NATHALIE PEPE MEDEIROS DE REZENDE

**IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS EPSTEIN-BARR (EBV) E DO
PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE
HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* EM HIPERPLASIAS GENGIVAIS
MEDICAMENTOSAS DE
PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS**

São Paulo

2007

Nathalie Pepe Medeiros de Rezende

**Identificação do vírus Epstein-Barr (EBV) e do Papiloma
Vírus Humano (HPV) através da técnica de hibridização *in situ*
em hiperplasias gengivais medicamentosas de pacientes
transplantados renais**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós - Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Prof. Dra. Marina H. C. G. de Magalhães

São Paulo

2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rezende NPM. Identificação do vírus Epstein-Barr (EBV) e do Papiloma Vírus Humano (HPV) através da técnica de hibridização *in situ* em hiperplasias gengivais medicamentosas de pacientes transplantados renais [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

São Paulo, ____/____/2007

Banca Examinadora

1) Prof (a) Dr (a)._____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

2) Prof (a) Dr (a)._____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

3) Prof (a) Dr (a)._____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

4) Prof (a) Dr (a)._____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

5) Prof (a) Dr (a)._____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Tabajara Medeiros de Rezende, que apesar de não estar mais aqui, com certeza continua torcendo por mim e me incentivando a buscar todos os meus objetivos. Saudades...

À minha mãe, Mirian Pepe Medeiros de Rezende, e aos meus irmãos, Tabajara e Nayara, pessoas cujo apoio, carinho, amor e amizade foram essenciais para o cumprimento de mais esta etapa. Amo muito vocês!!!

Ao meu noivo, Átila Marcondes Paiola, companheiro de todas as horas. Obrigada pelo carinho, apoio e incentivo em seguir sempre adiante. Também te amo!!!

À minha tia Mércia, e à minha avó Magdalena, sempre presentes em nossas vidas e dispostas em nos ajudar em tudo o que fosse preciso. Obrigada!!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães, que confiou em mim e me permitiu desenvolver este projeto. Agradeço por me permitir fazer parte da equipe de professores do curso de Especialização em Pacientes Especiais, do CAPE e do curso de Pós-Graduação em Patologia Bucal. Sem seu apoio incondicional nada disso seria possível, obrigada!

À Profa. Dra. Marília Trierveiller Martins, pela paciência em responder a todas as minhas perguntas (que não foram poucas) durante a rotina, pelo auxílio na parte laboratorial, pela confecção das pranchas fotográficas e pela amizade.

À Profa. Dra. Karem López Ortega, amiga de todas as horas e grande colega de trabalho. Obrigada por compartilhar as oportunidades de trabalho e por ser minha amiga.

Ao colega Paulo Sérgio da Silva Santos, por despertar em mim o interesse pelo paciente transplantado. Seu auxílio e disponibilidade para discutir novos casos e técnicas foram fundamentais para a idéia e confecção deste trabalho.

Ao colega Paulo Henrique Braz Silva, pelo auxílio na realização das reações para o EBV, mas principalmente por tornar os meus finais de semana no laboratório muito mais divertidos!!!

Ao colega Sérgio de Melo Alves Jr. pela realização da análise estatística.

Aos professores da Disciplina de Patologia Bucal, Suzana, Décio, Fábio e Andréa, por todos os conhecimentos compartilhados ao longo destes quatro últimos anos.

Aos professores Ney Soares de Araújo e Vera Cavalcanti de Araújo, exemplos de pesquisadores e professores, abrindo portas a todas as pessoas interessadas em aprender.

Às funcionárias do CAPE, Sandra, Gilmara, Bebel, Leninha, Jeane, Cris, Diva e Gerusa, pelo auxílio em todos os dias de trabalho, mas principalmente por tornarem o CAPE um local muito gostoso para estar e trabalhar.

À técnica da Disciplina de Patologia Bucal, Elisa dos Santos pelo auxílio na parte laboratorial.

À técnica da Disciplina de Patologia Bucal, Edna Toddai (*in memoriam*), pelo auxílio na parte laboratorial deste trabalho e pela companhia durante os finais de semana.

Aos colegas pós-graduandos da Disciplina de Patologia Bucal, em especial Alexandre Fraige, Filipe, Felipe, Fabrício, Carol, Juliana, Karen, Luciana, Tatiana, Renata, Arlindo, Alexander, Katiucha, Flávia, Helder, Camila, Márcia, Thaís, Márcio e Fabiana por percorrermos juntos esses quatro últimos anos.

Às funcionárias da Disciplina de Patologia Bucal, Zilda, Nair, Néia, Bia e Patrícia, sempre prestativas e atenciosas.

Ao Prof. Dr. Thalles de Brito, por ter aberto as portas de seu laboratório no Instituto de Medicina Tropical da USP para que pudéssemos aprender a técnica de hibridização *in situ*.

Às técnicas do Laboratório de Imunopatologia das Doenças Tropicais do Instituto de Medicina Tropical, Ana Maria e Dirce, pelos ensinamentos da técnica de hibridização *in situ*.

À técnica do Laboratório de Patologia das Moléstias infecciosas da FMUSP, Mônica, pelo auxílio na realização da técnica de hibridização *in situ*.

Às funcionárias da secretaria de pós-graduação, Cátia, Nair e Alessandra, sempre prestativas.

À bibliotecária Gláucia pela minuciosa correção deste trabalho.

Aos estagiários do CAPE, pelo auxílio constante.

Aos meus pacientes do CAPE, que tornam o meu dia a dia muito mais feliz!

À CAPES por conceder a bolsa de estudos durante o curso de doutorado.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

Rezende NPM. Identificação do vírus Epstein-Barr (EBV) e do Papiloma Vírus Humano (HPV) através da técnica de hibridização *in situ* em hiperplasias gengivais medicamentosas de pacientes transplantados renais [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

A fim de prevenir a rejeição do órgão transplantado pelo hospedeiro, se faz necessário o uso de drogas imunossupressoras, como a ciclosporina, que pode levar ao aparecimento de efeitos colaterais como hipertensão arterial, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, e hiperplasia gengival medicamentosa (HGM), que pode ser potencializada se bloqueadores de canal de cálcio como a nifedipina forem associados a fim de controlar a pressão arterial. A patogênese da HGM ainda é incerta, entretanto fatores como a presença de cálculo e placa, concentração plasmática da droga, idade e fatores hormonais podem influenciar as características clínicas e o desenvolvimento da HGM. Recentemente, alguns vírus têm sido associados com a HGM. O HPV (Papiloma Vírus Humano) tem sido associado com casos severos de HGM, enquanto que o EBV (Vírus Epstein-Barr) é associado ao aparecimento de desordens linfoproliferativas pós transplante, que se apresentam como HGM. O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência e o grau da HGM em pacientes transplantados renais (TR), identificar o EBV e HPV na HGM destes pacientes, e correlacionar a HGM, índice de placa, presença de cálculo e presença do EBV e HPV nos pacientes TR. Foram examinados os prontuários de 58 pacientes TR atendidos no CAPE-FOUSP, e os dados com relação à medicação imunossupressora em uso e

presença ou ausência de HGM foram registrados. Foram contatados 15 pacientes TR, dos quais foram colhidos dados demográficos, história médica, drogas em uso e história dental. No exame intra-oral foram observados o índice de placa, grau da HGM e presença de cálculo. A HGM foi removida e enviada a Disciplina de Patologia Bucal para análise microscópica. Os espécimes removidos foram comparados com um grupo controle composto por 20 casos de hiperplasia gengival inflamatória. Ambos os grupos foram submetidos ao exame de rotina, enfatizando a presença de coilócitos e a análise molecular, com hibridização *in situ* para o EBV (sondas EBER e Lytic) e HPV (sonda de amplo espectro e tipos 6/11, 16/18 e 31/33 nos casos positivos para a sonda de amplo espectro). 42% dos pacientes apresentaram HGM grau 1, 50% grau 2 e 8% grau 3. Cálculo estava presente em 50% dos pacientes. O índice de placa médio encontrado foi de 72%. Todas as amostras gengivais removidas cirurgicamente apresentaram um quadro histopatológico compatível com HGM. Os coilócitos estavam presentes em 100% dos casos do grupo de estudo e em 80% dos casos do grupo controle. O HPV esteve presente em 20% dos casos do grupo de estudo e em 10% do grupo controle. O EBV estava presente em 100% dos casos do grupo de estudo e em 90% dos casos do grupo controle, para ambas as sondas, entretanto no grupo de estudo foi observada uma expressão maior do EBV, tanto em quantidade de células marcadas, como em áreas mais profundas. Concluimos que a maioria dos pacientes TR apresentou HGM leve a moderada; EBV foi encontrado em todos os pacientes TR, caracterizando uma infecção oportunista, enquanto que o HPV foi encontrado nas mesmas proporções nos pacientes TR e no grupo controle; não foi encontrada correlação entre índice da HGM, índice de placa, presença de cálculo e presença do EBV e HPV

Palavras-Chave: Transplante de rim – imunossupressão – ciclosporina /a – infecções oportunistas – manifestações orais – hiperplasia gengival medicamentosa - HPV – EBV

Rezende NPM. *In situ* hibridization for Epstein-Barr vírus (EBV) and Human Papiloma vírus in drug-induced gingival overgrowth in renal transplantation patients [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

In order to prevent graft rejection in organ transplantation, is necessary the use of immunosuppressive drugs, as cyclosporin, that has several side effects, such as high blood pressure, nephrotoxicity, hepatotoxicity and gingival overgrowth (GO), that can be increased if calcium channel blockers, such as nifedipine, are associated in order to control de blood pressure. The pathogenesis of GO is still uncertain, but some factors such as the presence of calculus and plaque, drug plasmatic concentration, age and hormonal factors can influence the clinical aspects and development of GO. Recently some virus have been associated to GO as well. HPV (Human Papilloma Virus) have been associated to severe cases of GO and EBV (Epstein-Barr Virus) have been associated to posttransplantation lymphoproliferative disorders presenting as GO. The aim of this work was to evaluate GO incidence and score in renal transplant patients (RTP), identify EBV and HPV in GO from RTP, and correlate GO, plaque score, presence of calculus, and presence of EBV and HPV in RTP. We reviewed 58 charts from RTP attending to Special Care Dentistry Center (CAPE-FOUSP). Immunosuppressant drugs and presence or absence of GO were registered. 15 RTP were asked to show up in order to be examined. We collected demographic data, medical history, drugs in use and dental history. In intra-oral exam we observed plaque

score, GO score and presence of calculus. GO were removed and sent to Oral Pathology Department for microscopic analysis. GO was compared to a control group composed by 20 cases of inflammatory gingival hyperplasia and both groups were submitted to routine exam emphasizing the presence of koilocytes and to molecular analysis with *in situ* hybridization for EBV (EBER and Lytic probes) and for HPV (wide spectrum probe and 6/11, 16/18, 31/33 types in cases where wide spectrum were positive). 42% of the patients presented GO score 1, 50% score 2 and 8% score 3. Calculus were presented in 50% of the patients. The average of plaque score was 72%. All GO specimens removed had a histopathological exam compatible with drug induced gingival overgrowth. Koilocytes were presented in 100% of study group (SG) and in 80% of control group (CG). HPV were presented in 20% of the SG and in 10% of the CG. EBV was presented in 100% of SG and in 90% of CG, for both probes, but in SG it could be observed in deeper areas of the epithelium and in a more pronounced expression. We concluded that most RTP presented mild to moderate GO, EBV were found in all RTP, characterizing an opportunistic infection, while HPV were found in the same proportions than in the control group and there were no statistical correlation between GO, plaque score, presence of calculus and presence of EBV and HPV.

Keywords: Kidney transplantation – immunosuppression - cyclosporin A - opportunistic infections – oral manifestations – drug-induced gingival overgrowth – HPV – EBV

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1- Frequência da HGM em pacientes TR do CAPE-FOUSP que fazem uso de ciclosporina e/ou nifedipina.....	63
Figura 5.2 – Frequência de HGM nos pacientes TR do CAPE-FOUSP de acordo com a medicação utilizada.....	63
Figura 5.3 – Grau da hiperplasia gengival medicamentosa dos pacientes analisados no primeiro e segundo exames físicos.....	66
Figura 5.4 – Índice de placa bacteriana nos pacientes analisados.....	68
Figura 5.5 – Características clínicas da hiperplasia gengival medicamentosa em pacientes transplantados renais; A – hiperplasia gengival medicamentosa grau 1, B – hiperplasia gengival medicamentosa grau 2, C – hiperplasia gengival medicamentosa grau 3, D – evidencição de placa bacteriana em paciente com hiperplasia gengival medicamentosa	69
Figura 5.6 – Frequência de casos positivos para o HPV.....	71
Figura 5.7 – Frequência dos casos positivos para o EBV nos grupos de estudo e controle (sonda EBER).....	73
Figura 5.8 - Frequência de casos positivos para o EBV nos grupos de estudo e controle (sonda Lytic).....	74
Figura 5.9 – Frequência de casos com positividade apenas superficial para o EBV (sondas EBER e Lytic).....	74
Figura 5.10 – Fotomicrografias da hiperplasia gengival medicamentosa em pacientes transplantados renais, A – corte histológico corado pela hematoxilina – eosina (aumento original de 25X), B – mesmo corte da figura A, evidenciando a presença de coilócitos (aumento original de 200X), C - marcação positiva para o EBV na técnica de hibridização <i>in situ</i> – sonda EBER (aumento original de 100X), D – mesmo corte da figura C (aumento original 400X), E - marcação positiva para o EBV na técnica de hibridização <i>in situ</i> – sonda Lytic (aumento original de 25X), F - mesmo corte da figura E (aumento original 100X), G - marcação positiva para o HPV na técnica de hibridização <i>in situ</i> – sonda de amplo espectro (aumento original de 100X), H - mesmo corte da figura G (aumento original de 400X).....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Presença de HGM segundo o prontuário de pacientes TR que faziam uso de ciclosporina e/ou nifedipina.....	62
Tabela 5.2 – Características clínicas da HGM, índice de placa e presença de cálculo no primeiro e segundo exames físicos dos pacientes analisados.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Raça Amarela
AAS	Ácido acetilsalicílico
AV	Avermalhado
B	Raça Branca
Bri	Brilhante
CAPE	Centro de Atendimento a Pacientes especiais
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cp	Comprimido
Cut.Sub.	Curetagem subgengival
DP	Doença Periodontal
EBV	do inglês “Epstein-Barr Vírus”, traduzido como Vírus Epstein-Barr
F	Sexo Feminino
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FI	Fibrosa
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FR	Friável
Gen	Generalizada
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HE	Hematoxilina-eosina
HGM	Hiperplasia Gengival Medicamentosa

HPV	do inglês “Human Papillomavirus”, traduzido como Papiloma Vírus Humano
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LI	Lisa
M	Sexo Masculino
MV	Muito verrucosa
N	Raça Negra
NaCl	Cloreto de sódio
NDN	Nada Digno de Nota
OHB	Orientação de Higiene Bucal
Opa	Opaca
Profi	Profilaxia
PV	Pouco verrucosa
RACR	Raspagem e Alisamento Corono – Radicular
RE	Resiliente
RO	Rósea
TBST	do inglês “Tris buffered saline/Tween 20”
TR	Transplantados Renais
TRIS	Tris-hidroximetilainoetano
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μm	Micrômetro
°C	Graus Centígrados
°	Graus
W	Watts
pH	Potencial hidrogeniônico
mM	Milimolar
+	Positivo (a)
®	Marca registrada
>	Maior
<	Menor
X	Vezez
mg	Miligrama
mL	Mililitro
u	Unidades
gr	Grama
Kg	Kilograma

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Ciclosporina.....	22
2.2 Nifedipina.....	24
2.3 Hiperplasia gengival medicamentosa.....	25
2.4 HPV.....	32
2.4.1 HPV em HGM de pacientes transplantados renais.....	37
2.5 EBV.....	40
2.5.1 EBV em HGM de pacientes transplantados renais.....	45
3 PROPOSIÇÃO.....	48
4 CASUÍSTICA - MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 Análise Clínica.....	49
4.1.1 Anamnese.....	50
4.1.2 Exame Físico Intra-bucal.....	50
4.2 Análise Laboratorial.....	53
4.2.1 Análise Histopatológica.....	53
4.2.2 Análise Molecular.....	54
4.2.2.1 identificação do HPV.....	54
4.2.2.2 identificação do EBV.....	58
4.3 análise estatística.....	60
5 RESULTADOS.....	62
6 DISCUSSÃO.....	77
7 CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICES.....	89
ANEXOS.....	105

1 INTRODUÇÃO

O transplante de rim é o tratamento de escolha para o estágio final da insuficiência renal crônica, sendo amplamente utilizado nos dias de hoje. Para prevenir a rejeição do órgão transplantado, é necessária a administração de drogas imunossupressoras, sendo a mais comumente utilizada a ciclosporina A, associada ou não a outras drogas, como os corticosteróides (ODA et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992).

A ciclosporina provoca uma série de efeitos colaterais, entre eles nefrotoxicidade, hipercalcemia, hepatotoxicidade, hipertensão arterial e hiperplasia gengival medicamentosa (BOTHÁ, 1997; BUSTOS et al., 2001; SEYMOUR; JACOBS, 1992; SAGLAM et al., 1996).

Para o controle da hipertensão secundária ao uso da ciclosporina, associam-se drogas bloqueadoras dos canais de cálcio, como a nifedipina, que potencializa a hiperplasia gengival (BOTHÁ, 1997; BUSTOS et al., 2001; NISHIKAWA et al., 1996).

O uso prolongado de drogas imunossupressoras predispõe ao aparecimento de infecções oportunistas bacterianas, fúngicas e virais. Alguns estudos têm demonstrado a relação do HPV com a hiperplasia gengival medicamentosa (HGM) (BUSTOS et al., 2001; SAGLAM et al., 1996), enquanto que outros se preocuparam em demonstrar a presença do EBV (AKINWANDE; KAZEEM; TAIWO, 1995; ODA et al., 1996; RAUT et al., 2000).

Embora o HPV tenha sido identificado na HGM de pacientes transplantados renais (TR), os trabalhos não estabeleceram metodologias adequadas para correlacionar a presença deste vírus com a severidade e características clínicas da

HGM. Já o EBV foi identificado em desordens linfoproliferativas que se iniciaram como uma HGM ou mimetizavam uma, sendo que sua presença nunca foi correlacionada com a severidade da HGM.

Frente a estes aspectos optamos por analisar as características clínicas da hiperplasia gengival medicamentosa de pacientes transplantados renais e a presença do HPV e do EBV nos tecidos gengivais destes pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O transplante de órgãos é uma modalidade de tratamento muito aceita nos dias de hoje para a substituição de órgãos em falência ou sem perspectiva de cura (ANDRÉS, 2005; CIAVARELLA et al., 2007; ODA et al., 1996, SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997), sendo o transplante renal o tratamento de eleição para os estágios finais da insuficiência renal crônica (AL-MOHAYA; DARWAZEH; AL-KHUDAIR, 2002; ANDRÉS, 2005; BRAZ-SILVA et al., 2006).

Para evitar a rejeição do órgão transplantado por parte do hospedeiro, é necessária a administração de drogas imunossupressoras (BRAZ-SILVA et al., 2006; CIAVARELLA et al., 2007; DOUGLAS et al., 1998; GRASSI et al., 2006). A terapia imunossupressora (TI) pode ser única, mas geralmente é composta por mais de uma droga, sendo que as mais comumente utilizadas são a ciclosporina, corticosteróides, azatioprina, (AL-MOHAYA; DARWAZEH; AL-KHUDAIR, 2002; CIAVARELLA et al., 2007; DOUGLAS et al., 1998; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997) e o tacrolimus (FK506) (ANDRÉS, 2005; CHAND; SOUTHERLAND; CUNNINGHAM, 2001; DOUGLAS et al., 1998; MIHATSCH et al., 1998).

As drogas utilizadas na terapia imunossupressora podem provocar diversos efeitos colaterais. Entre eles destacamos o desenvolvimento da hiperplasia gengival medicamentosa (HGM)(CIAVARELLA et al., 2007; DOUGLAS et al., 1998; GRASSI et al., 2006; KING et al., 1994; MIHATSCH et al., 1998; ODA et al., 1996; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992; STRACHAN; BURTON; PEARSON, 2003) e o aumento na suscetibilidade em desenvolver doenças infecciosas oportunistas (AL-MOHAYA; DARWAZEH; AL-KHUDAIR, 2002; EPSTEIN; SHERLOCK;

WOLBER, 1993; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997), principalmente as causadas por fungos e vírus (SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997). O vírus Epstein-Barr, vírus do Herpes Simplex, Papiloma Vírus Humano e Citomegalovírus costumam estar presentes em pacientes normorreativos na fase latente. Em pacientes imunossuprimidos podem sofrer uma reativação, levando ao aparecimento de diversas doenças e lesões (AMMATUNA et al., 2001; DOUGLAS et al., 1998; EPSTEIN; SHERLOCK; WOLBER, 1993; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997).

A associação da imunossupressão medicamentosa dos pacientes TR com o aumento no índice de infecções virais que acometem a mucosa destes pacientes, pode atuar como um fator predisponente para o surgimento de neoplasias malignas orais nos mesmos (SAGLAM et al., 1996; BUSTOS et al., 2001). Diversos autores descrevem uma maior incidência de neoplasias malignas em pacientes TR (ANDRÉS, 2005; ODA et al., 1996; SAGLAM et al., 1996 SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997 ROSE et al., 2006). As neoplasias mais comumente encontradas nestes pacientes são os linfomas (relacionados ao EBV), sarcoma de Kaposi (relacionado ao HHV8) (ANDRÉS, 2005; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997), carcinoma epidermóide e o carcinoma basocelular (SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997)

Optamos por subdividir esta revisão de literatura, de modo que abordaremos as drogas imunossupressoras mais correlacionadas com a HGM (a ciclosporina A e a nifedipina), a HGM, a infecção pelo HPV (e sua correlação com a HGM) e por fim a infecção pelo EBV e sua correlação com a HGM.

2.1 ciclosporina

A ciclosporina A, descoberta em 1972, é um polipeptídeo derivado de produtos metabólicos de dois fungos, *Trichoderma polysporum* e *Cylindrocarpon lucidum* que possui pequeno efeito antimicrobiano, cuja principal característica é a inibição da resposta inflamatória celular (CIAVARELLA et al., 2007; DESAI; SILVER, 1998; GRASSI et al., 2006; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992). A droga foi utilizada clinicamente pela primeira vez em 1978, para a prevenção da rejeição de transplantes de órgãos. A partir de então, tornou-se a droga imunossupressora mais utilizada nestes pacientes, isoladamente, ou associada a corticosteróides (SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992).

Além do uso em pacientes transplantados, a ciclosporina é utilizada para o tratamento de doenças autoimunes (CIAVARELLA et al., 2007; DESAI; SILVER, 1998; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992) como diabetes insulino dependente (DESAI; SILVER, 1998; SAGLAM et al., 1996), psoríase, artrite reumatóide (CIAVARELLA et al., 2007; DESAI; SILVER, 1998; SAGLAM et al., 1996), líquen plano (DESAI; SILVER, 1998), lúpus eritematoso sistêmico (CIAVARELLA et al., 2007; DESAI; SILVER, 1998), e cirrose primária (SAGLAM et al., 1996).

A principal função da ciclosporina é impedir a rejeição do órgão transplantado por parte do hospedeiro. Na ausência da ciclosporina, os linfócitos T reconhecem o enxerto como corpo estranho, ativando macrófagos que produzem e liberam interleucina 1; que por sua vez ativa os precursores dos linfócitos T citotóxicos, que passam a exibir receptores para a interleucina 2. A produção e liberação de interleucina 2 ativa os linfócitos T auxiliares e provoca uma amplificação clonal dos

linfócitos T citotóxicos, que causam lise, mediada por células e perda do enxerto (SEYMOUR; JACOBS, 1992). A ciclosporina atua especificamente sobre os linfócitos T (principalmente em linfócitos T auxiliares), inibindo a produção de citocinas (principalmente inibindo a síntese da interleucina 2), resultando numa depressão da resposta imune celular e da amplificação clonal dos linfócitos T citotóxicos (BOTHÁ, 1997; CIAVARELLA et al., 2007; DOUGLAS et al., 1998; GRASSI et al., 2006; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992).

O pico de concentração plasmática da ciclosporina ocorre de 3 a 4 horas após a sua administração (CIAVARELLA et al., 2007; SAGLAM et al., 1996), com meia vida que varia entre 17 e 40 horas. Uma dose oral de 5 a 15 mg/kg/dia resulta em uma concentração plasmática de 100 a 400 ng/mL, que é o suficiente para manter a imunossupressão das células T (SAGLAM et al., 1996).

Apesar de não apresentar efeito tóxico sobre a medula óssea, a ciclosporina provoca uma série de efeitos colaterais (ODA et al., 1996). Entre eles podemos citar: nefrotoxicidade (CIAVARELLA et al., 2007; DESAI; SILVER, 1998; GRASSI et al., 2006; MIHATSCH et al., 1998; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992), convulsões, tremores nas mãos, parestesia (CIAVARELLA et al., 2007; SEYMOUR; JACOBS, 1992), hiperuricemia, (SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992), hipercalcemia (SAGLAM et al., 1996), hepatotoxicidade, hipertensão (em 38,5% dos pacientes) (CIAVARELLA et al., 2007; DESAI; SILVER, 1998; GRASSI et al., 2006; MIHATSCH et al., 1998; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992), desordens linfoproliferativas pós transplante (ODA et al., 1996; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992), desenvolvimento de infecções bacterianas, virais e fúngicas (SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992), maior incidência de neoplasias malignas como linfomas e carcinomas basocelulares

múltiplos (CIAVARELLA et al., 2007; ODA et al., 1996; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992), anemia, alterações visuais, alterações no trato gastrointestinal, náusea, vômitos, diarreia, perda de apetite (SEYMOUR; JACOBS, 1992), neurotoxicidade e hipertricose (GRASSI et al., 2006; SEYMOUR; JACOBS, 1992).

Na boca o efeito colateral mais freqüente e importante da ciclosporina é o desenvolvimento da hiperplasia gengival medicamentosa (GRASSI et al., 2006; KING et al., 1994; ODA et al., 1996; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992).

2.2 nifedipina

A nifedipina é o bloqueador de canal de cálcio mais utilizado (BOTHA, 1997; DESAI; SILVER, 1998; GRASSI et al., 2006) para controle da hipertensão refratária, insuficiência coronariana crônica e aguda e angina pectoris. Sua eficácia é atingida com baixa dosagem única diária (DESAI; SILVER, 1998).

A nifedipina atua diminuindo a velocidade da troca dos íons cálcio, através dos canais de cálcio presentes na membrana celular (DESAI; SILVER, 1998). Entretanto, ao inibir a entrada de cálcio nas células, também impede os processos cálcio – dependentes, como a ativação da collagenase no fluido extracelular, que é uma das responsáveis pela remodelação do colágeno (DESAI; SILVER, 1998; GRASSI et al., 2006).

A nifedipina pode ser utilizada concomitantemente com a ciclosporina a fim de controlar a hipertensão secundária produzida por esta última (BOTHAS, 1997; DESAI; SILVER, 1998).

Um dos principais efeitos colaterais da nifedipina é a formação da HGM, quadro este que pode ter sua gravidade aumentada quando esta droga está associada à ciclosporina (BOTHAS, 1997; CIAVARELLA et al., 2007; GRASSI et al., 2006),

2.3 hiperplasia gengival medicamentosa (HGM)

Diversas drogas estão associadas com o aparecimento da hiperplasia gengival medicamentosa (HGM), sendo a mais comum a fenitoína (droga anticonvulsivante) (DESAI; SILVER, 1998), seguida pelas drogas imunossupressoras (como a ciclosporina) e bloqueadores de canal de cálcio (como a nifedipina) (BOTHAS, 1997; BUSTOS et al., 2001; DESAI; SILVER, 1998; GRASSI et al., 2006; NISHIKAWA et al., 1996).

A associação da terapia com ciclosporina e a HGM foi notada no começo dos anos 80, quando a droga estava sendo avaliada nos casos de transplante (BUSTOS et al., 2001; DESAI; SILVER, 1998; SEYMOUR; JACOBS, 1992). A HGM causada pela ciclosporina foi primeiramente descrita em 1983, enquanto que a HGM causada pela nifedipina foi descrita em 1984 (DESAI; SILVER, 1998).

A incidência da HGM relacionada à ciclosporina e/ou nifedipina reportada na literatura mundial é variada. São relatadas incidências de 70% (CIAVARELLA et al.,

2007; GRASSI et al., 2006; ODA et al., 1996), 33% (SAGLAM et al., 1996), 30% (SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997), 27% (DESAI; SILVER, 1998), 25 a 81% (BUSTOS et al., 2001; SEYMOUR; JACOBS, 1992), 22% a 81%(KING et al., 1994), 20 a 30% (SEYMOUR; THOMASON; ELLIS, 1996), 2 a 83% (BOTHAS, 1997) e 8 a 85% (STRACHAN; BURTON; PEARSON, 2003), sendo que a incidência é maior em mulheres (DESAI; SILVER, 1998). Alguns autores relatam que a associação da ciclosporina e nifedipina leva à maior incidência de HGM (50%) em relação ao isolado da ciclosporina, com incidência em torno de 50% (KING et al., 1994; NISHIKAWA et al., 1996; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997).

A variação na incidência da HGM pode ser explicada por diversos fatores, entre eles: concentração plasmática da droga (BOTHAS, 1997; CIAVARELLA et al., 2007; KING et al., 1994; SEYMOUR; JACOBS, 1992), duração da terapia, método pelo qual a HGM foi analisada, condição médica pela qual a ciclosporina está sendo utilizada, sexo (CIAVARELLA et al., 2007; KING et al., 1994; SEYMOUR; JACOBS, 1992), idade e algumas condições sistêmicas (por exemplo, pacientes jovens e/ou que sofrem de diabetes do tipo 1 parecem ser mais suscetíveis ao aparecimento da HGM, provavelmente por interação entre a ciclosporina e os hormônios) (DESAI; SILVER, 1998; SEYMOUR; JACOBS, 1992; SEYMOUR; THOMASON; ELLIS, 1996).

A etiologia da HGM ainda é incerta e bastante discutida (CIAVARELLA et al., 2007; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992; SEYMOUR; THOMASON; ELLIS, 1996), entretanto sabe-se que é multifatorial, e que há a influência de fatores genéticos (CIAVARELLA et al., 2007; SEYMOUR; THOMASON; ELLIS, 1996; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997).

Com relação à etiopatogenia da HGM, a ciclosporina parece atuar sobre algumas sub populações de fibroblastos, promovendo a proliferação dos mesmos, com aumento da síntese de proteínas e de colágeno. Ao mesmo tempo, leva à diminuição dos níveis de cálcio livre, impedindo a degradação do colágeno (CIAVARELLA et al., 2007; DESAI; SILVER, 1998; GRASSI et al., 2006; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992; SEYMOUR; THOMASON; ELLIS, 1996).

A influência de drogas como a ciclosporina e a nifedipina nos níveis de cálcio influencia também a apoptose, mecanismo que auxilia na regulação da proliferação celular, principalmente durante processos de remodelação dos tecidos. A apoptose é controlada por altos níveis intracelulares de cálcio (NISHIKAWA et al., 1996). Entretanto, drogas como a ciclosporina se ligam à calmodulina, impedindo a ligação desta com o cálcio intracelular. Este fato impede a ação da calcineurina, (molécula dependente da calmodulina), que é necessária para a apoptose dos fibroblastos (GRASSI et al., 2006).

Para alguns autores a HGM causada pela ciclosporina é dose-dependente (CIAVARELLA et al., 2007; SEYMOUR; JACOBS, 1992), sendo necessária uma concentração mínima da droga para que a HGM se desenvolva (KING et al., 1994). Outros autores não acreditam nessa relação (CIAVARELLA et al., 2007; DESAI; SILVER, 1998; GRASSI et al., 2006), mas acreditam que a concentração da droga na região perivascular e a duração do tratamento podem influenciar no desenvolvimento da HGM (GRASSI et al., 2006).

Já a HGM causada pela nifedipina não parece ser dose-dependente (BOTHA, 1997). Apesar desses fatos, os autores relatam que a HGM causada tanto pela ciclosporina quanto pela nifedipina desaparece uma vez que é cessado o uso da droga (KING et al., 1994; SEYMOUR; JACOBS, 1992).

Alguns indivíduos parecem mais suscetíveis às mudanças gengivais causadas por estas drogas, sendo que em alguns pacientes a HGM pode se desenvolver mesmo na ausência de fatores locais (CIAVARELLA et al., 2007; DESAI; SILVER, 1998. GRASSI et al., 2006; SAGLAM et al., 1996).

Entretanto, muitos estudos mostram a importância da presença de fatores locais para o aparecimento da HGM. Para alguns autores a quantidade de biofilme é o fator local mais importante para o desenvolvimento da HGM (BOTHAS, 1997; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992, SEYMOUR; THOMASON; ELLIS, 1996; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997). Apesar deste fato, outros autores mostraram que o controle do biofilme não inibe o desenvolvimento da HGM (SEYMOUR; JACOBS, 1992), mas sim diminui o componente inflamatório (CIAVARELLA et al., 2007; DESAI; SILVER, 1998).

Alguns autores discutem se o acúmulo de placa bacteriana é um fator iniciante da HGM ou apenas uma consequência das alterações gengivais (SEYMOUR; THOMASON; ELLIS, 1996). Entretanto existe um consenso de que a presença de fatores locais inflamatórios agrava a HGM (CIAVARELLA et al., 2007; GRASSI et al., 2006; DESAI; SILVER, 1998).

Clinicamente, observa-se que a HGM inicia-se pelas papilas interdetais, com maior envolvimento da região anterior e vestibular da boca (BOTHAS, 1997; BUSTOS et al., 2001; CIAVARELLA et al., 2007; GRASSI et al., 2006; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992; STRACHAN; BURTON; PEARSON, 2003). A hiperplasia das papilas aumenta e estas parecem coalescer, dando um aspecto lobulado à gengiva. O crescimento pode ocorrer no sentido coronal e interferir na mastigação, oclusão e fala (CIAVARELLA et al., 2007; GRASSI et al., 2006; SEYMOUR; JACOBS, 1992; STRACHAN; BURTON; PEARSON, 2003). Com a

progressão da HGM há formação de falsas bolsas, dificultando a higiene, resultando em combinação com inflamação secundária, com presença de edema, rubor, brilho e sangramento à sondagem. O quadro, quando não tratado adequadamente pode cursar com periodontite, halitose e perda de função mastigatória (BOTHÁ, 1997; CIAVARELLA et al., 2007; GRASSI et al., 2006; SEYMOUR; JACOBS, 1992; STRACHAN; BURTON; PEARSON, 2003).

Quase não se observam diferenças entre a HGM produzida pela ciclosporina e a HGM produzida pela nifedipina, a não ser pelo fato de que a HGM produzida pela ciclosporina não foi descrita em pacientes edêntulos (SEYMOUR; JACOBS, 1992), enquanto que a HGM produzida pela nifedipina, pode atingir também áreas edêntulas (BOTHÁ, 1997). O aumento da HGM causada pela nifedipina é gradual e essa parece ser mais friável do que a HGM produzida exclusivamente pela ciclosporina (DESAI; SILVER, 1998).

Poucos são os trabalhos que se preocuparam em classificar a severidade da HGM. Angelopoulos e Goaz (1972) propuseram um índice para classificar a severidade da HGM, em pacientes com HGM causada por fenitoína. Entretanto, este índice tem sido aplicado para as HGM causadas por outros medicamentos. Segundo os autores, a HGM pode ser classificada em: grau 0 – quando não há hiperplasia, e a gengiva está normal, grau 1 – quando a gengiva cobre até o terço cervical das coroas anatômicas dos dentes anteriores, grau 2 - quando a gengiva cobre o terço médio das coroas anatômicas dos dentes anteriores e grau 3 – quando a gengiva cobre mais do que dois terços das coroas anatômicas dos dentes anteriores.

Índice semelhante ao anterior foi utilizado por King et al. (1994), ao analisarem a incidência e severidade da HGM em 159 pacientes TR. O índice utilizado foi o de Aas, que classifica a HGM em leve (quando envolve apenas as

papilas gengivais, moderada (cobrindo menos da metade da coroa clínica dos dentes) e severa (cobrindo mais da metade da coroa clínica dos dentes). Os autores encontraram 22 % dos pacientes exibindo HGM, sendo a grande maioria dos casos de HGM leve, seguida pela HGM moderada e severa. Os autores notaram que os pacientes que tomavam ciclosporina e tinham HGM, tomavam uma dose muito maior da medicação do que os pacientes que não tinham HGM e também tomavam ciclosporina. Entre os pacientes que tomavam ciclosporina e nifedipina, a incidência da HGM chegou a 66%, indicando que pacientes que tomam as duas drogas tem uma maior probabilidade de desenvolver a HGM.

O quadro histológico da HGM demonstra uma hiperplasia tanto do epitélio como do tecido conjuntivo (BOTHÁ, 1997). O epitélio apresenta acantose e emite finas projeções em direção ao tecido conjuntivo, onde se observa aumento da deposição do colágeno (BOTHÁ, 1997; CIAVARELLA et al., 2007; DESAI; SILVER, 1998; SEYMOUR; JACOBS, 1992), em arranjos irregulares (DESAI; SILVER, 1998). O tecido conjuntivo é bem vascularizado e com áreas focais de infiltrado inflamatório predominantemente plasmocitário (CIAVARELLA et al., 2007; DESAI; SILVER, 1998; SEYMOUR; JACOBS, 1992), que pode variar de intensidade e às vezes se assemelhar a uma neoplasia. Entretanto não é possível observar atipias celulares (SEYMOUR; JACOBS, 1992).

Diversas formas de tratamento para a HGM são sugeridas na literatura.

Strachan, Burton e Pearson (2003) observaram que o uso da azitromicina por períodos curtos de tempo (3 a 5 dias) parece levar a resolução ou diminuição, pelo menos temporária, da HGM.

Tokgöz et al. (2004) analisaram os efeitos do uso da azitromicina por 3 dias em 18 pacientes TR que possuíam HGM em decorrência do uso de ciclosporina. O

grau da HGM foi medido através da profundidade da falsa bolsa formada pela HGM nos dias 0, 7, 30, 90 e 180 dias após a administração da azitromicina. Observou-se diminuição da HGM nos dias 7 e 30, indicando que a azitromicina, uma droga barata e sem grandes efeitos colaterais, pode ser uma forma sistêmica de tratamento da HGM.

Argani et al. (2006) utilizaram a azitromicina na forma de pasta de dente para o tratamento da HGM de 10 pacientes TR. O grupo controle foi composto por 10 pacientes TR com HGM que utilizaram pasta de dente sem azitromicina. Antes do início do estudo todos os participantes receberam orientação de higiene bucal, raspagem e alisamento corono-radicular. O grupo que recebeu a pasta com a azitromicina mostrou uma diminuição significativa da HGM, mostrando que a azitromicina em pasta de dente pode ser mais uma alternativa no tratamento da HGM.

Outras drogas antimicrobianas como o metronidazol, claritromicina e azitromicina foram sugeridas também para o tratamento da HGM (TOKGÖZ et al., 2004).

Além da utilização de medicações, o tratamento da HGM deve englobar controle de placa bacteriana a fim de impedir a exacerbação da HGM em decorrência do componente inflamatório (CIAVARELLA et al., 2007; GRASSI et al., 2006); visitas regulares ao dentista a fim de realizar raspagem e alisamento corono-radicular, às vezes associados com o uso de antibióticos como o metronidazol e o uso de bochechos de digluconato de clorexedina a 0,12% (GRASSI et al., 2006) e, em casos de HGM muito exacerbada pode-se tentar a troca da droga imunossupressora. Caso isso não seja possível, deve-se realizar gengivectomias para a remoção da HGM (CIAVARELLA et al., 2007; GRASSI et al., 2006).

Diversas neoplasias malignas, associadas à infecções virais e que tem como característica clínica a hiperplasia gengival já foram descritas na literatura (KING et al., 1994; SEYMOUR; JACOBS, 1992; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997). Dois casos de sarcoma de kaposi (neoplasia relacionada à infecção pelo HHV8) foram descritos relacionados à hiperplasia gengival medicamentosa (SEYMOUR; JACOBS, 1992; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997), assim como dois casos de carcinoma epidermóide, possivelmente associados à infecção pelo HPV (SEYMOUR; JACOBS, 1992). Casos de linfomas, relacionados a desordens linfoproliferativas pós-transplante e à infecção pelo EBV também foram descritos por Oda et al. (1996).

Por este motivo, há um consenso na literatura com relação à necessidade da realização de biópsia em hiperplasias gengivais medicamentosas de crescimento severo ou de características não usuais, uma vez que existe a possibilidade de estarmos diante de uma desordem linfoproliferativa ou de uma neoplasia maligna (ODA et al., 1996; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992), sendo que o exame histopatológico destes espécimes deve ser mandatório (SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997).

Pacientes transplantados renais devem passar por um exame clínico no mínimo a cada 6 meses, sendo que qualquer lesão suspeita deve ser biopsiada (SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997).

2.4 HPV

O Papiloma Vírus Humano (HPV) pertence à família do papovavírus (SAGLAM et al., 1996); é um vírus de DNA circular (ANDERSON et al., 2003; HA; CALIFANO, 2004; SAGLAM et al., 1996), pequeno (55nm), não envelopado, icosaédrico (BUSTOS et al., 2001) com tropismo por células epiteliais (ANDERSON et al., 2003; BUSTOS et al., 2001).

O HPV consiste em nove seqüências de DNA, sendo sete “early-phase genes (E)”, responsáveis pela transcrição do DNA e duas “late-phase genes (L)”, responsáveis pela codificação de proteínas (HA; CALIFANO, 2004).

Com o passar dos anos, diversos tipos do HPV têm sido identificados, sendo que em 1996 conhecia-se mais de 70 tipos, cada um deles apresentando especificidade para determinada região do corpo (SAGLAM et al., 1996). Em 2003, mais de 100 subtipos já haviam sido identificados (ANDERSON et al., 2003; HA; CALIFANO, 2004; HORMONIA et al., 2005), sendo mais de 30 tipos identificados na mucosa oral (HORMONIA et al., 2005).

A literatura aponta números discrepantes em relação à incidência do HPV na população em geral. Segundo Ha e Califano (2004), esse índice varia entre 0% e 70%, de acordo com a técnica empregada para a identificação do vírus e da técnica escolhida para obtenção do tecido a ser testado.

Trabalhos que utilizaram grandes amostras de mucosas normais e pesquisaram a presença do HPV através do PCR (método mais sensível para a detecção do vírus) também encontraram resultados discrepantes. Enquanto um autor encontrou baixa incidência (1-2%), outro encontrou uma incidência de 27% em outro país (Índia), levantando a possibilidade que a geografia, meio de contaminação, e fatores comportamentais podem influenciar na presença de HPV na mucosa normal (HA; CALIFANO, 2004).

Para Hormonia et al. (2005), o HPV está presente em cerca de 10 a 20% da mucosa normal da população adulta. Já Anderson et al. (2003) acreditam que o HPV possui incidência que varia entre 35 e 60% em pele e mucosa, na população normal, sendo os tipos considerados de alto risco os mais freqüentes. Para Rose et al. (2006) a incidência da infecção assintomática pelo HPV em boca varia entre 0 e 80%, sendo os valores mais altos encontrados em populações mais jovens, o que leva os autores a concluir que esta incidência está diretamente relacionada a idade dos grupos analisados.

De um modo geral, pacientes sob terapia imunossupressora apresentam um maior índice de infecção pelo HPV (SAGLAM et al., 1996). Pacientes transplantados renais exibem maior incidência de HPV (20%) em mucosa normal, quando comparados com pacientes HIV positivos (7%) e pacientes normorreativos (3,3%), sendo que todos eles apresentaram somente os tipos considerados de baixo risco (AMMATUNA et al., 2001). Em estudo ainda não publicado, Rose et al. (2006) encontraram uma prevalência de 12% de HPV em pacientes HIV positivos.

Rose et al. (2006) analisaram 176 pacientes (88 pacientes TR e 88 pacientes normorreativos). Realizaram exame clínico, procurando por lesões orais e presença de HGM, além da realização de esfregaço, para posterior pesquisa do HPV através do PCR. Nenhum paciente apresentou lesão oral, e apenas 7% dos pacientes TR apresentaram HGM, sendo que todos estes pacientes utilizavam ciclosporina por um período prolongado. Entre os pacientes TR 18% foram positivos para o HPV, enquanto que apenas 1% do grupo controle foi positivo para o HPV.

O HPV é o agente etiológico de lesões benignas da mucosa oral (AL-OSMAN; PERRY; BIREK, 2006; BUSTOS et al., 2001; HORMONIA et al., 2005; SAGLAM et al., 1996), estando os tipos de baixo risco, relacionados com lesões como a verruga

vulgar, papiloma, condiloma acuminado e hiperplasia epitelial focal (AMMATUNA et al., 2001; ANDERSON et al., 2003; HILLE et al., 2002). Existem evidências que relacionam o HPV com a etiologia e desenvolvimento de lesões pré - cancerosas e do carcinoma epidermóide, em especial os tipos considerados de alto risco (16 e 18) (AL-OSMAN; PERRY; BIREK, 2006; AMMATUNA et al., 2001; ANDERSON et al., 2003; BUSTOS et al., 2001; HA; CALIFANO, 2004; HORMONIA et al., 2005; ROSE et al., 2006; SAGLAM et al., 1996).

Apesar de estar correlacionado com a carcinogênese oral, o HPV isoladamente não provoca o câncer. A associação do HPV com alterações do sistema imune possui um importante papel no desenvolvimento de lesões malignas (AMMATUNA et al., 2001; BUSTOS et al., 2001).

Autores sugerem que o maior índice de HPV encontrado em pacientes transplantados pode estar relacionado ao desenvolvimento de carcinomas epidermóides. Foram encontradas alterações sugestivas da infecção pelo HPV em lesões de carcinoma epidermóide exibidas por estes pacientes (SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997).

O HPV infecta células epiteliais (BUSTOS et al., 2001), na camada basal do epitélio (HA; CALIFANO, 2004), permanecendo latente neste sitio (HORMONIA et al., 2005).

A replicação do HPV acontece no epitélio, formando inclusões eosinofílicas, e uma característica degeneração celular (BUSTOS et al., 2001), com a formação de halos perinucleares; além de uma grande quantidade de alterações histológicas, como a presença de células superficiais com atipias nucleares de tamanho, forma e cromaticidade (ANDERSON et al., 2003).

Hormonia et al. (2005), sugeriram que uma vez que o HPV infecta as células da camada basal do epitélio e o único sítio da boca em que estas células estão em contato com o ambiente é a bolsa periodontal, este poderia ser o sítio do HPV latente (fase ainda não estabelecida, e que pode ser identificada quando as células são consideradas positivas, mas não há alterações histológicas ou clínicas). Segundo os autores, já que o HPV está relacionado com a proliferação de células epiteliais e na doença periodontal ocorre a proliferação e migração do epitélio juncional, o efeito biológico do HPV pode ser a doença periodontal. Os autores realizaram biópsias em 38 indivíduos com doença periodontal, além de PCR e hibridização *in situ* para a pesquisa do HPV do tipo 16. O HPV do tipo 16 foi encontrado em 26% dos casos, sendo a localização da marcação positiva na parte coronária do epitélio juncional. Concluíram que a bolsa periodontal pode funcionar como um reservatório de HPV e que não podemos descartar a hipótese do envolvimento do HPV com a doença periodontal.

O melhor método para o diagnóstico do HPV é a hibridização *in situ* (BUSTOS et al., 2001; HA; CALIFANO, 2004; SAGLAM et al., 1996), técnica que detecta de 20 a 50 cópias de DNA viral por célula (BUSTOS et al., 2001; HA; CALIFANO, 2004), uma grande quantidade de vírus; mais importante do que as pequenas quantidades de vírus detectadas através do PCR, principalmente no que se refere ao potencial carcinogênico do vírus (BUSTOS et al., 2001; HA; CALIFANO, 2004). Além da detecção viral, a hibridização *in situ* ainda preserva a morfologia e permite a avaliação histológica do efeito da replicação do HPV (BUSTOS et al., 2001).

2.4.1 HPV em HGM de pacientes transplantados renais

Saglam et al. (1996) relatam o caso de uma paciente do sexo feminino, de 31 anos de idade, transplantada renal, fazendo uso de ciclosporina e que apresentava um severo crescimento gengival. Clinicamente observava-se um grande aumento gengival, de aspecto lobulado, principalmente na região anterior e que cobria uma porção significativa das coroas dentárias. Havia depósito generalizado de placa e cálculo e fácil sangramento à sondagem, com a presença de falsas bolsas periodontais. Radiografias periapicais demonstraram leve perda óssea generalizada. Foi orientada higiene oral, prescrito bochechos diários com digluconato de clorexedina a 0.2%, realizada raspagem e alisamento corono-radicular e curetagem subgengival. Entretanto o tratamento não surtiu efeito e optou-se pela remoção cirúrgica da hiperplasia. Em decorrência do aspecto clínico, analisaram a presença do HPV neste tecido, encontrando positividade para os tipos do HPV 16/18 e 31/33. A paciente encontra-se em acompanhamento, com pequenas recidivas, principalmente na região anterior superior. Este trabalho conclui que é extremamente importante a realização de biópsias em pacientes sob terapia imunossupressora com severo crescimento gengival, para o auxílio no diagnóstico e correto tratamento.

As características clínicas de algumas HGM em pacientes transplantados renais, com o desenvolvimento de projeções digitiformes, semelhantes àquelas associadas à infecção pelo HPV, levaram Bustos et al. (2001) a pesquisar a infecção por este vírus na HGM destes pacientes.

Bustos et al. (2001), analisaram 13 pacientes transplantados renais, com hiperplasia gengival medicamentosa, com idades entre 18 e 51 anos. Foram

realizadas biópsias na HGM levando em consideração a presença de projeções digitiformes na gengiva marginal. Em 4 destes pacientes foi removido também fragmento de mucosa oral normal. Analisaram os cortes corados pela hematoxilina-eosina a fim de encontrar coilócitos (caracterizados como células com vacuolização do citoplasma, núcleo circundado por halo basofílico, localizados na camada espinhosa e granulosa do epitélio). Através da técnica de hibridização *in situ*, pesquisaram o HPV com sondas de amplo espectro e tipos específicos (6, 11, 16 e 18). Doze dos treze casos analisados (92.31%) foram positivos para a sonda de HPV de amplo espectro, sendo que entre estes casos, 4 foram positivos para o tipo 6 e um caso para o tipo 16. Em onze dos 12 casos positivos para o HPV, foram encontrados coilócitos. As quatro biópsias da mucosa normal também foram positivas para a sonda de amplo espectro, mas foram negativas para os tipos específicos realizados, o que pode indicar que o HPV em boca pode ser diferente dos tipos encontrados em mucosa anogengital, que são os tipos mais testados em boca. A positividade da mucosa normal além da HGM indica que a infecção pelo HPV não se limita apenas à gengiva. Uma vez que a mucosa já está infectada pelo HPV, as alterações causadas pela ciclosporina, responsável pela HGM, podem ser mais um fator para contribuir para transformações celulares malignas. Este fato já foi observado *in vitro*, quando foi demonstrado que células obtidas de hiperplasias gengivais medicamentosas tratadas com fenitoína eram imortalizadas mais eficazmente pelo HPV 16, do que células da gengiva normal. A supressão de células T causada pela ciclosporina pode resultar em aumento da infecção pelo HPV, que pode ser mais um fator associado à atividade proliferativa da ciclosporina na mucosa normal, podendo ser um estágio prévio do câncer (BUSTOS et al. (2001).

Al-Osman, Perry e Birek (2006) descreveram um caso de um paciente do sexo masculino, 45 anos de idade, fumante, transplantado renal, que apresentou um aumento gengival generalizado em maxila e mandíbula. O paciente fazia uso de ciclosporina, prednisona, azatioprina, nifedipina, furosamida e ranitidina. O aumento gengival foi diagnosticado como HGM. O paciente apresentava também uma lesão em palato duro, difusa, eritematosa e papilomatosa, exibindo uma pseudomembrana branca, com aproximadamente três meses de duração. Foi feita biópsia incisional da lesão em palato, sendo que a microscopia mostrou uma hiperplasia papilomatosa inflamatória, com colonização superficial de *Candida*. Posteriormente a lesão do palato foi completamente removida, juntamente com a HGM. A microscopia da peça cirúrgica mostrou uma área de displasia epitelial, com freqüentes figuras de mitose e núcleos atípicos, em meio a um espesso epitélio. As alterações sugeriram a presença do HPV e foi feita hibridização *in situ* para os tipos 6/11, 16/18 e 31/33/35, além de imunoistoquímica e PCR. Os resultados em conjunto confirmaram a presença do HPV tipo 16 na lesão. Os autores concordam com a literatura, que relata que pacientes imunossuprimidos têm uma maior chance de apresentar lesões exofíticas pré-malignas e malignas associadas à infecção pelo HPV do tipo 16. O HPV em gengiva não foi pesquisado por falta de material. Os autores não descartam que a HPI possa ter sido causada pela associação da ciclosporina e nifedipina. Para os autores é essencial a pesquisa do HPV nos pacientes transplantados, quer seja para a administração de antivirais, quer seja para o uso de vacinas, impedindo a progressão de lesões associadas a estes vírus.

2.5 EBV

O Epstein-Barr Vírus (EBV) é um herpes vírus humano, (BRAZ-SILVA et al., 2006; HILLE et al., 2002; RAUT et al., 2000; WALLING et al., 2004), presente em aproximadamente 95% da população mundial, em sua forma assintomática (BRAZ-SILVA et al., 2006, FAULKNER; KRAJEWSKI; CRAWFORD, 2000). Quando patogênico está relacionado com o linfoma de Burkitt endêmico, linfomas não-Hodgkin associados à AIDS (FAULKNER; KRAJEWSKI; CRAWFORD., 2000; RAUT et al., 2000; WALLING et al., 2004), doença de Hodgkin (AMMATUNA et al., 2001), desordens linfoproliferativas pós-transplante (AMMATUNA et al., 2001; BRAZ-SILVA et al., 2006; FAULKNER; KRAJEWSKI; CRAWFORD, 2000; ODA et al., 1996; RAUT et al., 2000), carcinoma de nasofaringe indiferenciado (HILLE et al., 2002; WALLING et al., 2004) e a leucoplasia pilosa (AMMATUNA et al., 2001; BRAZ-SILVA et al., 2006; FAULKNER; KRAJEWSKI; CRAWFORD, 2000; WALLING et al., 2004).

O EBV é normalmente encontrado na saliva, podendo infectar o epitélio oral e estabelecer uma infecção latente, geralmente por toda a vida do hospedeiro (HILLE et al., 2002). Em pacientes imunossuprimidos pode ocorrer uma reativação subclínica do vírus, causando doenças como a leucoplasia pilosa (AMMATUNA et al., 2001). O EBV pode causar ainda uma transformação nas células que infecta na forma latente, promovendo uma expansão clonal, e levando ao desenvolvimento de uma neoplasia maligna (HILLE et al., 2002).

Ammatuna et al. (1998) identificaram a presença do EBV em mucosa oral normal de 40 pacientes TR e 20 normorreativos através da PCR e da hibridização *in situ* e encontraram uma incidência de 72,5% em pacientes TR e 30 % em pacientes

normorreativos. Alguns anos depois os mesmos autores voltaram a identificar a presença do EBV em mucosa normal de pacientes TR, HIV+ e normorreativos e encontraram uma incidência de 65% em pacientes TR, 42,1% em pacientes HIV+ e 16,6% em pacientes normorreativos (AMMATUNA et al., 2001).

Braz-Silva et al. (2006) demonstraram a presença do EBV em diferentes sítios da mucosa oral de pacientes transplantados renais (TR) e de pacientes normorreativos, colhendo amostras através de esfregaços e pesquisando o EBV pelo método do PCR. Os pacientes TR exibiram maior frequência de positividade para o EBV em todos os sítios analisados, sendo que a gengiva foi o sítio onde houve grande prevalência da infecção pelo EBV. Entretanto, devido ao método escolhido para a identificação do EBV, não foi possível afirmar que o EBV detectado provinha das células colhidas, uma vez que o mesmo poderia estar presente na saliva que contaminava esta região.

A leucoplasia pilosa foi descrita inicialmente em 1984 como sendo uma lesão associada exclusivamente a infecção pelo HIV. Relatos de casos subseqüentes confirmaram que a lesão também ocorre em transplantados de órgãos e outros pacientes cronicamente imunossuprimidos (KING et al., 1994; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997). É causada pelo EBV em sua fase replicativa, e está associada com marcante imunossupressão (AMMATUNA et al., 2001; BRAZ-SILVA et al., 2006; KING et al., 1994; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997; TEO, 2002). Acomete geralmente a borda lateral da língua, bilateralmente e o dorso de língua. Possui cor branca e superfície corrugada (HILLE et al., 2002).

O quadro histológico da leucoplasia pilosa é caracterizado por acantose, presença de coilócitos, e inflamação leve ou ausente na submucosa. A presença de coilócitos nas camadas superficiais do epitélio parece ser patognomônica do efeito

da grande replicação do EBV, entretanto é necessária a detecção do EBV através da hibridização *in situ* para a confirmação definitiva do diagnóstico (HILLE et al., 2002).

King et al. (1994) analisaram 159 pacientes TR e 160 pacientes normorreativos e encontraram leucoplasia pilosa, clinicamente diagnosticada em 11,3% dos pacientes transplantados renais analisados.

Desordens linfoproliferativas pós-transplante são caracterizadas por uma proliferação não controlada de células B em pacientes imunossuprimidos (ANDRÉS, 2005; BAIACHI et al., 2004; BOUBENIDER et al., 1997; KÖPF; TÖNSHOFF, 2004; ODA et al., 1996; SHROFF; REES, 2004; YIN et al., 2005). Essa proliferação parece ser resultado de uma infecção primária ou reativação do EBV, em decorrência da imunossupressão (ANDRÉS, 2005; BOUBENIDER et al., 1997; KÖPF; TÖNSHOFF, 2004; RAUT et al., 2000; YIN et al., 2005). A incidência relatada de desordens linfoproliferativas em pacientes transplantados renais varia entre 1% (BAIACHI et al., 2004; ODA et al., 1996; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997; SHROFF; REES, 2004), 3% (BAIACHI et al., 2004); e 10% (SHROFF; REES, 2004). Pacientes TR possuem dez vezes mais chance de desenvolver desordens linfoproliferativas que a população em geral (ANDRÉS, 2005).

As desordens linfoproliferativas são mais comuns em pacientes que recebem drogas imunossupressoras combinadas (ciclosporina e outros imunossupressores), (ANDRÉS, 2005; ODA et al., 1996) ou muito potentes, como o tacrolimus, que aumenta em 1.8 vezes a chance de desenvolver a desordem (ANDRÉS, 2005).

O tacrolimus está associado ao desenvolvimento de desordens linfoproliferativas em cerca de 10% dos pacientes, sendo que a taxa de mortalidade destas desordens é de aproximadamente 80%. É uma nova droga

imunossupressora que tem sido utilizada nos casos de rejeição aguda do transplante e nos casos onde os efeitos colaterais da ciclosporina são muito severos (CHAND; SOUTHERLAND; CUNNINGHAM, 2001).

Clinicamente as desordens linfoproliferativas podem variar de uma mononucleose com curso autolimitante até um linfoma, com preferência por sítios extra nodais (ODA et al., 1996; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997), em 70% dos casos (ANDRÉS, 2005), atingindo principalmente trato gastrointestinal, ossos, SNC, olhos, pele e boca (RAUT et al., 2000).

Histologicamente, as desordens linfoproliferativas são caracterizadas por proliferações anormais de células linfóides (RAUT et al., 2000), que podem variar desde uma hiperplasia linfóide até linfomas agressivos (ANDRÉS, 2005; ODA et al., 1996).

Chand, Southerland e Cunningham (2001) analisaram 11 pacientes TR que faziam uso de tacrolimus, sendo que previamente ao tratamento, 6 deles eram soronegativos para o EBV, dois eram positivos e em três a titulação para o EBV não era conhecida. Após o início da terapia, 4 pacientes sofreram soroconversão, sendo que destes, três desenvolveram desordens linfoproliferativas, assim como um dos pacientes dos quais não haviam dados sobre a titulação do EBV. Em todos os casos, a terapia com tacrolimus foi diminuída em 50% e todos apresentaram reversão da desordem linfoproliferativa.

Recentemente, a quantificação de DNA de EBV tem sido utilizada para identificar pacientes com risco de desenvolver desordens linfoproliferativas (BAIOCHI et al., 2004; KÖPF; TÖNSHOFF, 2004). Entretanto não existe ainda uma padronização dos centros a fim de se definir qual é a carga viral de EBV associada

ao aumento do risco de desenvolvimento de uma desordem linfoproliferativa (FLANAGAN; BRENNAN, 2006; KÖPF; TÖNSHOFF, 2004).

Baiochi et al. (2004) analisaram a carga viral para o EBV, através da PCR em 11 pacientes TR portadores de desordens linfoproliferativas, e em 45 pacientes, distribuídos da seguinte forma: 10 pacientes normorreativos, 10 pacientes em AIDS, 10 pacientes com linfoma de Hodgkin, 10 pacientes com mononucleose infecciosa e 5 crianças com idades entre 6 e 18 meses. De acordo com a análise estatística realizada e o grau de especificidade, estabeleceu-se que a carga viral de EBV capaz de levar ao desenvolvimento das desordens linfoproliferativas varia entre 1000 e 5000 cópias/ 10^6 PBMC.

Kirk et al. (2006) analisaram a presença do EBV através da PCR em 121 pacientes TR e em 46 pacientes portadores de insuficiência renal crônica. 48% dos pacientes com insuficiência renal eram portadores de EBV na fase replicativa, enquanto que 81% dos pacientes TR apresentavam EBV replicante, o que pode representar uma overimunossupressão, sendo que os autores sugerem que estes pacientes devem ser monitorados.

O tratamento das desordens linfoproliferativas consiste na redução da imunossupressão em pelo menos 50% e a associação de uma medicação antiviral como o aciclovir ou o ganciclovir (FLANAGAN; BRENNAN, 2006; RAUT et al., 2000).

Alguns autores sugerem o uso de aciclovir profilático em pacientes transplantados sob terapia imunossupressora a fim de diminuir o risco destes desenvolverem a leucoplasia pilosa, linfomas não-Hodgkin, desordens linfoproliferativas e outras lesões de origem viral (BOUBENIDER et al., 1997; FLANAGAN; BRENNAN, 2006; FONG et al., 2000; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997).

Em pacientes soronegativos para o EBV que receberam um órgão de um paciente soropositivo para o EBV, o tratamento antiviral com aciclovir ou ganciclovir deve ser instituído, e o uso de imunossupressores potentes deve ser evitado, a fim de evitar o aparecimento das desordens linfoproliferativas. Uma vez que haja lesões instaladas, benignas e policlonais, a redução da droga imunossupressora, associada a uma terapia antiviral, provavelmente solucionará o quadro. Entretanto, em lesões monoclonais, se faz necessário o uso de quimioterapia, e/ou terapias com interferon alfa e/ou anticorpos monoclonais anti células B (ANDRÉS, 2005).

2.5.1 EBV em HGM de pacientes transplantados renais

Com relação à presença do EBV na HGM de pacientes transplantados renais, Akinwande, Kazeem e Taiwo (1995) estudaram a presença de receptores para este vírus, através de imunoistoquímica, em paciente transplantado renal. Encontraram positividade nas camadas superiores do epitélio, mas não encontraram positividade nas camadas basais e parabasais. Para os autores, a positividade pode estar relacionada com a contaminação secundária da cavidade oral pela saliva e não como uma manifestação sistêmica do EBV.

Oda et al. (1996) descreveram dois casos de desordem linfoproliferativa pós transplante, em boca, caracterizadas clinicamente por uma hiperplasia gengival severa. O primeiro caso relatado era de um transplantado cardíaco que fazia uso de terapia imunossupressora combinada (ciclosporina, azatioprina e prednisona) e que exibiu hiperplasia gengival generalizada, com sangramento, gengiva eritematosa e

focalmente cianótica. O quadro histológico mostrou um lençol de células linfóides, a maioria com aparência plasmocitóide, grandes e atípicas, com aumento da taxa de mitoses. Diante destes achados foi dado o diagnóstico de desordem linfoproliferativa pós transplante. A dosagem do imunossupressor foi reduzida e foi receitado aciclovir. Os sinais clínicos diminuíram. Três meses depois, o paciente retornou, relatando rápido aumento nas últimas semanas. Novamente o quadro histológico mostrou um infiltrado difuso, com grandes células linfóides, de citoplasma relativamente abundante, que exibiam halo perinuclear, núcleo excêntrico, às vezes com um nucléolo proeminente, com a aparência de imunoblasto. Mitoses eram freqüentes. Os cortes foram positivos para a presença do EBV. Mais uma vez esses achados foram compatíveis com uma desordem linfoproliferativa, entretanto, como a mesma não apresentou regressão com a diminuição dos imunossupressores e com o uso do aciclovir, o diagnóstico foi fechado em linfoma plasmocitóide imunoblástico de células B (ODA et al., 1996).

Um segundo caso foi descrito pelos mesmos autores, também de um paciente transplantado cardíaco em uso de terapia imunossupressora combinada e que apresentou hiperplasia gengival localizada na região posterior da maxila. O quadro histológico era semelhante ao primeiro caso, com o tecido conjuntivo permeado por um lençol de células linfóides atípicas, muitas com diferenciação plasmocitária e com mitoses atípicas. Encontraram forte positividade para o EBV e as reações imunoistoquímicas foram positivas para CD45RO, CD45, CD30 e kappa. O diagnóstico mais uma vez foi de desordem linfoproliferativa pós transplante. A ciclosporina foi reduzida e o paciente foi tratado com intérferon alfa durante 6 meses, sendo que o quadro clínico melhorou. Um ano e oito meses depois, a massa voltou a

crescer e nova biópsia e reações imunoistoquímicas confirmaram o diagnóstico de linfoma (ODA et al., 1996).

3 PROPOSIÇÃO

- 3.1 Avaliar a frequência da hiperplasia gengival medicamentosa dos pacientes transplantados renais em atendimento no CAPE-FOUSP
- 3.2 Avaliar prospectivamente o grau de hiperplasia gengival medicamentosa dos pacientes transplantados renais em atendimento no CAPE-FOUSP.
- 3.3 Identificar a presença do EBV (Vírus Epstein-Barr) e do HPV (Papiloma Vírus Humano) através da técnica da hibridização *in situ* nas hiperplasias gengivais medicamentosas destes pacientes.
- 3.4 Correlacionar o grau de hiperplasia gengival medicamentosa destes pacientes com fatores locais tais como: índice de placa, presença de cálculo dentário e a presença do EBV e HPV.

4 CASUÍSTICA - MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo, foram analisados os prontuários dos 58 pacientes transplantados renais do Centro de Atendimento a Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CAPE - FOU SP). Os pacientes foram divididos de acordo com a medicação utilizada e os prontuários dos pacientes que faziam uso de ciclosporina e/ou nifedipina selecionados. As informações contidas nos prontuários sobre presença ou ausência de hiperplasia gengival medicamentosa foram registradas.

Foram selecionados 15 pacientes transplantados renais (TR), que apresentavam hiperplasia gengival medicamentosa (HGM), de ambos os sexos, e que faziam uso de ciclosporina A isoladamente ou associada à nifedipina.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo A). Os pacientes e/ou responsáveis legais, concederam a autorização para a realização do presente estudo após terem lido e concordado com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, elaborado pela pesquisadora (Apêndice A).

O estudo foi composto por análise clínica, que englobou a anamnese, exame físico e a realização de índices como o índice de placa bacteriana e o índice de hiperplasia gengival medicamentosa e análise laboratorial, composta por análise histopatológica e molecular.

4.1 Análise Clínica

Os dados colhidos durante a análise clínica foram inseridos em uma ficha clínica especialmente desenvolvida para este estudo, que se encontra no Apêndice B.

4.1.1 Anamnese

Durante a anamnese, foram colhidos os seguintes dados dos pacientes:

- 1) Dados demográficos (sexo, idade e raça);
- 2) História médica do paciente (doença de base que levou ao transplante de rim, evolução da doença, data do transplante, outras doenças sistêmicas que acometeram o paciente, médico e hospital em que faz acompanhamento);
- 3) Medicação imunossupressora/ imunorreguladora em uso
- 4) Outras drogas em uso
- 5) História buco-dental (histórico de gengivite, periodontite e hiperplasia gengival medicamentosa)

4.1.2 Exame Físico Intra-bucal

O exame físico intra-bucal, foi realizado sempre pelo autor deste trabalho, em cadeira odontológica, com o auxílio de refletor, espelho clínico, sonda periodontal

milimetrada, verde de malaquita para evidenciar o biofilme e hastes de algodão flexíveis para a aplicação do último.

Durante o exame físico intra-bucal foram avaliados os seguintes índices:

❖ **ÍNDICE DE PLACA (ÍNDICE DE O'LEARY) (O'LEARY; DRAKE; NAYLOR, 1972)**

O biofilme foi evidenciado com verde de malaquita e as faces dos dentes (mesial, distal, vestibular e lingual/ou palatina) coradas foram contabilizadas. O índice de placa foi dado pela porcentagem obtida através da quantidade de faces coradas, divididas pelo número total de faces dos dentes presentes.

❖ **GRAU DE HIPERPLASIA GENGIVAL (ANGELOPOULOS; GOAZ, 1972)**

O maior grau de hiperplasia gengival medicamentosa apresentado pelo paciente foi registrado conforme os escores a seguir:

- Grau 0 – gengiva normal, sem hiperplasia gengival
- Grau 1 – hiperplasia gengival cobrindo o terço cervical ou menos dos dentes anteriores
- Grau 2 – hiperplasia gengival cobrindo o terço médio dos dentes anteriores
- Grau 3 – hiperplasia gengival cobrindo mais de dois terços dos dentes anteriores.

❖ **PRESENÇA DE CÁLCULO DENTÁRIO**

A presença ou não de cálculo dentário, em qualquer quantidade ou localização foi registrada.

As características clínicas da HGM como superfície (lisa, pouco verrucosa, muito verrucosa), consistência (fibrosa, resiliente, friável), coloração (arroxeada, avermelhada, rósea) e brilho (brilhante ou opaca) também foram registradas na ficha.

O exame físico de cada paciente foi sempre realizado duas vezes, em dias diferentes, com intervalos que variaram de 1 semana a 15 dias. Após a primeira consulta, os pacientes receberam orientação de higiene, profilaxia, raspagem e alisamento corono-radicular, e curetagem sub-gengival, de acordo com as necessidades de cada um. Na segunda consulta, todo o exame intra-bucal foi realizado novamente e, ao final, a hiperplasia gengival medicamentosa foi removida. A finalidade de realizar o exame físico em duas oportunidades diferentes foi excluir possíveis hiperplasias gengivais inflamatórias que poderiam ser confundidas com hiperplasias gengivais medicamentosas ou exacerbarem as mesmas.

De acordo com o protocolo de atendimento a pacientes transplantados renais (TR) do CAPE-FOUSP, os pacientes TR com hiperplasia gengival medicamentosa com indicação de remoção cirúrgica, foram submetidos à terapia antibiótica, constituída por amoxicilina ou clindamicina (para pacientes alérgicos à penicilina), por 7 dias, a ser iniciada um dia antes do procedimento cirúrgico, a fim de evitar possíveis infecções pós-operatórias em decorrência da imunossupressão medicamentosa. Estes pacientes foram submetidos a gengivoplastias de acordo com suas necessidades clínicas e as peças cirúrgicas foram enviadas ao Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP para a análise laboratorial.

4.2 Análise Laboratorial

A análise laboratorial foi dividida em análise histopatológica e análise molecular. Nestas fases, os fragmentos originários das gengivoplastias dos pacientes TR foram comparados aos de um grupo controle composto por 20 espécimes emblocados em parafina oriundos do Arquivo de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, que tiveram como diagnóstico histopatológico “hiperplasia gengival inflamatória”. O grupo controle foi equivalente ao grupo de estudo com relação ao sexo e idade dos pacientes.

As peças cirúrgicas foram fixadas em uma solução de formol a 10% e emblocadas em parafina.

4.2.1 Análise Histopatológica

Foram obtidos cortes de 4 μ m para a realização da coloração de rotina, com hematoxilina-eosina (HE) para a análise histopatológica. A análise microscópica foi feita pelo autor deste trabalho em microscópio óptico, com aumentos entre 10 e 100 vezes. O diagnóstico de hiperplasia gengival medicamentosa foi confirmado, de acordo com critérios mundialmente estabelecidos, como a presença de epitélio exibindo acantose e finas projeções em direção ao tecido conjuntivo, que se apresenta bem vascularizado, com um aumento de deposição de colágeno, em grossos feixes de fibras, dispostos desorganizadamente e permeados por moderado

a intenso infiltrado inflamatório (NEVILLE; DAM; ALLEN, 1995). A presença ou não de coilócitos (células indicativas de infecção viral, identificadas como células com núcleos picnóticos, circundadas por halos claros perinucleares, e que por vezes exibiam inclusões virais eosinofílicas no núcleo) foi observada (NEVILLE; DAM; ALLEN, 1995).

4.2.2 Análise Molecular

A análise molecular compreendeu a avaliação da reação de hibridização *in situ* para identificação do EBV (Vírus do Epstein-Barr) e do HPV (Papiloma Vírus Humano).

Para a realização da técnica de hibridização *in situ* foram utilizados cortes de 5 µm, feitos com navalhas diferentes para cada bloco, a fim de não contaminar os blocos com material genético de outro bloco, estendidos sobre lâminas de vidro, previamente silanizadas por uma solução de 3-aminopropiltrietoxissilano (A3648, Sigma, St. Louis, USA) e secas em estufa a 37°C por 24 horas.

Todas as reações foram realizadas em vidrarias autoclavadas e os cortes a serem utilizados para a identificação do EBV e HPV sofreram processos diferentes, conforme consta a seguir:

4.2.2.1 identificação do HPV

Como controles positivos e negativos para cada bateria da reação de hibridização *in situ* para o HPV de amplo espectro, utilizamos cortes de condiloma acuminado, previamente testados como positivos para o HPV.

Os cortes sofreram processo de desparafinização, passando por dois banhos de xilol, o primeiro em estufa a 60°C, por 15 minutos e o segundo em temperatura ambiente por 15 minutos. Após a desparafinização os cortes sofreram um processo de reidratação através de banhos de 1 minuto cada em álcool absoluto I e II, um banho de 3 minutos em álcool 95° e um banho de 6 minutos em água destilada.

A fim de permitir o acesso da sonda de DNA ao núcleo das células, os cortes receberam tratamento em forno de microondas de 900W, de potência imersos em Target Retrieval Solution (S1699, DAKO, Carpinteria, USA), diluído em 1:10 em água destilada. A solução foi colocada em refratário com tampa entreaberta e pré-aquecida durante 40 segundos na potência máxima. As lâminas foram então colocadas na solução pré-aquecida e levadas ao microondas na potência máxima durante 4 minutos. Após esse passo, foram realizados três ciclos de 4 minutos cada, no microondas com potência de 20%. As lâminas esfriaram dentro do microondas, com a porta aberta durante 10 minutos e depois em temperatura ambiente até que esfriassem por completo.

Foram realizados três banhos em água destilada de 3 minutos cada e em seguida o bloqueio da peroxidase endógena, com 4 banhos de 5 minutos cada de água oxigenada a 10%, em local escuro.

Novamente as lâminas receberam três banhos em água destilada de 3 minutos cada e foram incubadas em solução tampão à base de TRIS (Tris-hidroximetilainoetano), adicionada de um detergente (Tween 20), em pH=7,6.

Utilizamos a solução comercial TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20, S3306, DAKO, Carpinteria, USA).

Os cortes foram secos com papel filtro e colocados sobre a placa de aquecimento, pré-aquecida a 95°C e receberam duas a três gotas (de acordo com o tamanho do corte) da sonda de amplo espectro para o HPV (Wide Spectrum HPV Biotinylated DNA Probe, Y1404, DAKO, Carpinteria, USA). Os cortes utilizados como controles positivos também receberam a sonda de amplo espectro para o HPV, enquanto que os cortes utilizados como controles negativos receberam uma sonda controle negativa (Genpoint Control Kit, Code K062911, DAKO, Carpinteria, USA). Após esse passo foram cobertos por lamínulas de vidro previamente limpas em álcool absoluto e permaneceram durante 5 minutos sobre a placa de aquecimento.

As lâminas foram retiradas da placa de aquecimento, colocadas em câmara úmida e levadas para estufa a 37°C durante 21 horas. Após este período as lâminas foram retiradas da estufa e colocadas em TBST até que as lamínulas se soltassem. Ao mesmo tempo, a solução de estringência (DakoCytomation Gen Point, K0620, DAKO, Carpinteria, USA) foi diluída na proporção de 1:50 em água destilada e pré-aquecida em estufa a 55°C.

Após esse passo, as lâminas foram incubadas em TBST em três banhos de 3 minutos cada e foram então colocadas na solução de estringência pré-aquecida, em estufa a 55°C durante 20 minutos. O anticorpo primário foi diluído na proporção de 1:100 em seu diluente próprio (DakoCytomation Gen Point, K0620, DAKO, Carpinteria, USA).

As lâminas foram retiradas da estufa e incubadas em TBST durante 5 minutos. A seguir o anticorpo primário previamente preparado foi incubado em

temperatura ambiente durante 15 minutos, seguido por incubação em TBST (três banhos de 5 minutos cada).

Para amplificação do sinal da reação, foi incubado o Biotynil-tiramide (DakoCytomation Gen Point, K0620, DAKO, Carpinteria, USA), por 15 minutos em temperatura ambiente, seguido por incubação em TBST (três banhos de 5 minutos cada).

O anticorpo secundário foi incubado (DakoCytomation Gen Point, K0620, DAKO, Carpinteria, USA) por 15 minutos em temperatura ambiente seguido por incubação em TBST (três banhos de 5 minutos cada).

Para a revelação da reação, a diaminobenzidina foi diluída em seu diluente próprio (DakoCytomation Gen Point, K0620, DAKO, Carpinteria, USA) na proporção de 1:50 e incubada em câmara escura durante 7 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente durante 5 minutos, contracoradas com hematoxilina de Mayer durante 2 minutos, lavadas novamente por 5 minutos, desidratadas, diafanizadas e montadas em resina.

Os casos positivos para a sonda de amplo espectro para o HPV (Wide Spectrum HPV Biotinylated DNA Probe, Y1404, DAKO, Carpinteria, USA) foram repetidos, seguindo a mesma metodologia, mas agora receberam as sondas com os tipos específicos para o HPV. Foram realizadas reações para os tipos 6/11, com uma sonda que identifica as regiões E5, E6, L2 e região reguladora do HPV 6 e 11 (HPV Types 6/11 Biotinylated DNA Probe, Y1411, DAKO, Carpinteria, USA); para os tipos 16/18, com uma sonda que identifica as regiões E1, E2, E4, E5, E6, E7 e região reguladora do HPV do tipo 16 e regiões E2, E5, E6, E7, L2 e região reguladora do tipo 18 (HPV Types 16/18 Biotinylated DNA Probe, Y1412, DAKO, Carpinteria, USA); e para os tipos 31 e 33, com uma sonda que identifica as regiões

E2, E5, L2 e região reguladora do tipo 31 e regiões E2, E5, E6, L2 e região reguladora do tipo 33 (HPV Types 16/18 Biotinylated DNA Probe, Y1413, DAKO, Carpinteria, USA).

As reações que apresentaram positividade para o HPV, em qualquer quantidade ou local foram registradas.

4.2.2.2 identificação do EBV

Para o monitoramento da reação de hibridização *in situ* para o EBV, foram utilizados cortes de leucoplasia pilosa previamente testados como positivos para o EBV, como controles positivos e negativos para cada bateria de reação realizada.

As lâminas sofreram um processo de desparafinização através de dois banhos em xilol, o primeiro em estufa a 60°C por um período de 30 minutos e o segundo em temperatura ambiente por 20 minutos. As lâminas foram reidratadas através de banhos de 5 minutos cada em álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto II, etanol 95° I, etanol 95° II e etanol 85°. Após estes banhos foram colocadas em uma solução de etanol 95° e hidróxido de amônio a 10%, por um período de 10 minutos para a remoção de pigmentos formólicos. Foram então lavadas em água corrente por 10 minutos e incubadas em água destilada por mais 10 minutos.

Os cortes sofreram tratamento à base de proteinase K, diluída em solução tampão à base de TRIS (Tris-hidroximetilainoetano) (10mM TRIS e NaCl, pH=7,5), na proporção de 1:10, durante 25 minutos em temperatura ambiente. Após este período foram lavados em dois banhos de três minutos cada de água destilada e

passados rapidamente por uma solução de etanol a 95%, sendo colocados em câmara úmida por 5 minutos para secarem.

A sonda para o EBV foi colocada em cada corte. A reação foi realizada para duas sondas diferentes para o EBV, a sonda EBER (Y5200, DAKO, Carpinteria, USA) e a sonda Lytic (Y5203, DAKO, Carpinteria, USA), sendo que a sonda Lytic marca o EBV em sua fase replicativa e a sonda EBER marca o EBV tanto na fase latente quanto na fase replicativa.

A sonda foi coberta por uma lamínula previamente limpa em álcool absoluto, e as lâminas foram colocadas em câmara úmida em estufa a 55°C, por um período de 1 hora e 30 minutos.

Após este período as lamínulas foram removidas e as lâminas foram colocadas em solução (pré-aquecida) de estringência (PNA ISH Detection Kit, K5201, DAKO, Carpinteria, USA) diluída na proporção de 1:60 em água destilada, em estufa a 55° por 25 minutos.

As lâminas foram passadas por TRIS, secas e colocadas novamente em câmara úmida, onde o anticorpo (Anti-FITC/AP, PNA ISH Detection Kit, K5201, DAKO, Carpinteria, USA) foi incubado por 30 minutos.

O anticorpo foi removido com 2 banhos em TRIS, de 3 minutos cada, e passagem por água destilada. Cada corte recebeu 2 a 3 gotas do substrato (PNA ISH Detection Kit, K5201, DAKO, Carpinteria, USA), durante 30 minutos, a fim de revelar a reação.

As lâminas foram lavadas em água corrente durante 5 minutos, contracoradas com hematoxilina de Mayer durante 10 segundos, lavadas em água corrente por mais 5 minutos, desidratadas, diafanizadas e montadas em resina.

As reações consideradas positivas para o EBV, tanto para a sonda de EBER como para a sonda Lytic foram agrupadas, de maneira subjetiva, de acordo com a intensidade da positividade que exibiam, conforme escore apresentado a seguir:

+ - esparsas células positivas

++ - positividade regular

+++ - intensa positividade.

Além da intensidade, as reações também foram agrupadas de acordo com a área do epitélio em que apresentavam positividade, de modo que as reações que apresentaram marcação positiva superficial foram registradas.

4.3 Análise Estatística

Os dados obtidos, tanto na análise clínica, quanto na análise laboratorial foram registrados em um banco de dados elaborado em programa Excel (versão 7.0, Windows, Microsoft®) para posterior realização de análise estatística.

O teste de Spearman foi utilizado para a correlação entre o grau de hiperplasia gengival medicamentosa e os fatores locais como índice de placa bacteriana e presença de cálculo dentário, e a presença do EBV e HPV nas HGM ($p=0.05$).

O teste Exato de Fischer foi utilizado para comparar a presença do HPV e do EBV nos grupos controle e grupo de estudo ($p=0.05$).

O teste Exato de Fischer também foi utilizado para comparar os grupos de estudo e controle, com relação à positividade para o EBV, no que se refere à

intensidade da marcação (esparsas células positivas, positividade regular e positividade intensa) e à localização da marcação (superficial ou não).

5 RESULTADOS

Do total de pacientes TR atendidos no CAPE-FOUSP (58), 41 pacientes faziam uso de ciclosporina e/ou nifedipina. A presença ou ausência da HGM segundo o prontuário destes pacientes encontra-se especificada na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Presença de HGM segundo o prontuário de pacientes TR que faziam uso de ciclosporina e/ou nifedipina

Medicação em uso	Total de pacientes	Pacientes com HGM	Pacientes sem HGM	Prontuários sem informação sobre HGM
Apenas Ciclosporina	17	6	7	4
Apenas Nifedipina	5	1	4	0
Ciclosporina e Nifedipina	19	10	7	2

A Figura 5.1 mostra a frequência (em porcentagem) da presença da HGM nos pacientes do transplantedos renais em atendimento no CAPE-FOUSP que faziam uso de ciclosporina e/ou nifedipina.

Figura 5.1 – Frequência da HGM em pacientes TR do CAPE-FOUSP que fazem uso de ciclosporina e/ou nifedipina

A Figura 5.2 mostra a frequência (em porcentagem) da presença da HGM nos pacientes TR do CAPE-FOUSP de acordo com a medicação utilizada (apenas ciclosporina, apenas nifedipina e ciclosporina e nifedipina concomitantemente).

Figura 5.2 – Frequência de HGM nos pacientes TR do CAPE-FOUSP de acordo com a medicação utilizada

Após a análise dos prontuários, selecionamos os pacientes que faziam uso de ciclosporina ou ciclosporina e nifedipina e que apresentavam HGM e solicitamos que comparecessem ao ambulatório. Doze pacientes compareceram para a análise clínica e remoção do tecido gengival. Outros três casos de pacientes que já haviam removido a HGM, mas não compareceram para a análise clínica, foram submetidos apenas a análise laboratorial.

Os pacientes foram numerados de 1 a 15, sendo que os 12 primeiros realizaram tanto a parte clínica quanto a análise laboratorial. Em todas as tabelas que se seguirão, o número dado corresponde sempre ao mesmo paciente. Os dados colhidos durante a anamnese estão compilados no Apêndice C.

Dos pacientes analisados, 9 (60%) eram do sexo feminino e 6 (40%) eram do sexo masculino, com idades que variavam entre 16 e 62 anos, com média de 36,33 anos.

As doenças que levaram estes pacientes ao transplante renal foram: hipertensão arterial sistêmica (60%), glomerulonefrite/nefrite crônica (26,6%) e lúpus eritematoso sistêmico (6,66%). Um dos pacientes não sabia informar a doença que levou ao transplante renal (6,66%).

Entre as comorbidades relatadas pelos pacientes, a diabetes do tipo 2 foi a mais comum (26,6%), seguida pela hipertensão arterial sistêmica secundária em 20% dos casos, um caso de asma, um caso de HPV em região genital, um caso de hepatite C e um caso de cardiopatia (6,66% cada).

Oito pacientes haviam sido submetidos à remoção cirúrgica da HGM, sendo que, um paciente havia removido parcialmente a HGM, e no local em que ela havia sido removida, não houve recidiva. Um paciente, que faz parte apenas do estudo laboratorial, removeu a HGM e em seguida deixou de usar a ciclosporina, devido aos

seus efeitos colaterais, não apresentando mais recidiva. No restante dos pacientes (6 pacientes - 75%) houve recidiva da lesão. Uma paciente apresentou redução da HGM com a utilização de azitromicina, mas a HGM voltou ao tamanho anterior ao suspender a medicação. Dois pacientes trocaram a nifedipina por outro anti-hipertensivo devido à exacerbação da HGM, entretanto um deles não se adaptou ao novo anti-hipertensivo e voltou a utilizar a nifedipina.

O exame físico desses pacientes foi realizado duas vezes, em dias diferentes, a fim de excluir a possibilidade de hiperplasia gengival inflamatória e não medicamentosa. Após o primeiro exame físico os pacientes receberam orientação de higiene, raspagem e alisamento corono-radicular e curetagem subgengival, de acordo com a necessidade de cada um, para a remoção de fatores irritantes, com intenção de diminuir o componente inflamatório, facilitando o diagnóstico clínico.

Os dados colhidos durante o primeiro e segundo exames físicos, respectivamente, estão computados no Apêndice D e E.

Tanto no primeiro quanto no segundo exame físico, a maioria dos pacientes analisados exibiu uma hiperplasia gengival medicamentosa de grau 1 ou 2, e apenas um caso apresentou HGM de grau 3. Um dos pacientes apresentou diminuição do grau da HGM entre o primeiro e o segundo exame físico. Por outro lado, um paciente apresentou exacerbação do grau da HGM.

A Figura 5.3 mostra o grau de hiperplasia gengival medicamentosa de cada um dos pacientes analisados no primeiro e no segundo exame físico.

Figura 5.3 – Grau da hiperplasia gengival medicamentosa dos pacientes analisados no primeiro e segundo exames físicos

Apesar de não termos observado mudanças no grau da HGM na maioria dos pacientes, observamos uma importante redução dos fatores irritantes e inflamatórios (presença de biofilme e cálculo dentário) entre o primeiro exame físico e o segundo exame físico. Este fato pode ser facilmente observado quando analisamos as características clínicas da HGM, como superfície, coloração, consistência e brilho; a presença de cálculo e o índice de placa bacteriana. A maioria dos pacientes que possuíam HGM com coloração avermelhada no primeiro exame físico, mostrou uma HGM com coloração rósea no segundo exame. No primeiro exame físico, 12 pacientes apresentavam a HGM brilhante, enquanto que no segundo exame, apenas 9 apresentavam a HGM brilhante, nos demais a HGM apresentava-se opaca.

A tabela 5.2 mostra as características clínicas da HGM no primeiro e no segundo exame físico em cada um dos pacientes analisados. As mudanças mais significativas estão em **negrito**.

Tabela 5.2 – Características clínicas da HGM, índice de placa e presença de cálculo no primeiro e segundo exames físicos dos pacientes analisados

Paciente	HGM Superfície		HGM Coloração		HGM Consistência		HGM Brilho		Presença de cálculo		Índice de placa	
	1ºEF	2EF	1ºEF	2EF	1ºEF	2EF	1ºEF	2EF	1ºEF	2EF	1ºEF	2EF
1	PV	PV	AV	RO	FI	FI	Bri	Bri	Sim	Não	80,26	43,42
2	MV	MV	RO	RO	FI	FI	Bri	Bri	Sim	Sim	79,16	55,55
3	LI	LI	AV	RO	RE	RE	Bri	Opa	Não	Não	80,83	76,6
4	LI	LI	AV	AV	RE	RE	Bri	Bri	Não	Sim	71,87	84,37
5	PV	PV	RO	RO	RE	FI	Bri	Opa	Sim	Não	93,75	89,28
6	MV	MV	AV	AV	RE	FI	Bri	Bri	Sim	Sim	97,36	94,73
7	PV	PV	RO	RO	FI	RE	Bri	Bri	Sim	Não	77,5	52,5
8	PV	LI	AV	RO	RE	FI	Bri	Bri	Sim	Não	92,6	68,51
9	LI	PV	AV	RO	FR	RE	Bri	Opa	Sim	Sim	75	47,5
10	LI	LI	AV	RO	RE	FI	Bri	Bri	Sim	Sim	96,4	80,35
11	PV	PV	AV	AV	FI	FI	Bri	Bri	Sim	Sim	97,11	92,59
12	PV	PV	AV	RO	FI	FI	Bri	Bri	Não	Não	85	80

Legenda: LI – lisa, PV – pouco verrucosa, MV – muito verrucosa, AV – avermelhado, RO – rósea, RE – resiliente, FI – fibrosa, FR – friável, Bri – Brilhante, Opa – Opaca

O principal fator responsável pela diminuição das características inflamatórias foi o controle do biofilme, feito pelos próprios pacientes, após receberem a orientação de higiene bucal. A Figura 5.4 mostra o índice de placa bacteriana durante o primeiro e o segundo exame físico em cada paciente analisado.

Figura 5.4 – Índice de placa bacteriana nos pacientes analisados (em porcentagem, n=12)

Ao analisarmos o índice de placa, observamos que apenas um paciente (paciente 4), apresentou aumento do índice de placa do primeiro para o segundo exame clínico. Este mesmo paciente foi o único que exibiu aumento do grau da HGM entre o primeiro e o segundo exame clínico.

A Figura 5.5 mostra as características clínicas da HGM de graus 1, 2 e 3, e a evidência do biofilme com verde de malaquita em pacientes transplantados renais.

Figura 5.4 - Características clínicas da HGM em pacientes TR, A - HGM grau 1, B - HGM grau 2, C - HGM grau 3, D - evidência de placa bacteriana em paciente com HGM.

Após a análise clínica, os fragmentos de HGM removidos durante as gengivoplastias foram enviados à Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, onde foram realizadas as análises microscópicas e moleculares.

Os resultados do grupo de estudo foram comparados aos resultados de um grupo controle, composto por 20 espécimes emblocados em parafina do Arquivo de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, cujo diagnóstico histopatológico foi de “hiperplasia gengival inflamatória”. Da mesma maneira que no grupo de estudo, 60% dos casos eram de pacientes do sexo feminino e 40% de pacientes do sexo masculino, com idades entre 10 e 72 anos, com média de 34,9. Todos os casos eram de hiperplasias gengivais inflamatórias com moderado infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear. A Tabela Apêndice F mostra os dados clínicos presentes nas fichas dos anátomo-patológicos destas peças.

Os resultados obtidos nas análises microscópicas e moleculares de cada um dos pacientes do grupo de estudo estão na Tabela Apêndice G, enquanto que os resultados do grupo controle estão no Apêndice H.

Os exames anátomo-patológicos realizados com a coloração de rotina (hematoxilina-eosina) nos espécimes de pacientes TR analisados revelaram fragmento de mucosa, revestida por epitélio pavimentoso estratificado, geralmente hiperparaqueratinizado, exibindo projeções afuniladas em direção do tecido conjuntivo adjacente. O epitélio apresentava áreas de acantose, degeneração hidrópica, presença de células identificadas como coilócitos e por vezes exocitose e aumento da camada granulosa. O tecido conjuntivo era bem vascularizado e apresentava aumento na deposição de colágeno, disposto em grossos feixes permeados por moderado infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear.

Foi confirmado o diagnóstico histopatológico de hiperplasia gengival medicamentosa em todos os casos analisados.

Ao analisarmos os cortes ao HE, observamos que os coilócitos estavam presentes em 100% dos casos do grupo de estudo e em 80% do grupo controle.

A sonda de amplo espectro do HPV foi positiva em três casos do grupo de estudo (20%) e em dois casos do grupo controle (10%).

Dos casos do grupo controle positivos para a sonda de amplo espectro do HPV, um apresentou positividade para o subtipo 31/33 e o outro apresentou positividade para o subtipo 16/18. No grupo de estudo, os três casos apresentaram positividade para os subtipos 16/18 e 31/33, e dois deles apresentaram positividade para os subtipos 6/11 também.

A Figura 5.6 mostra frequência (em porcentagem) dos casos positivos para o HPV no grupo controle e no grupo de estudo.

Figura 5.6 – Frequência de casos positivos para o HPV

Não foi encontrada correlação entre as características clínicas da HGM (superfície, coloração, consistência e brilho) e a presença ou não do HPV nos casos do grupo de estudo.

Estatisticamente não houve correlação significativa entre as variáveis grau da HGM, índice de placa bacteriana, presença de cálculo dentário e presença do HPV (Teste de Spearman, $p > 0,05$).

Segundo o Teste Exato de Fischer não houve diferença estatisticamente significativa para a presença do HPV entre os grupos de estudo e o grupo controle.

Diferentemente do HPV que mostrou um padrão de marcação positiva semelhante em todos os casos positivos tanto para as sondas de amplo espectro como para de subtipos específicos, os casos positivos para o EBV mostraram padrões de marcação bastante diferenciados, por este motivo, optamos por subdividir os casos positivos.

Com relação à quantidade de células positivas, os casos receberam os seguintes escores:

+ - esparsas células positivas

++ - positividade regular

+++ - intensa positividade

Com relação à localização da marcação positiva, dividimos os casos em superficiais (apenas camadas superficiais do epitélio) ou não (células positivas distribuídas por diversas camadas do epitélio).

No grupo de estudo, todos os casos foram positivos para as duas sondas de EBV pesquisadas. Com relação à quantidade de células positivas, a maioria apresentou marcação positiva intensa para a sonda do EBV do tipo EBER. Com

relação à sonda Lytic, a maioria dos casos apresentou positividade moderada ou intensa. Ao analisarmos a localização das marcações positivas, observamos que para ambas as sondas, a minoria dos casos apresentou positividade superficial.

Já no grupo controle, dois casos (de vinte casos) foram negativos para a sonda EBER do EBV. Os resultados para as duas sondas foram semelhantes, sendo que com relação à quantidade de células positivas, a maioria dos casos apresentou uma marcação esparsa. Com relação à localização das células positivas, a maioria dos casos apresentou uma positividade superficial.

A Figura 5.7 mostra a frequência (em porcentagem) dos casos positivos para o EBV, de acordo com a quantidade de células positivas, para a sonda do tipo EBER nos grupos de estudo e no grupo controle.

Figura 5.7 – Frequência dos casos positivos para o EBV nos grupos de estudo e controle (sonda EBER)

A Figura 5.8 mostra a frequência (em porcentagem) dos casos positivos para o EBV, de acordo com a quantidade de células positivas, para a sonda do tipo Lytic nos grupos de estudo e no grupo controle.

Figura 5.8 – Frequência dos casos positivos para o EBV nos grupos de estudo e controle (sonda Lytic)

A Figura 5.9 mostra a frequência (em porcentagem) de células positivas superficiais, para cada uma das sondas analisadas para o EBV, no grupo de estudo e no grupo controle.

Figura 5.9 – Frequência de casos com positividade apenas superficial para o EBV (sondas EBER e Lytic)

Estatisticamente não houve correlação significativa entre as variáveis grau da HGM, índice de placa bacteriana, presença de cálculo dentário, e presença do EBV (Teste de Spearman, $p > 0.05$).

A frequência de células positivas esparsas é maior no grupo controle do que no grupo de estudo, para ambas as sondas, sendo que segundo o Teste Exato de Fischer há diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparamos a frequência de células positivas esparsas entre o grupo de estudo e o grupo controle.

Também é estatisticamente diferente a frequência de células positivas superficiais entre o grupo de estudo e o grupo controle, sendo que as células positivas superficiais, também são mais frequentes no grupo controle ($p < 0.05$ segundo o Teste Exato de Fischer).

Ainda, ao analisarmos a positividade para o EBV, em ambas as sondas, formamos dentro do grupo de estudo, dois subgrupos compostos da seguinte maneira: o primeiro, de casos negativos e de esparsas células positivas (+), e o segundo, de casos com positividade regular e com intensa positividade (++/+++). Procedemos o mesmo tipo de subdivisão no grupo controle e comparamos os resultados obtidos no grupo de estudo e no grupo controle, sendo que os casos com positividade regular e intensa foram mais frequentes no grupo de estudo, sendo este resultado estatisticamente significativo ($p < 0.05$ segundo o Teste Exato de Fisher).

A Figura 5.10 mostra a fotomicrografia da hiperplasia gengival medicamentosa de pacientes transplantados renais, evidenciando a presença dos coilocitos e as reações de hibridização *in situ* positivas para o HPV e o EBV.

Figura 5.8 - Fotomicrografias da HGM em pacientes TR, A - corte histológico corado por HE (aumento original de 25X), B - mesmo corte da figura A, evidenciando a presença de coilócitos (200X), C - marcação positiva para o EBV na técnica de hibridização *in situ* - sonda EBER (100X), D - mesmo corte da figura C (400X), E - marcação positiva para o EBV na técnica de hibridização *in situ* sonda Lytic (25X), F - mesmo corte da figura E (100X), G - marcação positiva para o HPV na técnica de hibridização *in situ* - sonda de amplo espectro (100X), H - mesmo corte da figura G (400X).

6 DISCUSSÃO

O sucesso do transplante renal tem aumentado muito nos últimos anos, em decorrência do avanço de técnicas cirúrgicas e do aprimoramento do uso de drogas imunossupressoras. Por esta razão, hoje em dia, os pacientes transplantados renais formam uma importante parcela dos chamados pacientes portadores de necessidades especiais que procuram tratamento odontológico.

Atualmente o CAPE (Centro de Atendimento a Pacientes Especiais da FOUSP) prove atendimento odontológico para cerca de 60 pacientes transplantados renais, onde os mesmos fazem tratamento e acompanhamento periódico.

Poucos são os pacientes que procuram tratamento odontológico com a queixa principal da HGM; sendo que geralmente apenas os pacientes com HGM exacerbada procuram o serviço a fim de solucionar este quadro. Entretanto, pudemos notar que a grande maioria dos pacientes que apresentavam HGM de grau 1 e 2, não percebiam a presença da mesma, mas, uma vez removida a lesão notavam a diferença na cavidade oral e ao menor sinal de recidiva procuravam novamente o tratamento.

A frequência da HGM causada tanto pela ciclosporina, quanto pela nifedpina descrita na literatura varia entre 2 e 85% (BOTHAS, 1997; BUSTOS et al., 2001; DESAI; SILVER, 1998; KING et al., 1994; ODA et al., 1996; SAGLAM et al., 1996; SEYMOUR; JACOBS, 1992; SEYMOUR; THOMASON; ELLIS, 1996; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997; STRACHAN; BURTON; PEARSON, 2003). Essa grande variação se dá principalmente devido à falta de uniformidade na metodologia para verificar estes índices. Nossos resultados mostraram uma frequência

intermediária, quando comparados aos da literatura (41%). Entretanto, com relação à frequência de HGM em pacientes que fazem uso concomitante de ciclosporina e nifedipina, encontramos valores muito semelhantes aos descritos na literatura (respectivamente 52,63% e 50%) (KING et al., 1994; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997). Também em concordância com a literatura, observamos uma incidência maior de HGM em mulheres (60%) (DESAI; SILVER, 1998).

Ao colhermos os dados durante a anamnese, uma paciente relatou ter utilizado azitromicina para o tratamento da HGM. Entretanto, diferentemente do relatado por Strachan, Burton e Pearson (2003), a paciente não apresentou resolução do quadro, apenas uma melhora temporária, conforme descrito por Tokgöz et al. (2004). A cirurgiã-dentista optou por não mais prescrever a azitromicina, já que para que ocorresse sucesso seria necessário um uso do constante da droga, que poderia levar à seleção de cepas bacterianas resistentes, contra-indicando o uso da azitromicina para algumas infecções. Optou-se pela remoção cirúrgica da HGM.

A literatura sobre a incidência da HGM em pacientes TR é bastante vasta, entretanto poucos autores se preocuparam em graduar a HGM. A utilização de um mesmo critério pelos autores facilitaria a comparação de dados entre os diferentes centros de tratamento, além de permitir propostas diferentes de tratamento para grau da HGM.

Em decorrência da sobreposição do processo inflamatório sobre a HGM, descrita por diversos autores (BOTHIA, 1997; SEYMOUR; JACOBS, 1992; STRACHAN; BURTON; PEARSON, 2003), optamos por realizar a mensuração do grau da HGM em duas oportunidades diferentes. Desta maneira, pudemos remover os fatores irritantes, diminuindo o componente inflamatório e nos certificarmos de

estarmos diante de uma verdadeira HGM e não de uma simples hiperplasia gengival inflamatória. Em dois casos observamos mudança no grau da HGM entre um momento e outro. Em um dos casos o grau da HGM diminuiu, e em outro o grau da HGM aumentou. Vale a pena ressaltar que o caso que apresentou aumento do grau da HGM foi o único caso que também apresentou aumento no índice de placa bacteriana entre uma consulta e outra.

Apesar deste fato, não encontramos correlação estatisticamente significativa entre o grau da HGM e o índice de placa bacteriana ou a presença de cálculo. Clinicamente observamos que uma vez removida a HGM, o rigoroso controle de higiene não era suficiente para prevenir a instalação da HGM. Perante este fato, discordamos de trabalhos que afirmam que a placa bacteriana é um fator desencadeante da HGM (BOTHÁ, 1997; SEYMOUR; JACOBS, 1992, SEYMOUR; THOMASON; ELLIS, 1996; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997). Acreditamos que a presença da placa bacteriana seja secundária ao aparecimento da HGM, uma vez que as características clínicas da mesma dificultam uma correta higienização, levando, em um segundo momento à associação da hiperplasia e da inflamação, que pode refletir clinicamente em um aumento gengival ainda maior.

A dificuldade em obter exames para a mensuração da concentração plasmática das drogas imunossupressoras como a ciclosporina, não nos permitiu relacionar a presença e severidade da HGM com a concentração das drogas. Entretanto, o fato de que mesmo com o controle de placa bacteriana, a HGM se desenvolve, leva-nos a concordar com autores como Ciavarella et al. (2007) e Seymour e Jacobs (1992), King et al. (1994) que acreditam que a HGM é dose-dependente e que é necessária uma concentração mínima da droga para que a HGM se desenvolva.

Saglam et al. (1996) descreve um caso severo de HGM, com uma superfície com projeções digitiformes que os levaram a desconfiar da infecção pelo HPV nestes tecidos. Também baseados nas características clínicas da HGM, com projeções digitiformes, Bustos et al. (2001) pesquisaram a presença do HPV na HGM de pacientes TR. Ambos encontraram positividade para o HPV na HGM dos pacientes TR. Em decorrência destes trabalhos, optamos por analisar clinicamente a superfície da HGM de nossos pacientes TR, assim como o grau da HGM e correlacionar estes achados com a presença ou não do HPV nestes tecidos. Apenas dois casos apresentavam a superfície muito verrucosa, lembrando projeções digitiformes. Um deles era também o caso de HGM mais exacerbado analisado, entretanto, este caso não foi positivo para a sonda de HPV de amplo espectro. O outro caso, de uma HGM de grau 2, foi positivo para a sonda de amplo espectro para o HPV, assim como para os subtipos 6/11, 16/18 e 31/33. Apesar destes achados, não encontramos significância estatística entre o grau da HGM, a presença ou ausência do HPV e característica clínica (superfície verrucosa) da HGM.

Nossos resultados confirmaram que o HPV pode estar presente em tecidos normais de pacientes normorreativos, e está presente mais comumente nos tecidos dos pacientes TR, acreditamos que exista apenas uma infecção secundária da HGM pelo HPV. Não acreditamos que o HPV seja capaz de exacerbar ou modificar a aparência clínica da HGM, levando a uma superfície mais verrucosa.

Ainda assim, identificar o HPV na HGM de pacientes TR parece ser importante, uma vez que o vírus é mais um fator predisponente ao aparecimento de neoplasias malignas, como o carcinoma epidermóide, sabidamente mais frequente em pacientes imunossuprimidos. A identificação do HPV na HGM pode ser realizada freqüentemente, uma vez que a HGM é excisada periodicamente, permitindo a

avaliação de alterações teciduais, o que permite a indicação de tratamento com antivirais, vacinas e um acompanhamento cuidadoso.

Da mesma maneira que para o HPV, não encontramos correlação estatística entre a positividade para o EBV e o grau da HGM e a presença de fatores locais. Tanto o grupo de estudo quanto o grupo controle foram altamente positivos para o EBV. No entanto todos os pacientes TR analisados mostraram positividade para as duas sondas do EBV, EBER e Lytic, que marcam as fases latente e replicativa e apenas a fase replicativa, respectivamente. Já no grupo controle, dois casos foram negativos para a sonda de EBER.

Apesar de não haver diferenças estatísticas no número de casos positivos para o EBV, a distribuição das células positivas nos chamou muito a atenção. O grupo controle apresentou esparsas células positivas na maioria dos casos, sendo que estas se limitavam às camadas mais superficiais do epitélio. Estes achados são compatíveis com o que a literatura chama de contaminação secundária causada pela saliva, um dos grandes reservatórios de EBV do corpo humano.

Já o grupo de estudo exibiu uma marcação que variou de regular a intensa, e que atingiu as camadas córnea, granulosa e espinhosa do epitélio. Isto pode estar relacionado com dois fatores: a imunossupressão medicamentosa, que pode permitir mais facilmente a entrada do EBV vindo da saliva nos tecidos, ou; o EBV circulante se instalar na camada basal do epitélio e a partir daí proliferar-se.

Apesar de termos observado uma maior quantidade de células positivas para o EBV nos pacientes TR, nenhum caso foi diagnosticado como uma desordem linfoproliferativa.

Estudos que relacionem a infecção local do EBV, com a infecção circulante e carga viral capaz de promover as desordens linfoproliferativas podem ser realizados

e nos ajudariam a estabelecer uma relação entre a quantidade de infecção local pelo EBV e possível desenvolvimento de desordens linfoproliferativas. No entanto ainda não existem padrões que estabeleçam o nível de EBV capaz de provocar o desenvolvimento de desordens linfoproliferativas.

A manifestação mais expressiva do EBV na HGM de pacientes TR pode justificar tanto a profilaxia com aciclovir, quanto a diminuição das dosagens de drogas imunossupressoras nestes pacientes, a fim de prevenir o desenvolvimento de desordens linfoproliferativas e linfomas.

Em decorrência da grande quantidade de infecções oportunistas que acometem pacientes TR, levando ao desenvolvimento de desordens linfoproliferativas e neoplasias malignas, e da probabilidade destas manifestarem-se em gengiva, é interessante que amostras de HGM, em especial quando estas se apresentam severas ou alteradas, sejam analisadas, com especial atenção à possível presença de vírus como o HPV e o EBV. E, em caso de constatação de alguma alteração, que esta seja tratada o mais rápido possível, impedindo maiores complicações para estes pacientes.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitiram concluir que:

- A maioria dos pacientes transplantados renais (TR) em atendimento no CAPE-FOUSP não apresenta hiperplasia gengival medicamentosa (HGM), entretanto quando esta se faz presente é leve ou moderada,
- A infecção pelo EBV (Vírus Epstein-Barr) foi mais frequente e severa no grupo de estudo, sendo encontrado em maior quantidade e em maior profundidade no epitélio das HGM dos pacientes TR analisados, quando comparado ao grupo controle, caracterizando uma infecção oportunista,
- A presença do HPV na HGM pode ser classificada como uma infecção secundária, sendo preocupante apenas em casos de imunossupressão severa,
- Não há correlação entre o grau de hiperplasia gengival medicamentosa de pacientes TR com o índice de placa, presença de cálculo dentário e a presença do EBV e HPV.

REFERÊNCIAS¹

Akinwande JA, Kazeem AA, Taiwo EO. Immunohistochemical localization of Epstein-Barr virus receptor on hyperplastic gingival of kidney allotransplant patient immunocompromised by cyclosporin A. *Afr Dent J* 1995; 9:20-4.

Al-Mohaya MA, Darwazeh A, Al-Khudair W. Oral fungal colonization and oral candidiasis in renal transplant patients: The relationship to Miswak use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93:455-60.

Al-Osman A, Perry JB, Birek C. Extensive papillomatosis of the palate exhibiting epithelial dysplasia and HPV 16 gene expression in renal transplant recipient. *J Can Dent Assoc* 2006;72(4):331-4.

Ammatuna P, Campisi G, Giovanelli L, Giambelluca D, Alaimo C, Mancuso S, Margiotta V. Presence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and human papillomavirus in normal oral mucosa of HIV-infected and renal transplant patients. *Oral Diseases* 2001; 7:34-40.

Ammatuna P, Capone F, Giambelluca D, Pizzo I, D'Allia G, Margiotta V. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA antigen in oral mucosa of renal transplant patients with and without clinical evidence of hairy leucoplakia (OHL). *J Oral Pathol Med* 1998; 27(9):420-7.

Anderson K, Perez-Montiel D, Miles L, Allen CM, Nuovo G. The histologic differentiation of oral condyloma from its mimics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96(4):420-4.

Andrés A. Cancer incidence after immunosuppressive treatment following kidney transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56(1):71-85.

Angeopoulos AP, Goaz PW. Incidence of diphenylhydantoin gingival hyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972;34(6):898-906.

¹ De acordo com o estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Argani H, Pourabbas R, Hassanzadeh D, Masri M, Rahravi H. Treatment of cyclosporine-induced gingival overgrowth with azitromycin-containing toothpaste. *Exp Clin Transplant* 2006; 4(1):420-4.

Baiocchi OCG, Colleoni GWB, Caballero OL, Vettore AL, Andrade ALSS, Pestana JOM. *Haematologica* 2004; 89(3):366-7.

Boubenider S, Hiesse C, Goupy C, Kriaa F, Marchand S, Charpentier B. Incidence and consequences of post-transplantation lymphoproliferative disorders. *J Nephrol* 1997; 10(3):136-45.

Botha PJ. Drug-induced gingival hyperplasia and its management – a literature review. *J Dent Assoc S Afr* 1997;52(11):659-64.

Braz-Silva PH, Ortega KL, Rezende NP, Nunes FD, Magalhães MHCG. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in the oral mucosa of renal transplant patients. *Diagn Cytopathol* 2006; 34:24(1):24-8.

Bustos DA, Grenón MS, Benitez M, Boccardo G, Pavan JV, Gendelman H. Human papillomavirus infection in cyclosporin-induced gingival overgrowth in renal allograft recipients. *J Periodontol* 2001;72(6):741-4.

Chand DH, Southerland SM, Cunningham RJ. Tacrolimus: The good, the bad, and the ugly. *Pediatr Transplantation* 2001;5:32-6.

Ciavarella D, Guiglia R, Campisi G, Cosola M, Liberto C, Sabatucci A et al. Update on gingival overgrowth by cyclosporine A in renal transplants. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12:E19-25.

Desai P, Silver JG. Drug-induced gingival enlargements. *J Can Dent Assoc* 1998; 64(4):263-8.

Douglas LR, Douglass JB, Sieck JO, Smith PJ. Oral management of the patient with end-stage liver disease and the liver transplant patient. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 86(1):55-64.

Epstein JB, Sherlock CH, Wolber RA. Oral manifestations of cytomegalovirus infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;75(4):443-51.

Faulkner GC, Krajewski AS, Crawford DH. The ins and outs of EBV infection. *Trend Microbiol* 2000; 8(4):185-9.

Flanagan KH, Brennan DC. EBV-associated recurrent Hodgkin's disease after renal transplantation. *Transpl Int* 2006; 19(4):338-41.

Fong IW, Ho J, Toy C, Lo B, Fong MW. Value of long-term administration of acyclovir and similar agents for protecting against AIDS-related lymphoma: case control and historical cohort studies. *Clin Infect Dis* 2000; 30:757-61.

Grassi FR, Pappalardo S, Baglio OA, Frateiacchi A, Scortichini A, Papa F et al. Gingival overgrowth in renal transplant recipients induced by pharmacological treatment. *Minerva Stomatol* 2006; 55(1-2):59-65.

Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(4):188-96.

Hille JJ, Webster-Cyriaque J, Palefski JM, Raab-Traub N. Mechanisms of expression of HHV8, EBV and HPV in selected HIV-associated oral lesions. *Oral Diseases* 2002; 8(Suppl.2):151-68.

Hormia M, Willberg J, Ruukonen H, Syrjanen S. Marginal periodontium as a potential reservoir of human papillomavirus in oral mucosa. *J Periodontol* 2005; 76(3):358-63.

King GN, Healy CM, Glover MT, Kwan JTC, Williams DM, Leigh IM, et al. Prevalence and risk factors associated with leucoplakia, hairy leucoplakia, erythematous candidiasis, and gingival hyperplasia in renal transplant patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78(6):718-26.

Kirk AD, Ford E, Fischer S, Hale DA, Cohen J, Mannon RB. Epstein-Barr virus (EBV) as a biological indicator of immunosuppression in human renal transplantation. *Transplantation* 2006; 82(1 Suppl 2):148-9.

Köpf S, Tönshoff B. Surveillance of Epstein-Barr virus infection as a risk factor for post-transplant lymphoproliferative disorder in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol* 2004;19:365-8.

Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickleit V, Ryffel B. The side-effects of ciclosporine-A and tacrolimus. *Clin Nephrol* 1998; 49(6):356-63.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Oral & Maxillofacial Pathology*. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1995.

Nishikawa S, Nagata T, Morisaki I, Oka T, Ishida H. Pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. A review of studies in the rat model. *J Clin Periodontol* 1996; 67(5):463-71.

Oda D, Persson GR, Haigh WG, Sabath DE, Penn I, Aziz S. Oral presentation of posttransplantation lymphoproliferative disorders. An unusual manifestation. *Transplantation* 1996;61(3):435-40.

O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol* 1972; 43(1):38.

Raut A, Huryn J, Pollack A, Zlotolow I. Unusual gingival presentation of post-transplantation lymphoproliferative disorder: a case report and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 90(4): 436-41.

Rose B, Wilkins D, Li W, Tran N, Thompson C, Cossart Y et al. Human papillomavirus in the oral cavity of patients with and without renal transplantation. *Transplantation* 2006; 82(4):570-3.

Saglam F, Onan U, Soydiye M, Yilmaz O, Kirac K, Sever MS. Human papillomavirus in a patient with several gingival overgrowth associated with cyclosporine therapy. A case report. *J Periodontol* 1996; 67(5):528-21.

Seymour RA, Jacobs DJ. Cyclosporin and gingival tissues. *J Clin Periodontol* 1992; 19(1):1-11.

Seymour RA, Thomason JM, Ellis JS. The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1996; 23(3 Pt 1):165-75.

Seymour RA, Thomason JM, Nolan A. Oral lesions in organ transplant patients. *J Oral Pathol Med* 1997; 26:297-304.

Shroff R, Rees L. The post-transplant lymphoproliferative disorder – a literature review. *Pediatr Nephrol* 2004;19:369-77.

Strachan D, Burton I, Pearson GJ. Is oral azitromycin effective for treatment of cyclosporine-induced gingival hyperplasia in cardiac transplant patients? *J Clin Pharm Ther* 2003; 28(4):329-38.

Teo CG. Viral infections in the mouth. *Oral Disease* 2002; 8(Suppl.2):88-90.

Tokgöz B, Sari HI, Yildiz O, Aslan S, Sipahioglu M, Okten T, et al. Effects of azitromycin on cyclosporine-induced gingival hyperplasia in renal transplant patients. *Transplant Proc* 2004; 36(9):2699-702.

Waaling DM, Ling PD, Gordadze AV, Montes-Walters M, Flaitz C, Nichols CM. Expression of Epstein-Barr virus latent genes in oral epithelium: determinants of the pathogenesis of oral hairy leucoplakia. *J Infect Dis* 2004;190(2):396-9.

Yin CC, Medeiros LJ, Abruzzo LV, Jones D, Farhood AI, Thomazy VA. EBV-associated B- and T-cell posttransplant lymphoproliferative disorders following primary EBV infection in a kidney transplant recipient. *Am J Clin Pathol* 2005; 123:222-8.

APÊNDICE A - Consentimento Livre E Esclarecido

Eu, Nathalie Pepe Medeiros de Rezende, aluna de pós-graduação em Patologia Bucal e estagiária voluntária do CAPE (Centro de Atendimento à Pacientes Especiais da FOU SP), estou realizando uma pesquisa intitulada “Identificação do EBV e HPV através da técnica de hibridização *in situ* em hiperplasias gengivais de pacientes transplantados renais”.

Sabemos que o paciente transplantado renal toma diversas drogas, entre elas a ciclosporina e a nifedipina, responsáveis pelo aparecimento da hiperplasia gengival medicamentosa (crescimento da gengiva devido a medicação utilizada) e que em alguns pacientes este crescimento é leve e em outros é bastante severo.

O objetivo do nosso trabalho é estudar a gengiva dos pacientes transplantados renais, atendidos no CAPE. Realizaremos um exame que consiste em verificar o grau de crescimento da gengiva e a quantidade de placa existente (utilizaremos um corante que irá colorir todos os lugares que foram mal escovados e depois removeremos este corante com uma escovação correta). Caso seja necessária a remoção deste crescimento da gengiva, será realizada a cirurgia, e enviaremos a gengiva removida para o laboratório para que possamos estudar a presença do vírus EBV e HPV nestes casos.

Acreditamos que com essa pesquisa entenderemos melhor por que o paciente transplantado renal possui este crescimento gengival, e deste modo esperamos realizar um tratamento melhor.

Essa pesquisa não tem nenhum custo para o paciente

A pesquisa não causará danos ao paciente; existem riscos para os pacientes que tiverem que fazer alguma cirurgia (a remoção do crescimento gengival, por exemplo), como hemorragias e infecções (que podem acontecer em qualquer cirurgia), mas para que isso não

ocorra, vamos pedir exames de sangue antes da cirurgia, entraremos em contato com o médico que acompanha o paciente, e daremos antibióticos a fim de evitar as infecções. Caso algum problema ocorra, o paciente terá assistência integral da dentista.

A consulta levará aproximadamente 20 minutos e será realizada no mesmo dia em que o paciente estiver em atendimento no CAPE, não sendo necessária a vinda até o CAPE apenas para esta consulta.

Os dados referentes ao paciente são confidenciais, ou seja, não diremos a ninguém quem é o paciente que estamos estudando.

Toda e qualquer dúvida do paciente e/ou responsáveis poderá ser esclarecida.

A participação nesta pesquisa é voluntária (ou seja, não é obrigatória) e não influenciará em nada o atendimento normal do paciente no CAPE.

O paciente que quiser participar da pesquisa possui o direito de se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma consequência.

☐ Sim, quero participar da pesquisa, e estou recebendo uma cópia deste documento:

Nome do paciente

Assinatura do responsável

Pesquisadora: Nathalie Pepe Medeiros de Rezende CROSP:65137

APÊNDICE B – Ficha Clínica

Projeto de Pesquisa de Doutorado:

“Identificação do EBV e HPV através da técnica de hibridização *in situ* em hiperplasias gengivais de pacientes transplantados renais”

Aluna: Nathalie Pepe Medeiros de Rezende

Orientadora: Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães

FICHA CLÍNICA
(Grupo de Estudo)

Paciente:_____

1. Identificação:

Paciente:_____

Sexo:_____ Idade:_____ Raça:_____

Número CAPE:_____ Telefone para contato:_____

2. Anamnese:

História Médica:

Por _____ que _____ fez _____ o _____ transplante _____ renal?

Doença de base que levou ao transplante de rim: _____

Data do transplante: __/__/____

Médico/hospital em que faz acompanhamento: _____

Outras doenças sistêmicas: _____

Medicação Em Uso:

Medicação	apresentação	Posologia	Tempo decorrido desde o início da medicação

Se não usa, já fez uso de:

Ciclosporina ☐ sim ☐ não

Nifedipina ☐ sim ☐ não

Histórico de doenças gengivais

Já teve:

Gengivite ☐ sim ☐ não

Periodontite ☐ sim ☐ não

Hiperplasia gengival medicamentosa? ☐ sim ☐ não

Se sim:

Já removeu cirurgicamente? ☐ sim ☐ não

Recidivou? ☐ sim ☐ não

Regrediu com algum medicamento? ☐ sim ☐ não

Teve que mudar a medicação por causa da HGM? ☐ sim ☐ não

3. Exame Físico:

1ª visita:

data: __/__/__

Tomou antibiótico prévio? ☐ sim ☐ não

GRAU DE HIPERPLASIA GENGIVAL: _____

Grau 0 – gengiva normal, sem hiperplasia gengival

Grau 1 – hiperplasia gengival cobrindo o terço cervical ou menos dos dentes anteriores

Grau 2 – hiperplasia gengival cobrindo até o terço médio dos dentes anteriores

Grau 3 – hiperplasia gengival cobrindo mais de dois terços dos dentes anteriores.

LOCALIZAÇÃO DA HIPERPLASIA GENGIVAL: _____

ASPECTO CLÍNICO DA HIPERPLASIA GENGIVAL

Superfície: ☐ lisa

☐ verrucosa

Se sim: ☐ pouco

☐ muito

Coloração: ☐ arroxeada

☐ avermelhada

☐ rósea

Consistência: ☐ fibrosa

☐ friável

☐ resiliente

Brilho: ☐ brilhante
☐ opaca

PRESENÇA DE CÁLCULO: ☐ sim ☐ não

ÍNDICE DE PLACA (O'LEARY): _____

PROCEDIMENTOS REALIZADOS APÓS O EXAME CLÍNICO:

OHB ☐ sim ☐ não

Profilaxia ☐ sim ☐ não

RACR ☐ sim ☐ não

Curetagem subgengival ☐ sim ☐ não

2ª visita:

data: __/__/____

Tomou antibiótico prévio? ☐ sim ☐ não

GRAU DE HIPERPLASIA GENGIVAL: _____

Grau 0 – gengiva normal, sem hiperplasia gengival

Grau 1 – hiperplasia gengival cobrindo o terço cervical ou menos dos dentes anteriores

Grau 2 – hiperplasia gengival cobrindo até o terço médio dos dentes anteriores

Grau 3 – hiperplasia gengival cobrindo mais de dois terços dos dentes anteriores.

LOCALIZAÇÃO DA HIPERPLASIA GENGIVAL: _____

ASPECTO CLÍNICO DA HIPERPLASIA GENGIVAL

Superfície: ☐ lisa
☐ verrucosa
Se sim: ☐ pouco
☐ muito

Coloração: ☐ arroxeada
☐ avermelhada
☐ rósea

Consistência: ☐ fibrosa
☐ friável
☐ resiliente

Brilho: ☐ brilhante
☐ opaca

PRESENÇA DE CÁLCULO: ☐ sim ☐ não

ÍNDICE DE PLACA (O'LEARY):

REMOÇÃO DE TECIDO GENGIVAL: ☐ sim ☐ não

LOCALIZAÇÃO: _____

APÊNDICE C - Dados colhidos durante a anamnese do grupo de estudo

Caso	1	2	3	4	5	6	7
Número CAPE	4485	5837	6589	6009	5402	6381	5487
Sexo	F	M	M	F	F	F	M
Idade	40	62	34	16	31	41	44
Raça	N	N	N	B	N	B	B
Doença que levou ao TR	HAS	HAS	HAS	Glomerulo nefrite segmentar focal	HAS	LES/HAS	HAS
Data do TR	06/2000	12/1994	2002	07/2003	10/2001	05/1998	08/2000
Outras doenças	Diabetes tipo 2	Diabetes tipo 2	NDN	HAS	Diabetes tipo 2	NDN	NDN
Já teve?	Gengivite	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	DP	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim
	HGM	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Se já teve HGM	Removeu cirurgica/e	Parcialmente	Sim	Não	Sim	Sim	Não
	Recidiva	Não	Sim	-----	Sim	Sim	-----
	Regrediu com medicação	Não	Não	Não	Não	Sim (Azitromicina)	Não
	Mudou a medicação por causa da HGM	Sim (nifedipina por propranolol)	Não	Não	Não	Nifedipina por outro anti – hipertensivo. Não se adaptou.	Não
Medicação em uso	Ciclosporina (125mg/dia) Azatioprina (100 mg/dia) Glibenclamida (1 cp/dia) Sinvastatina (1 cp/dia) AAS infantil (1cp/dia) Furosemida (40mg/dia)	Ciclosporina (150 mg/dia) Azatioprina (50 mg/dia) Predinisona (5 mg/dia) Nifedipina (20mg/dia) AAS infantil (1 cp/dia) Sinvastatina (10mg/dia) Insulina NPH (40 unidades pela manhã e 10 unidades à noite)	Ciclosporina (200mg/dia) Predinisona (10mg/dia) Micofenolato de Mofetila (150mg/dia) Nifedipina (60mg/dia) Propranolol (160 mg/dia)	Predinisona (5 mg/dia) Ciclosporina (2 ml/dia) Azatioprina (75mg/dia) Metildopa (200mg/dia) Captopril (25 mg/dia)	Insulina NPH (30u - manhã e 10u à noite) Nifedipina (30mg/dia) Ciclosporina (250 mg/dia) Ranitidina (150mg/dia) Micofenolato de Mofetila (2grs/dia) Sinvastatina (20mg/dia) Predinisona (10mg/dia)	Ranitidina (2 cp/dia) Omeprazol (1 a 2 cp/dia) Ciclosporina (200mg/dia) Azatioprina (100mg/dia) Predinisona (10mg/dia) Propranolol (120mg/dia) Captopril (75mg/dia) Halodipina (10mg/dia)	Ciclosporina (200mg/dia) Micofenolato de mofetila (1gr/dia) Predinisona (10mg/dia) Nifedipina (80mg/dia) Propranolol (160mg/dia) AAS infantil (100mg/dia)
Faz ou fez uso de:	Ciclosporina	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	Nifedipina	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim

TR – Transplante renal

M – Sexo Masculino

F – Sexo Feminino

N – Raça Negra

B – Raça Branca

AAS – Ácido acetil Salicílico

HGM – Hiperplasia Gengival Medicamentosa

DP – Doença Periodontal

LES – Lúpus eritematoso sistêmico

NDN – Nada Digno de Nota

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

cp – comprimido

mg – miligrama

gr – grama

u – unidade

ml - mililitro

(Continua...)

Caso		8	9	10	11	12	13	14	15
Número CAPE		6327	6854	5765	6908	5402	5102	4086	5149
Sexo		M	F	F	M	F	M	F	F
Idade		19	41	33	37	31	37	47	32
Raça		N	B	B	A	N	N	N	N
Doença que levou ao TR		HAS	Nefrite crônica	Nefrite crônica	Glomérulo Nefrite	HAS	Não soube informar	HAS	HAS
Data do TR		06/1998	04/1993	03/1998	08/1993	10/2001	1998	07/1995	1994
Outras doenças		NDN	NDN	HPV em região genital	HAS Asma	Diabetes tipo 2	HAS Hepatite C	NDN	Cardiopatia
Já teve?	Gengivite	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	DP	Não	???	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
	HGM	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Se já teve HGM	Removeu cirurgica/e	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
	Recidiva	-----	-----	-----	-----	Sim	Não (deixou de usar a ciclosporina)	Sim	Sim
	Regrediu com medicação	Não	Não	Não	Não	Sim - Azitromicina	Não	Não	Não
	Mudou a medicação por causa da HGM	Não	Não	Não	Não	Nifedipina por outro anti – hipertensivo. Não se adaptou.	Sim	Não	Não
Medicação em uso		Ciclosporina (0,8mg/kg/dia duas vezes ao dia) Azatioprina (100mg/dia) Prednisona (5mg/dia)	Ciclosporina (250mg/dia) Azatioprina (100mg/dia) Nifedipina (20mg/dia)	Ciclosporina (200mg/dia) Azatioprina (50mg/dia) Prednisona (10mg/dia) Complexo B (10mg/dia) Sulfato ferroso (10mg/dia) Ácido Fólico (5mg/dia) Fluconazol 150mg/dia)	Ciclosporina (100mg/dia) Azatioprina (112,5mg/dia) Prednisona (7,5mg/dia) Nifedipina (30mg/dia) AAS infantil (1cp/dia) Maleato de Enalapril (20mg/dia)	Insulina NPH (30u - manhã e 10u à noite) Nifedipina (30mg/dia) Ciclosporina (250 mg/dia) Ranitidina (150mg/dia) Micofenolato de Mofetila (2grs/dia) Sinvastatina (20mg/dia) Prednisona (10mg/dia)	Ciclosporina (300mg/dia) Prednisona (10mg/dia) Nifedipina (40mg/dia)	Ciclosporina (200mg/dia) Alodipina (10mg/dia) Prednisona (10mg/dia e 20mg/dia – dias alternados) AAS Furosemida Azatioprina	Ciclosporina (250mg/dia) Azatioprina (100mg/dia) Prednisona (10mg/dia) Propanolol (240mg/dia) Nifedipina (40mg/dia)
Faz ou fez uso de:	Ciclosporina	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	Nifedipina	Sim (tomou por 6 meses antes do TR)	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim

TR – Transplante renal

M – Sexo Masculino

F – Sexo Feminino

N – Raça Negra

B – Raça Branca

A – Raça Amarela

cp – comprimido

mg – miligrama

gr – grama

u – unidade

ml – mililitro

AAS – Ácido acetil Salicílico

HGM – Hiperplasia Gengival Medicamentosa

DP – Doença Periodontal

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

NDN – Nada Digno de Nota

APÊNDICE D - Dados colhidos no primeiro exame físico do grupo de estudo

Caso				1	2	3	4	5	6	7
Grau de hiperplasia gengival				1	3	1	1	2	2	2
Localização da hiperplasia gengival				Papilas inter dentais	Gen	Papilas inter dentais	Papilas inter dentais	Gen	Gen (superior/ grau 2) e papilas inter dentais (inferior/ grau 1)	Gen
Aspecto clínico da HGM	Superfície	Lisa				Sim	Sim			
		Verrucosa	Pouco	Sim				Sim		Sim
			Muito		Sim				Sim	
	Coloração	Arroxeadada								
		Avermelhada		Sim		Sim	Sim		Sim	
		Rósea			Sim			Sim		Sim
	Consistência	Fibrosa		Sim	Sim					Sim
		Friável								
		Resiliente				Sim	Sim	Sim	Sim	
	Brilho	Brilhante		Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Opaca										
Presença de cálculo				Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim
Índice de placa (em %)				80,26	79,16	80,83	71,87	93,75	97,36	77,5
Procedimento realizado				OHB Profi RACR	OHB Profi RACR Cut.Sub	OHB Profi	OHB Profi	OHB Profi	OHB Profi	OHB Profi RACR

(Continua...)

Gen – Generalizada

OHB – Orientação de higiene bucal

Profi – Profilaxia

RACR – Raspagem e alisamento corono-radicular

Cut. Sub – Curetagem subgengival

Caso				8	9	10	11	12
Grau de hiperplasia gengival				2	1	1	2	2
Localização da hiperplasia gengival				Entre os dentes 11 e 21	Papilas inter dentais	Papilas inter dentais	Anterior Superior	Anterior Superior
Aspecto clínico da HGM	Superfície	Lisa			Sim	Sim		
		Verrucosa	Pouco	Sim			Sim	Sim
			Muito					
	Coloração	Arroxeadada						
		Avermelhada		Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
		Rósea						
	Consistência	Fibrosa					Sim	Sim
		Friável			Sim			
		Resiliente		Sim		Sim		
	Brilho	Brilhante		Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Opaca								
Presença de cálculo				Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Índice de placa (em %)				92,6	75	96,4	97,11	85
Procedimento realizado				OHB Profi	OHB Profi RACR	OHB Profi	OHB Profi	OHB Profi

Gen – Generalizada

OHB – Orientação de higiene bucal

Profi – Profilaxia

RACR – Raspagem e alisamento corono-radicular

Cut. Sub – Curetagem subgengival

APÊNDICE E - Dados colhidos no segundo exame físico do grupo de estudo

Caso				1	2	3	4	5	6	7
Grau de hiperplasia gengival				1	3	1	2	2	2	2
Localização da hiperplasia gengival				Papilas inter dentais	Gen	Papilas inter dentais	Papilas inter dentais	Gen	Gen (superior/ grau 2) e nas papilas inter dentais (inferior/ grau 1)	Gen
Aspecto clínico da HGM	Superfície	Lisa				Sim	Sim			
		Verrucosa	Pouco	Sim				Sim		Sim
			Muito		Sim				Sim	
	Coloração	Arroxeadada								
		Avermelhada					Sim		Sim	
		Rósea		Sim	Sim	Sim		Sim		Sim
	Consistência	Fibrosa		Sim	Sim			Sim	Sim	
		Friável								
		Resiliente				Sim	Sim			Sim
	Brilho	Brilhante		Sim	Sim		Sim		Sim	Sim
Opaca				Sim		Sim				
Presença de cálculo				Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
Índice de placa (em %)				43,42	55,55	76,6	84,37	89,28	94,73	52,5
Remoção de tecido gengival				Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

(Continua...)

Caso				8	9	10	11	12
Grau de hiperplasia gengival				1	1	1	2	2
Localização da hiperplasia gengival				Entre os dentes 11 e 21	Gengiva inserida vestibular inferior	Papilas interdetais	Anterior Superior	Anterior Superior
Aspecto clínico da HGM	Superfície	Lisa		Sim		Sim		
		Verrucosa	Pouco		Sim		Sim	Sim
			Muito					
	Coloração	Arroxeadada						
		Avermelhada					Sim	
		Rósea		Sim	Sim	Sim		Sim
	Consistência	Fibrosa		Sim		Sim	Sim	Sim
		Friável						
		Resiliente			Sim			
	Brilho	Brilhante		Sim		Sim	Sim	Sim
Opaca			Sim					
Presença de cálculo				Não	Sim	Sim	Sim	Não
Índice de placa (em %)				68,51	47,5	80,35	92,59	80
Remoção de tecido gengival				Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

**APÊNDICE F - Dados clínicos presentes nas fichas dos anátomo-patológico das peças
utilizadas como grupo controle**

Caso	Número do exame anátomo - patológico	Sexo	Idade	Localização
16	43296	F	25	Ao redor dos dentes 32 e 33
17	43645	M	72	Ao redor dos dentes 26 e 27
18	47495	M	60	Ao redor do dente 47
19	47650	M	61	Região superior direita
20	48108	F	56	Ao redor do canino e incisivo lateral direito
21	48142	F	19	-----
22	48460	F	38	Ao redor dos incisivos superiores
23	48836	M	33	-----
24	48943	F	20	-----
25	49022	M	16	Ao redor do dente 32
26	43509	F	37	Ao redor do dente 17
27	48478	M	33	-----
28	47441	F	43	Ao redor dos dentes 41 e 42
29	46118	F	12	Ao redor do dente 21
30	46187	F	23	Ao redor dos dentes 11 e 21
31	46565	M	26	Ao redor do dente 13
32	46886	F	25	Ao redor dos dentes 23 e 24
33	46906	F	39	Ao redor do dente 48
34	47277	M	10	Gengiva inserida - maxila
35	46598	F	50	Ao redor do dente 33

F – sexo feminino

M – sexo masculino

----- Dado inexistente

APÊNDICE G - Resultados laboratoriais do grupo de estudo

Caso	Número do Anátomo Patológico	Presença de colócitos no HE	Positividade para o EBV		Positividade para o HPV			
			Sonda EBER	Sonda Lytic	Sonda de amplo espectro	Sonda tipo específico 6/11	Sonda tipo específico 16/18	Sonda tipo específico 31/33
1	P4990	Sim	+ superficial	+ superficial	Negativa			
2	P4993	Sim	+++	+++	Negativa			
3	P4992	Sim	+++	+++	Negativa			
4	P5022	Sim	++	++/+++	Negativa			
5	P4991	Sim	+++	+ superficial	Negativa			
6	P5024	Sim	+++	+++	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
7	P5023	Sim	+ superficial	+	Positiva	Negativa	Positiva	Positiva
8	P5021	Sim	++	+++	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
9	P5026	Sim	++ superficial	++ superficial	Negativa			
10	P5025	Sim	+ /++ superficial	++	Negativa			
11	P5233	Sim	+ superficial	+++	Negativa			
12	P5027	Sim	+++	+++	Negativa			
13	38432	Sim	++	++	Negativa			
14	32756	Sim	+++	++	Negativa			
15	39173	Sim	+++	++	Negativa			

+ - esparsas células positivas
 ++ - positividade regular
 +++ - intensa positividade
 HE – hematoxilina-eosina
 EBV – Vírus do Epstein - Barr
 HPV – Papiloma Vírus Humano

APÊNDICE H - Resultados laboratoriais das peças do grupo controle

Caso	Presença de coilocitos no HE	Positividade para o EBV		Positividade para o HPV			
		Sonda EBER	Sonda Lytic	Sonda de amplo espectro	Sonda tipo específico 6/11	Sonda tipo específico 16/18	Sonda tipo específico 31/33
16	Sim	+ superficial	+	Negativa			
17	Sim	+ superficial	+	Negativa			
18	Sim	++	++	Positiva	Negativa	Negativa	Positiva
19	Sim	+++	+++	Negativa			
20	Sim	+ superficial	+ superficial	Negativa			
21	Sim	+ superficial	++	Negativa			
22	Não	+ superficial	+ superficial	Negativa			
23	Sim	+	+	Negativa			
24	Sim	+	+	Negativa			
25	Sim	+++	+++	Negativa			
26	Sim	Negativa	+ superficial	Negativa			
27	Não	+ superficial	+ superficial	Negativa			
28	Sim	+++	++ superficial	Negativa			
29	Sim	+ superficial	++ superficial	Negativa			
30	Não	+ superficial	+ superficial	Negativa			
31	Não	Negativa	+ superficial	Negativa			
32	Sim	+ superficial	+ superficial	Negativa			
33	Sim	+ superficial	+++	Negativa			
34	Sim	++ superficial	++ superficial	Negativa			
35	Sim	+ superficial	+ superficial	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa

+ - esparsas células positivas

++ - positividade regular

+++ - intensa positividade

HE – hematoxilina-eosina

EBV – Vírus do Epstein - Barr

HPV – Papiloma Vírus Humano

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 225/03

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa *"Identificação do EBV e HPV através da técnica de hibridização in situ em Hiperplasias Gengivais de pacientes transplantados renais"*, de responsabilidade da pesquisadora **Nathalie Pepe Medeiros de Rezende**, sob orientação da Professora Doutora **Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 23 de março de 2004

Prof.ª Dr.ª ROSA HELENA MIRANDA GRANDE
Coordenadora do CEP-FOUSP