen in tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*): histochemical and MMP-1 and -2 and collagen I gene expression analyses. *J Periodontol*. 2008; 79(1):114-122.
22. Kataoka M, Shimizu Y, Kunikiyo K *ET AL*. Cyclosporin A decreases the degradation of type I collagen in rat gingival overgrowth. *J Cell Physiol* 2000; 182:351-358.
23. Kataoka M, Kido J, Shinohara Y, Nagata T. Drug-induced gingival overgrowth: a review. *Biol Pharm Bull*. 2005; 28(10):1817-1821.
24. Kato T, Okahashi N, Kawai S, Kato T, Inaba H, Morisaki I. Impaired degradation of matrix collagen in human gingival fibroblasts by the antiepileptic drug phenytoin. *J Periodontol*. 2005; 76:941-950.

25. Kimball OP. The treatment of epilepsy with sodium diphenylhydantoinate. *JAMA*. 1939; 112:1244-1245.
26. Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, Hara Y, Sakagami R, Hirofuji T, Hamachi T. FGF-2 Stimulate periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical Trial. *J Dent Res*. 2011; 90(1):35-40.
27. Kramer E, Herman O, Frand J, Leibou L, Schreiber L, Vaknine H. Ki67 as a biologic marker of basal cell carcinoma: a retrospective study. *IsrMedAssoc J*. 2014; 16(4):229-232.
28. Kumar V, Abbas AK, Fausto, N. *Bases patológicas das doenças*. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2005;7:1592.
29. Kuru L, Yilmaz S, Kuru B, Köse KN, Noyan U. Expression of growth factors in the gingival crevice fluid of patients with phenytoin-induced gingival enlargement. *Archives of Oral Biology* 2004; 49:945-950.
30. Lin K, Guilhoto LMFF, Yacubian EMT. DIGO: Drug-induced gingival enlargement – Part II. Antiepileptic drugs: not only phenytoin is involved. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*. 2007; 13:83-88.
31. Luo Y, Gong Y, Yu Y. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms are associated with cyclosporin A-induced gingival overgrowth in renal transplant patients. *Arch Oral Biol*. 2013; 58(9):1199-1207.
32. Majola MP, McFadyen ML, Connoly C, Nair YP, Govender M, Laher MHE. Factors influencing phenytoin-induced gingival enlargement. *J ClinPeriodontol*. 2000; 27:506-512.
33. Mariani G, Calastrini C, Catinci F *ET AL*. Ultrastructural features of CsA-induced gingival hyperplasia. *J Periodontol* 1993; 64:1092-1097.

34. Marshall RI, Bartold PM. Medication induced gingival overgrowth. *Oral Dis.* 1998; 4:130-151.
35. Martorelli SBF, Andrade FBM, Martorelli FO, Marinho EV, Melo JF, Silva ACL. Atypical gingival overgrowth phenytoin-induced – a case report. *Int J Dent.* 2008; 7(1):69-72.
36. Matsumura M, Suzuki Y, Yamagishi M, Kawano M. Nifedipine-induced gingival hypertrophy. *Intern Med.* 2012; 51(1):121.
37. McLeod DE, Stoeckel D, Contreras J, reyes E. Severe postpartum gingival enlargement. *J Periodontol.* 2009; 80:1365-1369.
38. Modeér TG, Brunius M, Iinuma M, Lerner UH. Phenytoin potentiates interleukin-1- induced prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts. *Br. J Pharmacol.* 1992; 29:491-499.
39. Morton RS, Dongari-Bagtzoglou AI. Regulation of gingival fibroblast interleukin-6 secretion by cyclosporine A. *J Periodontol* 1999; 70:1464-1471.
39. Nițulescu EA, Crăițoiu MM, Baniță MI, Drăghici E, Crăițoiu Ș. The involvement of TGF- β 1 and CTGF in regional gingival overgrowth. *Rom J Morphol Embryol.* 2013; 53(1):143-150.
40. Noronha ALA, Borges MA, Marques LH, Zanetta DT, Fernandes, de Boer H. Prevalence and pattern of epilepsy treatment in diferente socioeconomic classes in Brazil. *Epilepsia.* 2007; 48(5):880-885.
41. Okada K, Sugiura T, Kuroda E, Tsuji S, Yamashita U. Phenytoin promotes Th2 type imune response in mice. *Clin Exp Immunol* 2001; 124:406-413.
42. Pedroso ERP, Oliveira RG. *Blackbook – Clinica Medica.* Editora Blackbook. 2007: 597-606.

43. Radwan-Oczko M, Boratyńska M, Zietek M, Zołedziewska M, Jonkisz A. The relationship of transforming growth factor-beta1 gene polymorphism, its plasma level, and gingival overgrowth in renal transplant recipients receiving different immunosuppressive regimens. *J Periodontol.* 2006; 77(5):865-73.
44. Ruhl S, Hamberger S, Betz R, Sukkar T, Schmalz G, Seymour RA, Hiller KA, Thomason JM. Salivary proteins and cytokines in drug-induced gingival overgrowth. *J Dent Res.* 2004; 83(4):322-326.
45. 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.* 1999;70(6):581-586.
46. Sander JW, Shorvon D. Epidemiology of the epilepsies. *J NeurolNeurosurg Psychiatry.* 1996; 61:433-443.
47. Seymour RA, Ellis JS, Thomason JM. Risk factors for drug-induced gingival overgrowth. *J ClinPeriodontol.* 2000; 27:217-223.
48. Souza DF, Chiapinotto GA, Martos J. Indução de hiperplasia gengival associada ao uso de bloqueadores do canal de cálcio. *Revista Sul-Bras Odontol.* 2009; 6(4): 447-453.
49. Spoliodorio LC, Gonzaga HFG, Spoliodoro DMP. Quantitative analysis of gingival tissues of rats treated with phenytoin and cyclosporine. *Pesq. Odontol Bras.* 2000; 14(4):327-333.
50. Takahashi K, MacDonald D, Murayama Y, Kinane D. Cell synthesis, proliferation and apoptosis in human dental periapical lesions analysed by in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Oral Dis* 1999;5:313–320.
51. Trackman PC, Kantarci A. Connective tissue metabolism and gingival overgrowth. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15:165-175.

52. Treiman DM. Efficacy and safety of antiepileptic drugs: a review of controlled trials. *Epilepsia*. 1987; 28(S3):1-8.
53. Trevisol-Bittencourt PC, da Silva VR, Molinari MA, Troiano AR. Phenytoin as the first option in female epileptic patients? *Arq. Neuropsiquiatr*. 1999; 57(3B):784-786.
54. Uzel MI, Kantarci A, Hong HH, Uygur C, Sheff MC, Firatli E. Connective tissue growth factor in phenytoin-induced gingival overgrowth. *J Periodontol*. 2001; 72:921-931.
55. Vieira MLSO, Calvassan KH, Martins W, Grisi MFM, Salvador SL. Hiperplasia gengival medicamentosa: aspecto histológico e tratamento – Revisão de Literatura. Sociedade Brasileira de Periodontologia, 2001.
56. Williamson MS, Miller EK, Plemons J, Rees T, Iacopino AM. Cyclosporine A upregulates interleukin-6 gene expression in human gingival: Possible mechanism for gingival overgrowth. *J Periodontol* 1994; 65:595-903.
57. Wright HJ, Chapple ILC, Blair F, Matthews JB. Crevicular fluid levels of TGF β 1 in drug-induced gingival overgrowth. *Archives of Oral Biology*. 2004; 49:421-425.
58. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008; 214:199-210.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa “**Crescimento gengival em indivíduos medicados com imunossuppressores, anticonvulsivantes ou bloqueadores de canais de cálcio: avaliação clínica, microbiológica e molecular**”. Esta pesquisa será realizada por mim, Rodrigo Lamounier Araújo de Melo Faria, mestrando em Periodontia pela UFMG, sob orientação do professor Dr. Luís Otavio de Miranda Cota. Essa é uma pesquisa sobre o aumento de volume gengival que pode ser induzido pelo uso de medicamentos imunossuppressores, anti-hipertensivos e anticonvulsivantes. Para a realização dessa pesquisa, é necessário obter algumas informações do seu prontuário médico e realizar um exame clínico (avaliação visual da gengiva). Será necessário coletar pequena quantidade de saliva, fluido da gengiva e células da bochecha. Esse exame não oferece nenhum desconforto e nenhum risco à saúde. Quando detectada a presença aumento de volume gengival que necessite de tratamento, você será encaminhado para tratamentos nas clínicas de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Todas as informações coletadas terão finalidade exclusivamente científica e serão mantidas em sigilo. Em hipótese alguma o seu nome será divulgado. A sua participação é voluntária. Você poderá desistir de participar e cancelar o seu consentimento em qualquer momento da pesquisa. A desistência ou a não aceitação em fazer parte dessa pesquisa não irá interferir no seu tratamento na Clínica de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor as causas do crescimento gengival induzido por estes medicamentos, e isto será muito importante para que possamos prevenir o seu desenvolvimento e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

CONSENTIMENTO

Eu, _____, RG: _____

_____ aceito participar deste estudo de forma voluntaria e afirmo que devidamente esclarecido quanto aos objetivos da pesquisa, quanto a preservação da minha imagem e quanto ao destino dos dados coletados. Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas duvidas foram esclarecidas. Autorizo as coletas e a utilização das amostras neste projeto de pesquisa. Sei que posso desistir a qualquer momento sem que isso acarrete qualquer tipo de prejuízo para meu tratamento na Clinica de Odontologia da UFMG. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 20_____

Assinatura do paciente ou responsável

Pesquisador responsável:

Rodrigo Lamounier Araújo de Melo Faria

FO-UFMG – Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha – Tel.: (31) 3409-2412

COEP – Comitê de Ética na Pesquisa. Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II, 2º andar.

Tel.: (31)3409-4592.