FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

MARIA CAROLINA VAZ GOULART

HIPERPLASIA PAPILAR: ANÁLISE QUANTITATIVA DE
CANDIDA ALBICANS NO REVESTIMENTO EPITELIAL E SUA
CORRELAÇÃO COM AS CARACTERÍSTICAS
MICROSCÓPICAS.

BAURU

2009

MARIA CAROLINA VAZ GOULART

Hiperplasia papilar: análise quantitativa de *Candida albicans* no revestimento epitelial e sua correlação com as características microscópicas.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Odontologia.

Área de concentração: Patologia Bucal
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara

Bauru
2009

Goulart, Maria Carolina Vaz
G729h Hiperplasia papilar: análise quantitativa de *Candida albicans*
no revestimento epitelial e sua correlação com as características
microscópicas / Maria Carolina Vaz Goulart. – Bauru, 2009.
83p. : il. ; 31cm.

Dissertação. (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara

**Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.**

Assinatura:

Bauru, de de 2009

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 060/2008
Data: 27 de agosto de 2008.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu avô José Limírio Vaz (Zé do Zico) *in memorian*, por ser meu exemplo de ser humano. Agradeço-te por ter tentado me ensinar muito mais do que eu fui capaz de aprender.

“Você pode dizer adeus a sua família e a seus amigos e afastar-se milhas e milhas e, ao mesmo tempo, carregá-los em seu coração, em sua mente, em seu estômago, pois você não apenas vive no mundo, mas o mundo vive em você.”

Frederick Buechner – Telling the truth

Dedico aos meus pais, Gláuter e Stelita, o resultado do meu desempenho, pois vocês são o meu “porto seguro” prá onde eu sempre posso voltar quando necessito, onde eu sempre posso chorar quando quero...Obrigada por me ensinarem os verdadeiros valores da vida, sendo exemplos de dignidade, honestidade, perseverança e fé. Não existem palavras que possam explicar o meu AMOR eterno...

Aos meus irmãos Júnior e Cláudia que sempre me incentivaram, respeitaram e amaram mesmo com todos os defeitos e decisões difíceis, principalmente pela cumplicidade e amizade. Vocês são motivos de imenso orgulho para mim!

Ao meu Amor, Júlio, que sempre me incentivou e esteve ao meu lado, apesar de se incomodar com a distância. Nunca me esqueci de suas palavras:

“Seria contraditório eu dizer que te amo e não deixar você seguir o seu sonho.”

O meu maior desafio foi abdicar de nossa convivência diária, quando cada minuto de ausência parecia uma eternidade. Sem o seu AMOR nada valeria à pena!

Aos meus primos e primas, em especial Gabriel e Giovanna que, apesar de serem tão pequenos, me fazem ser tão feliz.

“A alma é curada ao estar com crianças.” - Fedor Dostoiévski -

Aos meus avós Genoveva, Conceição e João pelas orações, incentivo e apoio em todas as fases da minha vida;

Aos meus tios e tias, principalmente as minhas madrinhas Vevinha e Cida, tia Cristina e Ângela e ao meu padrinho João César que nunca mediram esforços para me incentivar e sempre se fizeram presentes em todos os momentos importantes da minha vida;

Especialmente ao meu “tio torto” Adriano que pela sua responsabilidade e amor a Patologia contribuiu para minha escolha e interesse nessa área; por sempre me escutar e me oferecer mensagens e conselhos preciosos;

Todas as dedicatórias reservo em especial a Ti Senhor, que em minha busca incessante por Ti, encontrei entusiasmo; na ansiedade, a paz; nos momentos difíceis, a certeza da Tua presença. Tu me ensinaste a aceitar e conviver em equilíbrio com as dificuldades; a contemplar todos os bons momentos... Tu me ensinaste a enriquecer o espírito quando motivada pelo desafio ou qualquer obstáculo a ser solucionado... Enfim, é certo Senhor, que nossa esperança e nossos projetos só se realizam quando acreditamos que é possível. Esta credibilidade Divina é a força que nos impulsiona à realização pessoal.

AGRADECIMENTOS

A prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara, pela orientação deste trabalho e pela contribuição na minha formação acadêmica e pessoal;

A prof^a. Dr^a. Denise Tostes de Oliveira, pela amizade e pelo carinho que sempre teve comigo;

Ao prof. Dr. Alberto Consolaro, pelos ensinamentos, estímulo e presteza;

Ao prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira, pela amizade, carinho, confiança, atenção e ombro amigo;

Ao prof. Dr. Roman Carlos-Bregni, pela amizade, carinho e ensinamentos, seu rigor científico e dedicação pelos pacientes, despertaram em mim a admiração pelo ser humano que você é;

“O educador deve ser não um sábio, mas sim um homem diferenciado por sua educação, pela força de seus costumes, pela naturalidade de seus modos, jovial, dócil, acessível, franco, enfim em quem se encontre muito que imitar e pouco que corrigir.” – Simón Bolívar –

Às funcionárias e amigas da Disciplina de Patologia Bucal: Fátima Aparecida Silveira, Maria Cristina Carrara Felipe e Marilza Dias de Almeida, pela amizade, carinho, disponibilidade, “ouvidos” e “café quentinho”. Adoro vocês;

Aos meus SMAs (super melhores amigos), Carine e Bruno, que estiveram “sempre” ao meu lado. Obrigada pelo apelido, pelos risos, pelo mau humor, pelo trabalho compartilhado... Vocês são os irmãos que eu tive a oportunidade de escolher;

Às minhas amigas Melaine, Simone e Érika, que generosamente sempre me apoiaram, por todo carinho, preocupação e ajuda. Sou eternamente grata pela experiência adquirida no dia a dia;

Aos colegas da Patologia: Aroldo, Gastão, Patrícia, Sylvie, Milton, Michele, Renata, Eliane, Rosário, Tiago, Erick, Karen, Janaína e Tadashi, pelos momentos bons ou difíceis que passamos juntos;

À amiga Vanessa, que apesar de distante, sempre se fez presente;

Ao amigo Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann, pela amizade, compreensão e auxílio no caminho ensino-aprendizagem desde a graduação;

Aos amigos que fiz na Microbiologia, André pelo carinho e disponibilidade com que sempre me auxiliou, Tatiana pelos ensinamentos de imunofluorescência, Thaís por sempre estar disposta a me ajudar;

Ao Dr. Cleverson Teixeira Soares por contribuir com meus trabalhos realizados durante o mestrado;

À Andréia de Faria Fernandes Belone, do Hospital Lauro de Souza Lima, por me ajudar nas dificuldades que tive com a técnica de imunofluorescência;

Aos colegas da Anatomia, Luis Henrique e Geraldo, por sempre estarem prontos a me ajudar quando eu precisei;

Ao Prof. Dr. José Roberto Lauris, pela ajuda na análise estatística deste trabalho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa de sua presidente Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

Ao Departamento de Estomatologia, da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do chefe Prof. Dr. Luiz Eduardo Montenegro Chinellato.

Ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa do seu coordenador Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro, possibilitando a obtenção dos anticorpos para a realização da técnica de imunofluorescência.

EPÍGRAFE

“Sem sonhos as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais. Mas, se você tiver grandes sonhos... seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades, seus medos produzirão coragem.”

Augusto Cury

RESUMO

A Hiperplasia Papilar (HP) é considerada uma forma de candidose bucal, em especial uma forma de estomatite por dentadura, tipo III segundo a classificação de Newton (1962), a qual obedece a critérios clínicos e microscópicos. Sua etiologia é ainda pouco esclarecida, mas diversos fatores têm sido associados, tais como próteses dentárias mal adaptadas, má higiene oral, material utilizado na confecção das próteses resultando em hipersensibilidade, trauma, imunodeficiência e o fungo *Candida albicans*. A aderência e a invasão deste fungo no tecido epitelial já foram comprovadas e relatadas na literatura, entretanto ainda não há trabalhos que identifiquem a presença e a localização exata do fungo *C. albicans* no revestimento epitelial das lesões de HP. Os linfócitos T e os macrófagos são as principais células envolvidas no mecanismo de defesa do hospedeiro contra leveduras do gênero *Candida*, contudo é necessário estabelecer uma relação entre a presença do fungo e as alterações epiteliais, bem como o tipo e intensidade do infiltrado inflamatório presente nas HPs. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de *Candida albicans* no revestimento epitelial de lesões de HP, por meio de imunofluorescência, e correlacionar os valores quantitativos obtidos com as características demográficas, do epitélio e do infiltrado inflamatório subepitelial. Mucosa palatal normal foi utilizada como controle. A análise estatística comparativa múltipla entre o número médio de fungos nos diferentes grupos experimentais (Grupo HP e Grupo controle) foi obtida pelo teste de Mann Whitney, e a correlação do número médio de *Candida albicans* imunomarcadas com as características do revestimento epitelial e do infiltrado inflamatório subepitelial por meio do teste de Spearman. Em ambos os testes, foram adotados o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Apenas as lesões de HP demonstraram a presença de *C. albicans*, e o número médio foi de 14 *C. albicans*/mm². Não se observou correlação entre o número médio de *C. albicans* e as diferentes características epiteliais ou do infiltrado inflamatório subjacente ou ainda as características demográficas.

Palavras-chave: Estomatite sob prótese. Hiperplasia. *Candida albicans*. Mucosa bucal.

Papillary hyperplasia: quantitative analysis of *Candida albicans* in the lining epithelium and its correlation with the microscopic characteristics.

ABSTRACT

The papillary hyperplasia (PH) is considered a form of oral candidosis, in particular a form of denture stomatitis, type III according to the classification of Newton (1962), which fulfills the clinical and microscopic criteria. Its etiology is still unclear, but several factors have been associated, such as prostheses poorly adapted, poor oral hygiene, material used in the manufacture of prostheses resulting in hypersensitivity, trauma, immune and fungus *Candida albicans*. The adhesion and invasion of this fungus in the epithelial tissue have been demonstrated and reported in the literature, however there is not a work to identify the presence and exact location of the fungus *C. albicans* in the epithelial lining of the lesions of PH. T-lymphocytes and macrophages are the main cells involved in host defense mechanism against the yeast of *Candida*, however it is necessary to establish a relationship between the presence of the fungus and the epithelial changes, and the type and intensity of inflammatory infiltrate present in PHs. This study aimed to evaluate the presence of *Candida albicans* in the epithelial lining of lesion of PH, by immunofluorescence and to correlate the quantitative values obtained with the demographic characteristics, the epithelium and the subepithelial inflammatory infiltrate. Normal palatal mucosa was used as control. Comparative statistical analysis between the multiple number of fungi in different experimental groups (PH group and Control group) was obtained by Mann Whitney test, and correlation of the average number of *Candida albicans* immunomarked with the characteristics of the epithelial lining and subepithelial inflammatory infiltrate by Spearman test. In both tests were used a significance level of 5% ($p < 0.05$). Only the lesions of PH demonstrated the presence of *C. albicans*, and the average number was 14 *C. albicans*/mm². There was no correlation between the average number of *C. albicans* and the different characteristics of epithelial or underlying inflammatory infiltrate or demographic characteristics.

Key words: Denture stomatitis. Hyperplasia. *Candida albicans*. Mouth mucosa.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	13
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1.2	<i>CANDIDA ALBICANS</i> E PATOLOGIAS BUCAIS RELACIONADAS	17
1.3	INVASÃO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> NAS CÉLULAS EPITELIAIS	22
1.4	MECANISMOS IMUNES EM RESPOSTA A <i>CANDIDA ALBICANS</i>	23
1.5	IDENTIFICAÇÃO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	23
1.6	HIPERPLASIA PAPILAR	24
1.6.1	Características Clínicas e Fatores Predisponentes	25
1.6.2	Características Microscópicas e Diagnóstico	26
2	PROPOSIÇÃO	27
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	31
3.1	SELEÇÃO DA AMOSTRA	33
3.2	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DOS CORTES CORADOS EM HEMATOXILINA E EOSINA	33
3.3	COLORAÇÕES ESPECIAIS PARA DETECÇÃO DE FUNGOS	34
3.4	DETECÇÃO DA ESPÉCIE <i>CANDIDA ALBICANS</i> PELO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	36
3.5	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	37
3.6	CORRELAÇÃO DO NÚMERO MÉDIO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> IMUNOMARCADAS COM AS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, DO REVESTIMENTO EPITELIAL E DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO SUBEPITELIAL	37
3.7	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	38
4	RESULTADOS	39
4.1	CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E CLÍNICA DA AMOSTRAGEM	41
4.1.1	Mucosa Normal de Palato (Grupo Controle)	41
4.1.2	Hiperplasia Papilar (Grupo HP)	41
4.2	CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DA AMOSTRAGEM	45
4.2.1	Mucosa Normal de Palato (Grupo Controle)	45
4.2.2	Hiperplasia Papilar (Grupo HP)	48
4.3	COLORAÇÕES ESPECIAIS	55

4.4	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	55
5	DISCUSSÃO.....	63
6	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXO.....	81

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1.1 **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Em 1839, foi observado pela primeira vez, por Langenbeck, o mais importante fungo patogênico ao homem, hoje conhecido como *Candida albicans* (*C. albicans*) (MANDELL et al., 2005).

Fungos patogênicos podem ser divididos em duas categorias gerais, patógenos primários e patógenos oportunistas. Fungos patogênicos primários existem normalmente em um reservatório ambiental e infectam pessoas que tenham sido largamente expostas ao microrganismo ou que sejam imunologicamente sensíveis ao fungo. Patógenos oportunistas aproveitam-se da debilidade ou imunossupressão do hospedeiro para causar infecção, pois na maior parte do tempo são encontrados como comensais em organismos sadios (BURIK; MAGEE, 2001; GOLECKA et al., 2006).

C. albicans é um fungo oportunista e pertence ao reino *Fungi*, filo *Deuteromycotina* ou *Fungi Imperfecti* (SINDRIN et al., 2004). É um organismo diplóide eucarioto, que possui informação genômica suficiente para crescer, multiplicar e colonizar diferentes ambientes que se tornem um meio de cultura dentro do corpo humano (ODDS, 1988).

C. albicans é um fungo dimórfico, que pode existir tanto em forma de levedura quanto em forma de hifas. Na fase de levedura, *C. albicans* pode medir de 2 a 8 µm por 3 a 14 µm e tem forma esférica ou ovóide, e as hifas podem se estender a algumas centenas de micrometros e são compostas de longas ramificações, septadas ou filamentosas. O dimorfismo não só é relevante para a patogenicidade do fungo como também para os problemas clínicos de diagnóstico e de tratamento da doença relacionada (RADFORD; CHALLACOMBE; WALTER, 1999; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; CALDERONE; FONZI, 2001).

A parede celular é composta principalmente de carboidratos (80-90%), 1-glucano, quitina, e manana. Os componentes da parede celular das leveduras e hifas são semelhantes, embora exista alguma variação quantitativa (CANNON; CHAFFIN, 1999; CALDERONE; FONZI, 2001).

Candidose é indubitavelmente a mais difundida e prevalente das doenças micóticas do ser humano, principalmente se causada pela espécie endógena, *C. albicans* (OLSEN, 1974; GOLECKA et al., 2006; KUSCH et al., 2007; CATEAU et al., 2008). Esta espécie fúngica é um componente da microbiota natural do organismo. A maioria, se não todos os humanos, adquirem este fungo ao nascimento durante o parto. Originalmente, *C. albicans* vive em harmonia com outros microrganismos no corpo e existe meramente como um colonizador. Porém, vários fatores podem interferir nessa harmonia e desencadear o desenvolvimento de uma infecção ativa e sintomática (CHANDLER; KAPLAN; AJELLO, 1980).

Fatores relacionados ao hospedeiro desempenham um papel tão importante quanto a virulência atribuída ao organismo na patogênese da candidose bucal (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; BURIK; MAGEE, 2001). O ambiente intraoral, com a presença de próteses, também desempenha um papel crucial no processo da doença. Assim, uma combinação de fatores relacionados a virulência microbiana, fatores ambientais e fatores relacionados à defesa do hospedeiro determinam a doença e as diversas manifestações da infecção (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; FILLER, 2006).

Dentre os muitos fatores predisponentes possíveis para a candidose bucal, incluem-se os fatores intrínsecos e extrínsecos. Os intrínsecos incluem a depressão da imunidade celular, como na idade avançada, gravidez, prematuridade, neoplasias, hemopatias, endocrinopatias, avitaminoses e, em particular, a AIDS. Outro fator intrínseco predisponente é a deficiência de ferro. A infecção por *C. albicans* atingirá preferencialmente os sítios com efeitos distróficos da carência de ferro, tais como língua, ângulos dos lábios e unhas das mãos. A deficiência em ferro também deprime a imunidade celular, porém a correlação entre esses fatores na promoção da candidose ainda não está clara (CAWSON; BINNIE; EVESON, 1997). Os fatores extrínsecos são principalmente as interferências com a microflora normal pelo uso prolongado de antibióticos (principalmente os de amplo espectro), de corticóides, de agentes antineoplásicos, assim como intervenções cirúrgicas e agentes físicos, como o trauma causado pela prótese (CAWSON; BINNIE; EVESON, 1997; ZAITZ et al., 1998; VARDAKAS et al., 2009).

Em contrapartida, devem ser levados em consideração os fatores de virulência das leveduras, tais como o fenômeno de aderência, a forma miceliana, a variabilidade fenotípica, a produção de enzimas extracelulares (proteases e

fosfolipases), de toxinas, dentre outros. Propriedades específicas de certas espécies favorecem a colonização e invasão dos tecidos adjacentes (ZAITZ et al., 1998; CANNON; CHAFFIN, 1999; CALDERONE; FONZI, 2001).

A candidose invasiva, também chamada de candidemia, tem emergido como uma importante infecção nosocomial em pacientes imunocomprometidos, resultando em morbidade e mortalidade significantes (DUPONT, 1991; BECK-SAQUÉ; JARVIS, 1993; FOX, 1993; CHAVASCO et al., 2006). O uso de cateter e próteses, em conjunto com técnicas cirúrgicas e a permanência nas unidades de terapia intensiva (UTI's), contribuem também para a expansão dessas infecções (MARCILLA; VALENTIN; SENTANDREU, 1998, VARDAKAS et al., 2009).

1.2 CANDIDA ALBICANS E PATOLOGIAS BUCAIS RELACIONADAS

Muitas espécies de *Candida* são comensais na mucosa bucal, mas podem causar doenças quando as condições se tornam favoráveis. Estes organismos normalmente colonizam superfícies muco-cutâneas, as quais podem constituir porta de entrada para os tecidos mais profundos, em especial quando a defesa do hospedeiro está comprometida ou mesmo quando existem áreas traumatizadas (AKPAN; MORGAN, 2002; BARBEAU et al., 2003; BADAUY et al., 2005).

Na mucosa bucal, além da imunossupressão e da presença do fungo do gênero *Candida* como fatores predisponentes, destaca-se também o uso de próteses totais ou parciais na candidose, em especial a estomatite relacionada ao uso da dentadura (BARBEAU et al., 2003), assim como a redução do fluxo salivar e mudanças da microbiota comensal. Em relação aos fatores sistêmicos que favorecem esta doença incluem-se radioterapia, antibioticoterapias, doenças malignas, dieta rica em carboidratos e desordens endócrinas, como diabetes, hiperparatireoidismo e hipotireoidismo (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000). Fatores químicos presentes no material que constitui as próteses removíveis, com potencial tóxico e alérgico, também têm sido considerados, porém raramente investigados (KNAK et al., 1983; FREITAS et al., 2008).

As principais doenças fúngicas que acometem a mucosa bucal são caracterizadas clínica e microscopicamente como candidose aguda

pseudomembranosa, candidose aguda atrófica, candidose crônica hiperplásica, glossite romboidal mediana, queilite angular e em especial, a estomatite por dentadura (DIAS; RAMOS-E-SILVA, 1994).

A estomatite por dentadura pode ainda ser classificada clinicamente em três tipos (NEWTON, 1962; BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAN, 1970a):

Tipo I: Pontos hiperêmicos em uma área limitada da mucosa. Esse tipo de lesão tem sido relacionado com o trauma da prótese;

Tipo II: Eritema difuso na maior parte da mucosa que está em contato com a prótese;

Tipo III: Inflamação com hiperplasia papilar. Nesse caso, a mucosa apresenta uma aparência nodular com superfície avermelhada, normalmente presente sob toda a área que suporta a prótese, mas pode ainda estar restrita à região central do palato.

A espécie de *Candida* mais comumente encontrada em lesões bucais é a *C. albicans*, seguida pelas espécies *C. pseudotropicalis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondi* (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; CALDERONE; FONZI, 2001; VARDAKAS et al., 2009). Em função do avanço dos métodos laboratoriais biomoleculares, como o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), mais duas espécies de *Candida* foram relacionadas genotipicamente a *C. albicans*: *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* (MCCULLOUGH; CLEMONS; STEVENS, 1999; CHAVASCO et al., 2006).

Uma característica do fungo *C. albicans*, a qual tem atraído diversos pesquisadores durante décadas, é a sua capacidade de se alternar entre diferentes morfologias. *C. albicans* pode crescer isolada, na forma de levedura por brotamento (blastóporos) ou na forma filamentosa (incluindo tanto pseudohifas quanto hifas verdadeiras), na qual as células permanecem aderidas após a divisão celular (ODDS, 1988, CALDERONE; FONZI, 2001; BURIK; MAGEE, 2002).

Diversas mudanças ambientais, incluindo a passagem do metabolismo aeróbico para o metabolismo fermentativo ou o aumento de determinados compostos, como a N-acetil glucosamina, causam a mudança da levedura de *C. albicans* para o crescimento filamentoso (hifa). Esta mudança é acompanhada por alterações no metabolismo de carboidratos e a interrupção da transferência de elétrons no interior da célula. Tanto a temperatura quanto o pH podem regular o dimorfismo de *C. albicans* (BUFFO; HERMAN; SOLE, 1984; CALDERONE; FONZI, 2001).

As três principais formas, blastóporos, pseudohifas e hifas, são encontradas em todos os tecidos infectados, e os estudos até agora indicam que a transição entre estas formas é fundamental para a patogênese. Essa transição também pode ser manipulada em laboratório alterando-se o meio de cultura (UHL et al. 2003).

Candida albicans invade o epitélio na forma de hifa e, na maioria dos casos, induz uma resposta proliferativa epitelial (KING; LEE; MORRIS, 1980; CAWSON; BINNIE; EVESON, 1997).

Leveduras foram detectadas em 78 a 100% dos pacientes com estomatite induzida por prótese, com um aumento de 10 vezes na contagem das leveduras obtidas a partir da placa microbiana sobre a prótese dos pacientes com estomatite comparada aquela dos controles saudáveis (BUDTZ-JORGENSEN, 1990).

Para entender a patogenicidade e impacto clínico de *Candida*, é necessário analisar a interação fungo-hospedeiro. Essa interação inclui a expressão da patogenicidade determinante do fungo em oposição à resposta imune natural e adaptativa do hospedeiro (MARCILLA; VALENTIN; SENTANDREU, 1998; BURIK; MAGEE, 2001; BADAUY et al., 2005; FILLER, 2006).

Para alterar o comportamento de saprófita para patogênica, o fungo *C. albicans* precisa desenvolver características fenotípicas favoráveis a sua entrada no organismo hospedeiro (MARCILLA; VALENTIN; SENTANDREU, 1998). Alguns fatores ambientais, como o pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio, nitrogênio e disponibilidade de fonte de carbono, também afetam a distribuição das células entre as três principais formas fúngicas (UHL et al., 2003).

A maioria dos fatores sistêmicos e locais predisponentes à candidose bucal foram classificados por ODDS (1998) e os mais importantes são:

- Próteses

Próteses e aparelhos com higiene oral inadequada representam o principal irritante crônico local na cavidade bucal. É provável que a constante irritação da prótese possa causar violações locais microscópicas na mucosa bucal, permitindo o acesso do microrganismo. Além disso, contagem de leveduras na saliva é muito mais elevada em pacientes desdentados totais comparada aos dentados (BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAM, 1970a; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; VARDAKAS et al. 2009). Além disso, o uso de próteses produz um microambiente favorável ao crescimento de *Candida*, com baixo teor de oxigênio, baixo pH e um

ambiente anaeróbio, permitindo uma melhor aderência de *Candida* spp ao acrílico (AKPAN; MORGAN, 2002).

- Antibioticoterapia

Pacientes em terapia antimicrobiana de amplo espectro são predispostos a alterações na microbiota bucal. Corticosteróides tópicos, sistêmicos, e na forma de aerossóis, bem como o uso excessivo de bochechos com componentes antibacterianos também podem predispor à infecção de leveduras por via oral (BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAM, 1970b).

A antibioticoterapia causa diminuição do fluxo salivar e consequente ausência de constituintes antifúngicos salivares como lactoferrina, lisozima e histatinas, o que pode explicar o aumento do transporte e infecção por leveduras em pacientes xerostômicos. Mudanças no pH, teor de glicose, e níveis de IgA secretória também apresentam um importante papel em pacientes predispostos à infecção (SAMARANAYAKE; MACFARLANE, 1990, AKPAN; MORGAN, 2002).

- Quimioterapia e Radioterapia

Os mecanismos de defesa são afetados em pacientes com doença maligna, como um resultado da quimioterapia e radioterapia terapêuticas envolvidos no seu tratamento. Isto pode levar a transtornos de número e de função dos polimorfonucleares e fagócitos mononucleares resultando em candidose bucal. Estima-se que 50% e 70% dos pacientes submetidos à radioterapia e à quimioterapia, respectivamente para leucemia e tumores sólidos, sofrem de candidose bucal (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; VARDAKAS et al., 2009).

- Dieta

Uma variedade de fatores nutricionais, incluindo deficiências de ferro, ácido fólico, vitaminas e dietas ricas em carboidratos, tem sido relacionada à patogênese da infecção oral por *Candida* (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; SITHEEQUE; SAMARANAYAKE, 2003).

- Desordens Endócrinas

Espécies de *Candida* são mais prevalentes na cavidade bucal de pacientes diabéticos do que em pacientes saudáveis (RADFORD; CHALLACOMBE; WALTER, 1999; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000).

As mais frequentes manifestações associadas a desordens endócrinas incluem o hiperparatireoidismo idiopático e hipoadrenocorticism, mas a candidose se manifesta apenas quando há um defeito imunológico (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; SITHEEQUE; SAMARANAYAKE, 2003).

- Desordens Imunológicas

A candidose é uma manifestação comum em uma variedade de imunodeficiências. A Síndrome da Imunodeficiência Combinada Grave (SCID) caracteriza-se por defeitos nas funções da imunidade mediada por células. Como resultado da depressão dessa imunidade e da imunidade fagocítica, a candidose pode disseminar para outros tecidos, essa é uma característica em muitos pacientes com SCID (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; LILLY et al., 2006). Em pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), a candidose se desenvolve mais frequentemente quando as células T CD4+ estão reduzidas abaixo de 200 células/ μ l (LILLY et al., 2006).

Deficiência de Mieloperoxidase Hereditária é uma doença comum vista em 1 a cada 4000 indivíduos, e consiste na ausência de mieloperoxidase (MPO) nos grânulos de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos, o que resulta na dificuldade de eliminação de *C. albicans* pelo organismo (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000).

- Alergias

A reação alérgica ao acrílico da prótese tem sido reconhecida em muitos trabalhos como um dos mecanismos envolvidos na patogênese da estomatite por dentadura, em especial a hiperplasia papilar; entretanto ainda existem dúvidas sobre a associação desses mecanismos com a presença de *Candida albicans* (DANILEWICZ-STYSIAK, 1971; DEVLIN; WATTS, 1984; TSUCHIYA et al. 1994).

1.3 INVASÃO DE CANDIDA ALBICANS NAS CÉLULAS EPITELIAIS

Achados histopatológicos indicam a presença de células fúngicas de *Candida albicans* tanto dentro das células epiteliais quanto entre elas (NAGAI; TAKESHITA; SAKU, 1992; FILLER; SHEPPARD, 2006). Postula-se que a localização intracelular dos microrganismos protege-os da resposta imune do hospedeiro (FILLER; SHEPPARD, 2006). Dois diferentes mecanismos de invasão das células epiteliais são descritos. O primeiro mecanismo é a produção de enzimas líticas, como a Aspartil Proteinase (SAP), secretada por *Candida*. Tem sido proposto que estas enzimas digerem a superfície das células epiteliais e, assim, proporcionam a entrada nas células. A SAP pode ser especialmente importante para a invasão dos queratinócitos. Outro mecanismo é a indução da endocitose nas células epiteliais. Tem sido observado que *C. albicans* induz as células epiteliais a produzirem pseudópodos, os quais circundam e internalizam o microrganismo. A formação destes pseudópodos se dá pelo acúmulo dos microfilamentos das células epiteliais em torno do fungo (FILLER; SHEPPARD, 2006). Além disso, estudos comprovam que *C. albicans* também utiliza a força mecânica para penetrar nos tecidos (JAYATILAKE; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2005; KUMAMOTO; VINCES, 2005).

Adesão de *Candida* na parede das células epiteliais, considerada um passo importante para o início da infecção, é promovida por certos componentes da parede celular fúngica, como manose, receptores C3d, manana e sacarina (AKPAN; MORGAN, 2002; JÄRVENSIVU et al., 2006). O grau de hidrofobicidade e a capacidade de ligação à fibronectina do hospedeiro também têm sido relatados como sendo importantes nas fases iniciais da infecção. Outros fatores envolvidos são a formação do tubo germinativo, a presença de micélios, persistência dentro das células epiteliais, endotoxinas, indução do fator de necrose tumoral e proteinases (AKPAN; MORGAN, 2002).

1.4 MECANISMOS IMUNES EM RESPOSTA A CANDIDA ALBICANS

A ativação do sistema imune mediada por células T e macrófagos é considerada crítica no mecanismo de defesa do hospedeiro contra *Candida albicans*. O consequente afluxo de neutrófilos polimorfonucleares é o principal fator de limitação da propagação da infecção. Assim, defeitos no sistema imune predispoem infecções por *Candida* (JOHANNESSEN et al., 1986; WEBB et al., 1998).

Monócitos e macrófagos eliminam microrganismos ingeridos por uma variedade de mecanismos inflamatórios, mas essa capacidade microbicida é relativamente limitada quando comparada aos neutrófilos. Monócitos do sangue periférico humano liberam uma molécula inflamatória potente, o fator de necrose tumoral (TNF), em uma resposta dose-dependente, quando expostos a *C. albicans* e outras espécies de *Candida* (AYBAY; IMIR, 1996). Interferon gama (IFN γ) aumenta a capacidade dos macrófagos teciduais para eliminar fungos (BURIK; MAGEE, 2001).

1.5 IDENTIFICAÇÃO DE CANDIDA ALBICANS

A presença do fungo, nas lesões de candidose bucal bem como nas superfícies das próteses totais superiores, tem sido bem estabelecida através de exames utilizando swab e cultivo do fungo (KAPLAN et al., 1998; BARBEAU et al., 2003; POULOPOULOS et al., 2007). Do ponto de vista microscópico, alguns trabalhos demonstraram leveduras de fungos pelo método de coloração de PAS (Periodic Acid Schiffer) (WILLIAMS et al., 1998; ORÓS et al., 2004; BADAUY et al., 2005; POULOPOULOS et al., 2007). Entretanto, em um estudo feito por Kaplan et al. (1998), as análises microbiológicas nas amostras tanto de próteses quanto do palato dos pacientes, confirmaram a presença de *Candida*, e todos os cortes histológicos corados com Gram e PAS foram negativos para hifas de *Candida*, o que está de acordo com outros estudos (BUDTZ-JORGENSEN, 1970b; BERGENDAL; ISACSSON, 1983; WESCOTT; CORRELL, 1984). Portanto, em grande parte dos casos de candidose, incluindo Hiperplasia Papilar, esse método não tem se

mostrado eficiente, sendo necessários outros métodos de identificação (KAPLAN et al., 1998; MARCILLA; VALENTIN; SENTANDREU, 1998; MCCULLOUGH; CLEMONS; STEVENS, 1999; JÄRVENSIVU et al., 2006), como a Imunoistoquímica, a Imunofluorescência, CHROMagar *Candida*, padrão de assimilação de carboidrato, Hibridização *in situ*, PCR, dentre outros (MCCULLOUGH; CLEMONS; STEVENS, 1999; BARBEAU et al., 2003; ORÓS et al., 2004; CHAVASCO et al., 2006; JÄRVENSIVU et al., 2006; LILLY et al., 2006).

De qualquer modo, métodos diagnósticos para lesões provocadas por *Candida*, na superfície dos tecidos, são relativamente efetivos, mas nenhum método satisfatório tem sido disponível quando o fungo invade os tecidos humanos e sangue (MARCILLA; VALENTIN; SENTANDREU, 1998).

1.6 HIPERPLASIA PAPILAR

A hiperplasia papilar (HP) é considerada uma forma de candidose bucal, em especial uma forma de estomatite por dentadura, tipo III segundo a classificação de Newton (1962), a qual obedece critérios clínicos e microscópicos. A HP foi inicialmente descrita por Fisher e Rashid (1952) e caracteriza-se por numerosas papilas hiperplasiadas e eritematosas, resultantes de proliferação epitelial, localizadas comumente na mucosa do palato em contato com a superfície acrílica da prótese, sendo geralmente assintomática. Diversas são as denominações utilizadas para essa patologia como hiperplasia papilar do palato, papilomatose do palato, pseudopapilomatose, estomatite hipertrófica, granulação do palato e hiperplasia pseudoepiteliomatosa do palato (DIAS; RAMOS-E-SILVA, 1994, BARBEAU et al., 2003). Ainda não há na literatura trabalhos que identifiquem a presença e a localização exata do fungo *C. albicans* no revestimento epitelial das lesões de HP.

1.6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E FATORES PREDISPOONENTES

A HP consiste de hiperplasia nodular da mucosa do palato, geralmente com 10 a 15mm de largura, ao longo da linha mediana. Geralmente, os nódulos são vermelhos e tornam-se maiores por inflamação sob a prótese total (CAWSON; BINNIE; EVESON, 1997).

A maioria dos pacientes que apresentam essa afecção demonstra lesão papilar difusa sob a prótese total. A área de envolvimento tecidual corresponde a aproximadamente toda a superfície recoberta pela porção palatina da base da prótese. A mais constante manifestação clínica é a inflamação da região afetada (CATALAN; HERREVA; MARTINEZ, 1987).

Quando a mucosa palatina é lavada e seca, a natureza papilar dos tecidos anormais torna-se mais aparente. Um jato de ar direcionado perpendicularmente à superfície papilar causa a separação das papilas de maneira a lembrar “campos de trigo ao vento” (FISHER; RASHID, 1952).

A HP do palato não se resolve com a retirada da prótese total e, por vezes, é encontrada em pacientes que não a usam. A afecção é benigna e não se justifica a retirada do tecido da área (CAWSON; BINNIE; EVESON, 1997).

Embora a patogênese exata ainda seja incerta, uma combinação de trauma e infecção por *Candida* tem sido sugerida (BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAM, 1970a, BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAM, 1970b; ETTINGER, 1975; BERGENDAL; ISACSSON, 1983). A HP está relacionada a problemas de instalação das próteses, pobre higiene das próteses e uso das mesmas 24 horas por dia. Sua frequência em pacientes usuários de próteses que tenham idade avançada está entre 5 a 20% (BUDTZ-JORGENSEN; STENDERUP; GRABOWSKI, 1975; ETTINGER, 1975; KAPLAN; MOSKONA, 1990; MOSKONA; KAPLAN, 1992; NEVILLE et al., 1995). Próteses antigas estão associadas com mais frequência à HP (KAPLAN; MOSKONA, 1990; MOSKONA; KAPLAN, 1992), o que tem sido atribuído às alterações superficiais da base da prótese total, como o aumento da porosidade, que provavelmente ocorre com o decorrer do tempo, facilitando assim a aderência e colonização por *Candida* (CATALAN; HERREVA; MARTINEZ, 1987; SEGAL, LEHRMAN; DAYAN, 1988; SEGAL; KRAMER; DAYAN, 1992).

1.6.2 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS E DIAGNÓSTICO

Microscopicamente, as lesões de HP são representadas por hiperplasia do epitélio, com superfície papilar, hiperplasia pseudoepiteliomatosa, cristas epiteliais colunares e cristas bifidas. O tecido conjuntivo subjacente apresenta uma resposta inflamatória variável, muitas vezes invadindo o tecido epitelial, constituído principalmente por linfócitos e plasmócitos, e alguns polimorfonucleares também podem estar presentes (FISHER; RASHID, 1952; NAGAI; TAKESHITA; SAKU, 1992; KAPLAN et al., 1998).

A HP não apresenta displasia epitelial, assim como não existem relatos de transformação maligna. Contudo, não é raro que patologistas familiarizados com lesões orais confundam o diagnóstico de hiperplasia papilar com carcinoma espinocelular bem diferenciado (BHASKAR; BEASLEY; CUTRIGHT, 1970).

Não existem estudos definitivos em relação a HP que confirmem a presença de leveduras e/ou hifas de *C. albicans* na lesão. E ainda não se sabe se fatores como a presença de *Candida* tem uma correlação com características do epitélio, e com o tipo e a intensidade do infiltrado inflamatório subjacente.

Os mecanismos pelos quais *C. albicans* contribui para essa patologia ainda são desconhecidos, e preparações histológicas não mostram a penetração do fungo nos tecidos da mucosa bucal afetada, sendo necessário um teste mais sensível e específico para esta avaliação.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

A proposição do presente estudo foi avaliar a partir de biópsias de Hiperplasia Papilar em palato de pacientes usuários de prótese total superior:

- ❖ A presença de *Candida albicans* no revestimento epitelial e
- ❖ A correlação dos valores quantitativos obtidos com as características demográficas, do revestimento epitelial e do infiltrado inflamatório subepitelial.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

As amostras de Hiperplasia Papilar (27), localizadas em palato, relacionadas ao uso de prótese total superior, registradas no período de 2000 a 2007, foram selecionadas a partir dos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica, do Departamento de Estomatologia (Patologia), da Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo, FOB/USP. Como controle (grupo Controle), foram selecionadas áreas de mucosa com aspecto microscópico de normalidade, presentes em margens de cortes microscópicos de adenoma pleomórfico (cinco casos), carcinoma mucoepidermóide (um caso), lesão com suspeita clínica de trauma (um caso) e lesão cística recidivante (um caso), todas oriundas de palato. As amostras do grupo Controle eram de pacientes não usuários de prótese total superior e foram também selecionadas dos arquivos do mesmo Laboratório.

Foram registradas informações referentes aos pacientes, como gênero, idade e raça, assim como características clínicas das lesões, tempo de uso da prótese total superior e presença de câmara de sucção.

3.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DOS CORTES CORADOS EM HEMATOXILINA E EOSINA

Foram avaliados subjetivamente os cortes microscópicos, corados em Hematoxilina e Eosina (HE), referentes aos casos previamente selecionados.

As lâminas foram analisadas criteriosamente, por 2 examinadores, em dois períodos com intervalo de 3 meses, priorizando as características do revestimento epitelial, bem como o tipo e a intensidade do infiltrado inflamatório presente.

O revestimento epitelial foi avaliado considerando os seguintes aspectos:

- Espessura

O revestimento epitelial foi considerado hiperplásico (com mais de 10

camadas), atrófico (até 4 camadas) e normal (4 a 10 camadas).

- Queratinização

Foram avaliados o tipo de queratinização (orto ou paraqueratinizado), sua ausência e sua espessura (normal ou hiperqueratinizado). A presença de 5 camadas ou mais de queratina foi considerada como hiperqueratose.

- Cristas alongadas
- Hiperplasia pseudoepiteliomatosa
- Exocitose
- Microabscessos de Munro
- Pérolas córneas-like.

As presenças de cristas alongadas, hiperplasia pseudoepiteliomatosa e exocitose foram classificadas seguindo os escores (1) – comprometendo até um terço do revestimento epitelial, (2) – comprometendo até dois terços do revestimento epitelial, e, (3) – comprometendo a totalidade ou quase todo revestimento epitelial. Microabscessos de Munro e pérolas córneas-like foram categorizadas quanto à sua presença ou ausência.

O tecido conjuntivo subjacente foi classificado de acordo com:

- Tipo do infiltrado inflamatório predominante, se mono ou polimorfonuclear
- Intensidade do infiltrado inflamatório predominante, classificado em ausente (0), discreto (1), moderado (2) e intenso (3).

3.3 COLORAÇÕES ESPECIAIS PARA DETECÇÃO DE FUNGOS

Os blocos de parafina, referentes às amostras selecionadas, foram seccionados em micrótomo (Leica RM2165), para obtenção de cortes consecutivos de 4µm, os quais foram colocados sobre lâminas para microscopia e corados em *Periodic Acid Schiffer (PAS)* e Grocott de prata.

Para a realização da coloração por *PAS*, as lâminas foram submetidas às seguintes etapas:

- ✓ Desparafinização em 3 soluções de xilol,
- ✓ Hidratação em alcoóis absoluto, 95% e 70%,
- ✓ Lavagem em água corrente,
- ✓ Oxidação com ácido periódico 5%, por 15 minutos,
- ✓ Lavagem em água corrente, por 10 minutos,
- ✓ Lavagem em 2 banhos de água destilada,
- ✓ Aplicação do Reativo de Schiffer, por 15 minutos,
- ✓ Aplicação de água sulfurosa, por 2 minutos,
- ✓ Lavagem em água corrente, por 10 minutos,
- ✓ Coloração com Hematoxilina de Harris, por 40 segundos,
- ✓ Lavagem em água corrente, por 10 minutos,
- ✓ Desidratação em alcoóis 95% e absoluto e
- ✓ Montagem das lâminas.

Para a coloração por Grocott de prata, as lâminas foram submetidas às seguintes etapas:

- ✓ Desparafinização em 3 soluções de xilol,
- ✓ Hidratação em alcoóis absoluto, 95% e 70%,
- ✓ Lavagem em água corrente e um banho de água destilada,
- ✓ Oxidação em ácido crômico a 4%, por 1 hora,
- ✓ Lavagem em água corrente,
- ✓ Aplicação de bissulfito de sódio a 1%, durante 1 hora,
- ✓ Lavagem em água corrente por 10 minutos,
- ✓ Lavagem em água destilada, 3 vezes,
- ✓ Aplicação de solução de metanamina com nitrato, por 1 hora em estufa a 58°C,
- ✓ Lavagem em água destilada, 5 vezes,
- ✓ Aplicação de solução de cloreto de ouro a 1%, por 5 minutos,
- ✓ Lavagem em água destilada,
- ✓ Aplicação de hipossulfito de sódio a 5%, por 5 minutos,
- ✓ Lavagem em água corrente,
- ✓ Aplicação de corante verde luz, por 40 segundos,
- ✓ Desidratação em alcoóis 95% e absoluto, e

- ✓ Montagem das lâminas.

Quanto ao estudo microscópico das lâminas submetidas às colorações especiais, a proposta foi avaliar a localização e a distribuição de hifas e leveduras positivas pelo revestimento epitelial.

3.4 DETECÇÃO DA ESPÉCIE CANDIDA ALBICANS PELO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Para a técnica de imunofluorescência, foram obtidos cortes de 4µm de espessura, a partir do material selecionado, os quais foram acondicionados sobre lâminas silanizadas. Em seguida, estas foram colocadas em estufa a 37°C por 4 horas, desparafinizadas em 3 banhos sucessivos de xilol e hidratadas, sendo a última imersão em álcool 50%. Depois, as lâminas foram lavadas rapidamente em PBS (tampão salina fosfato 1M; pH 7,4) e incubadas, em panela a vapor, com tampão citrato (0,01M; pH 6,0) a 95°C por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram resfriadas, ainda dentro do tampão, a temperatura ambiente por 20 minutos, e lavadas em PBS por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com solução de soro normal de cabra a 10%, para bloquear reações protéicas inespecíficas, por 1 hora.

Em seguida, os tecidos foram incubados com anticorpo policlonal de coelho anti-*C. albicans* (B65411R, BioDesign International, Meridian Life Science Inc, USA) diluído em PBS (1:1200), em uma câmara úmida durante 18 horas a 4°C. Posteriormente, as lâminas foram incubadas, por 1 hora, com anticorpos anti-IgG de coelho, conjugados com o fluorocromo FITC (W99095F, BioDesign International, Meridian Life Science Inc, USA) diluídos em PBS (1:150). Depois, as lâminas foram montadas em meio de montagem apropriado, fabricado e gentilmente doado pelos técnicos do Hospital Lauro de Souza Lima.

Cortes de intestino grosso com infecção por *C. albicans* foram utilizados para controle positivo da reação. Para controle negativo, a incubação com o anticorpo primário foi substituída por PBS-BSA a 1%.

3.5 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO DE CANDIDA ALBICANS

As lâminas imunomarcadas foram imediatamente avaliadas por meio de um microscópico de fluorescência (AxioStar Plus, Zeiss). Para a posterior análise quantitativa dos resultados, foram capturados 10 campos microscópicos consecutivos do revestimento epitelial, com a objetiva de 40X, utilizando uma câmera digital de alta resolução (AxioCam, Zeiss) acoplada ao microscópio de fluorescência. A câmera estava conectada a um computador contendo um programa de aquisição e análise de imagens (AxioVision 4.5, Zeiss).

Cada campo microscópico capturado foi previamente padronizado de acordo com as especificações exigidas pelo programa de aquisição de imagens, para obter uma resolução adequada da imagem, e com o objetivo de visualizar em cada campo a imunomarcação.

A contagem de *C. albicans* foi realizada por 2 examinadores, sem o conhecimento prévio dos grupos aos quais pertenciam as amostras. O número de fungo fluorescente por milímetro quadrado, em cada amostra, foi calculado dividindo-se o número total de fungos pela área total de epitélio analisado. Para obtenção da área total em cada amostra, a área de um campo microscópico ($0,0939921 \text{ mm}^2$) foi multiplicada pelo número de campos percorridos na respectiva amostra. O número médio de fungos imunomarcados/ mm^2 , obtido nos dois grupos analisados, foi comparado estatisticamente.

A análise estatística comparativa múltipla entre o número médio de fungos nos diferentes grupos experimentais (Grupo HP e Grupo controle) foi obtida pelo teste de Mann Whitney.

3.6 CORRELAÇÃO DO NÚMERO MÉDIO DE CANDIDA ALBICANS COM AS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, DO REVESTIMENTO EPITELIAL E DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO SUBEPITELIAL

Foi correlacionado o número médio de *C. albicans* com as variáveis demográficas, do revestimento epitelial e do infiltrado inflamatório. Para a correlação

do número médio de *C. albicans* com a raça e o gênero dos pacientes, utilizou-se o teste *t* de student, e com a idade o teste de Pearson.

A correlação das variáveis, correspondentes ao epitélio e ao infiltrado inflamatório, com o número médio de *Candida albicans*, foi obtida por meio do teste de Spearman.

Para todas as correlações, adotou-se nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3.7 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

Este trabalho foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, em reunião realizada no dia 27 de agosto de 2008, sob o número 060/2008 (Anexo).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS**4.1 CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E CLÍNICA DA AMOSTRAGEM****4.1.1 MUCOSA NORMAL DE PALATO (GRUPO CONTROLE)**

No grupo Controle, observou-se predominância do gênero feminino (5 em 8), considerando que duas amostras (números 4 e 5) foram obtidas da mesma paciente; duas amostras foram obtidas de pacientes negros, duas de pacientes de raça parda e duas de brancos, sendo que em um a raça não foi informada. A idade variou entre 33 a 62 anos, com idade média aproximada de 45 anos (Quadro 1).

Quadro 1 - Caracterização demográfica dos indivíduos submetidos a biópsias de lesões em palato que apresentaram mucosa normal em suas margens, cujas respectivas lâminas correspondem ao grupo Controle. As lâminas foram obtidas dos arquivos do Departamento de Estomatologia (Patologia) da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

	Amostra	Idade do paciente (anos)	Gênero/Cor do paciente
MUCOSA NORMAL DE PALATO (N=8)	1	56	M/-
	2	-	F/Branca
	3	51	M/Negra
	4	58	F/Negra
	5	58	F/Negra
	6	33	F/Branca
	7	44	F/Parda
	8	62	F/Parda

(-) não relatado; M - Masculino; F - Feminino

4.1.2 HIPERPLASIA PAPILAR (GRUPO HP)

Assim como no grupo Controle, houve predominância do gênero feminino nos casos referentes ao grupo Hiperplasia Papilar (20 em 27), e 6 casos eram do gênero masculino, já que as amostras 18 e 19 pertenciam ao mesmo paciente. A idade variou entre 32 e 83 anos, com idade média aproximada de 59 anos, sendo que em

8 casos a idade não foi informada. De um total de 27 casos, 18 eram da raça branca, 4 da raça negra e, em 5 casos, não foi relatada essa informação (Quadro 2).

A maioria dos pacientes apresentou lesão única (19 em 27), e não havia relato de sintomatologia na maioria dos casos, sendo que somente um (1 em 27) relatou sintomatologia dolorosa. O tempo de uso da prótese total superior variou de 5 a 50 anos. A presença de câmara de sucção ocorreu em 7 pacientes, sendo que 1 prótese estava reembasada (Quadro 3).

A análise comparativa entre os aspectos demográficos dos dois grupos está detalhada no Quadro 4.

Quadro 2 - Caracterização demográfica dos indivíduos submetidos a biópsias de Hiperplasia Papilar em palato, cujas lâminas correspondem ao grupo HP e foram obtidas dos arquivos do Departamento de Estomatologia (Patologia) da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

HIPERPLASIA PAPILAR (N=27)	Amostra	Idade do paciente (anos)	Gênero/Raça do paciente
	1	44	F/Branca
	2	49	F/Branca
	3	39	F/Branca
	4	73	F/Branca
	5	-	M/Branca
	6	-	F/Branca
	7	43	F/Negra
	8	-	F/-
	9	75	F/Branca
	10	51	F/-
	11	-	F/-
	12	-	F/Negra
	13	83	M/Negra
	14	-	F/Branca
	15	-	F/-
	16	45	F/Branca
	17	70	F/Branca
	18	32	M/Branca
	19	32	M/Branca
	20	65	F/Branca
	21	79	F/Branca
	22	72	M/Branca
	23	64	F/-
	24	68	F/Branca
	25	80	F/Negra
	26	55	M/Branca
	27	-	M/Branca

(-) não relatado; M - Masculino; F - Feminino

Quadro 3 - Caracterização clínica das amostras de Hiperplasia Papilar, obtidas dos arquivos do Departamento de Estomatologia (Patologia) da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

	Amostra	Tempo de uso (anos)	Câmara de sucção	Nº de lesões		Sintomatologia
				única	múltiplas	
HIPERPLASIA PAPILAR (N=27)	1	-	-	x		Assintomático
	2	-	Sim	x		Assintomático
	3	-	Sim	x		Assintomático
	4	-	-	x		Assintomático
	5	-	-	x		-
	6	-	-		x	Indolor
	7	-	-	x		-
	8	-	Sim	x		-
	9	20	-		x	Dolorosa
	10	15	Sim	x		Assintomático
	11	-	Sim	x		Indolor
	12	50	-	x		-
	13	-	-	x		-
	14	-	-	x		Indolor
	15	5	-		x	Indolor
	16	Vários	-		x	-
	17	-	-	x		-
	18	Mais de 10	-		x	-
	19	Mais de 10	-		x	-
	20	-	Sim	x		-
	21	Mais de 5	Reembasada	x		-
	22	-	Sim	x		Indolor
	23	-	-	x		Indolor
	24	27	-	x		-
	25	Há muitos	-		x	-
	26	-	-	x		-
	27	30	-		x	-

(-) não relatado; N° - Número

Quadro 4 - Caracterização comparativa dos aspectos demográficos dos indivíduos dos grupos Hiperplasia Papilar e Controle

Característica demográfica	Hiperplasia Papilar		Controle	
	N	%	N	%
Gênero				
Masculino	7	25	2	25
Feminino	20	75	6	75
Idade				
32-49	7	25	2	25
50-66	4	15	5	62,5
67-83	8	30	0	0
não informado	8	30	1	12,5
Raça				
Branca	18	67	2	25
Negra	4	15	3	37,5
Parda	0	0	2	25
não informado	5	18	1	12,5
Total	27	100	8	100

N - Número; % - porcentagem

Considerando o gênero dos pacientes, tanto as amostras do grupo HP quanto do grupo Controle, eram predominantemente do gênero feminino. A frequência predominante da idade dos pacientes foi diferente entre os grupos: 67 a 83 anos no grupo HP e 50 a 66 anos no grupo Controle. A raça prevalente no grupo HP foi a branca e, no grupo Controle, a raça negra.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DA AMOSTRAGEM (HE)

4.2.1 MUCOSA NORMAL DE PALATO (GRUPO CONTROLE)

As amostras de mucosa normal de palato, em sua maioria, apresentaram epitélio estratificado pavimentoso com espessura normal (7 em 8). A superfície evidenciou ortoqueratinização (3 em 8), paraqueratinização (3 em 8), hiperortoqueratinização (1 em 8) e hiperparaqueratinização (1 em 8). Áreas de ausência de queratina foram notadas em associação com áreas de paraqueratinização (2 em 8) ou de hiperortoqueratinização (1 em 8). Porém,

ausência total de queratina, pérolas córneas-*like*, cristas epiteliais alongadas ou em forma de tubo de ensaio e cristas bífidas não foram observadas.

Em uma das amostras, o revestimento epitelial demonstrou exocitose em pequenos focos, e tratava-se de indivíduo fumante. A presença de microabscessos e hiperplasia pseudoepiteliomatosa não ocorreu nestas amostras.

Na mucosa normal de palato, notou-se discreto infiltrado inflamatório mononuclear, em 4 amostras. Somente em uma amostra, observou-se moderado infiltrado inflamatório mononuclear.

Todos os dados descritos estão detalhados nos Quadros 5 e 6.

Quadro 5 - Caracterização microscópica do revestimento epitelial das amostras de mucosa normal de palato, obtidas dos arquivos do Departamento de Estomatologia (Patologia) da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

MUCOSA NORMAL DE PALATO (N=8)	Amostra	Espessura			Cristas alongadas			Queratinização				Hiperplasia pseudoepiteliomatosa			Exocitose			Microabscessos	Pérolas córneas- like
		Hiper	Normal	Atrófico	1	2	3	PN	PH	ON	OH	1	2	3	1	2	3		
	1		x					x							x				
	2		x							x									
	3		x							x									
	4		x								x								
	5		x							x									
	6		x					x											
	7	x							x										
	8		x					x											

Hiper - Hiperplásico; PN - Paraqueratinizado normal; PH - Paraqueratinizado hiperplásico; ON - Ortoqueratinizado normal; OH - Ortoqueratinizado hiperplásico

Quadro 6 - Caracterização microscópica do infiltrado inflamatório das amostras de mucosa normal de palato, obtidas dos arquivos do Departamento de Estomatologia (Patologia) da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

MUCOSA NORMAL DE PALATO (N=8)	Amostra	PMN			MN		
		1	2	3	1	2	3
	1				x		
	2						
	3				x		
	4						
	5						
	6				x		
	7				x		
	8					x	

PMN - Polimorfonuclear; MN - Mononuclear

4.2.2 HIPERPLASIA PAPILAR (GRUPO HP)

O revestimento epitelial do tipo pavimentoso estratificado apresentou-se hiperplásico (22 em 27) ou normal (6 em 27) na hiperplasia papilar; uma amostra revelou tanto áreas hiperplásicas quanto áreas de espessura normal. Áreas de atrofia epitelial foram também observadas em duas amostras (2 em 27). A maior parte das amostras (22 em 27) apresentava revestimento epitelial paraqueratinizado; em duas delas (2 em 17) havia também áreas de hiperparaqueratinização. Na maior parte das amostras, áreas ausentes de queratina foram evidenciadas (16 em 27), sendo que, em doze delas, tais áreas apresentaram-se associadas com áreas de revestimento epitelial paraqueratinizado (12 em 16). Todas as amostras apresentaram superfície papilar (Figura 1). Em poucas amostras, observou-se ortoqueratinização (2 em 27) ou hiperortoqueratinização (1 em 27). Todas as amostras revelaram cristas epiteliais alongadas, na maioria acometendo quase a totalidade do revestimento epitelial (14 em 27). A maioria das amostras avaliadas revelou a presença de pérolas córneas-*like* (15 em 27) (Figura 2) e, em dezoito amostras, as cristas epiteliais demonstraram aspecto de cristas bífidas (Figura 3) (18 em 28).

Figura 1 - Hiperplasia papilar: Nota-se revestimento epitelial hiperplásico, superfície de aspecto papilar e infiltrado inflamatório mononuclear subjacente. Aumento de 4X.

Figura 2 - Hiperplasia papilar: Nota-se a presença de pérola córnea-like. Aumento de 40X.

Figura 3 - Hiperplasia papilar: Nota-se revestimento epitelial com áreas de hiperplasia, hiperplasia pseudoepiteliomatosa e crista epitelial de aspecto bífido (círculo). Aumento de 10X.

A presença de microabscessos de Munro foi uma característica marcante (Figura 4) ocorrendo na maioria dos casos (19 em 27), principalmente no primeiro terço do revestimento epitelial (16 em 27). A maioria das amostras apresentou hiperplasia pseudoepiteliomatosa (25 em 27), geralmente com importante comprometimento, considerando toda a extensão do revestimento epitelial.

Figura 4 - Hiperplasia papilar: Nota-se microabscesso de Munro (círculo). Aumento de 40X.

O processo inflamatório presente no tecido conjuntivo das amostras de Hiperplasia Papilar apresentou discretas células polimorfonucleares, na maior parte dos casos (22 em 27). Em quatro amostras, estas células eram mais numerosas, caracterizando uma infiltração moderada (4 em 27) e somente em uma amostra a infiltração foi considerada intensa (1 em 27). Como no grupo Controle, as células mononucleares foram mais frequentemente observadas, estando presentes de forma discreta (7 em 27), moderada (4 em 27) ou intensa (16 em 27) no tecido conjuntivo fibroso.

Os dados anteriormente descritos estão detalhados nos Quadros 7 e 8.

Quadro 7 - Caracterização microscópica do revestimento epitelial das amostras de Hiperplasia Papilar, obtidas dos arquivos do Departamento de Estomatologia (Patologia) da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

	Amostra	Espessura			Cristas alongadas			Queratinização				Hiperplasia pseudoepiteliomatosa			Exocitose			Microabscessos	Pérolas córneas-like
		Hiper	Normal	Atrófico	1	2	3	PN	PH	ON	OH	1	2	3	1	2	3		
HIPERPLASIA PAPILAR (N=27)	1	x					x	x					x			x		x	x
	2	x					x							x			x	x	x
	3	x					x							x			x	x	x
	4	x				x		x	x	x	x	x			x			x	x
	5	x				x								x	x			x	x
	6		x				x	x						x		x		x	x
	7		x				x	x		x		x			x				x
	8	x	x				x	x					x				x	x	x
	9	x					x	x					x			x		x	
	10		x			x		x						x	x				
	11	x					x	x						x	x			x	x
	12	x		x		x								x			x		
	13		x	x			x	x					x				x	x	x
	14		x			x		x				x			x			x	
	15	x				x		x						x	x				
	16	x				x			x			x				x			x
	17	x				x		x								x			
	18	x					x	x					x			x		x	
	19	x				x		x				x				x		x	
	20	x				x		x				x			x				
	21	x				x		x					x			x		x	x
	22	x					x	x					x				x	x	
	23	x					x	x					x			x			
	24	x					x	x					x				x	x	x
	25	x				x		x				x				x		x	x
	26	x				x		x				x					x	x	x
	27	x					x	x									x	x	

Hiper - Hiperplásico; PN - Paraqueratinizado normal; PH - Paraqueratinizado hiperplásico; ON - Ortoqueratinizado normal; OH - Ortoqueratinizado hiperplásico

Quadro 8 - Caracterização microscópica do infiltrado inflamatório das amostras de Hiperplasia Papilar, obtidas dos arquivos do Departamento de Estomatologia (Patologia) Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

	Amostra	PMN			MN		
		1	2	3	1	2	3
HIPERPLASIA PAPILAR (N=27)	1	x				x	
	2	x					x
	3		x				x
	4	x			x		
	5	x				x	
	6	x					x
	7	x			x		
	8	x				x	
	9	x				x	
	10	x					x
	11	x			x		
	12		x				x
	13	x					x
	14	x					x
	15	x					x
	16	x					x
	17	x			x		
	18	x			x		
	19	x			x		
	20	x			x		
	21	x					x
	22		x				x
	23	x					x
	24			x			x
	25	x					x
	26	x					x
	27		x				x

PMN - Polimorfonuclear; MN - Mononuclear

4.3 COLORAÇÕES ESPECIAIS

Por meio das colorações utilizando PAS e Grocott de prata, não se observou a marcação fúngica em nenhuma das amostras. Apenas houve marcação de células acinares das glândulas salivares e de grânulos queratohialinos.

4.4 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

O grupo Controle mostrou-se totalmente negativo para a imunomarcação pelo anticorpo anti-*Candida albicans* (Figura 5).

No grupo HP, o número médio de *Candida albicans*/mm² foi 14 (Figura 6) e observado predominantemente na superfície do revestimento epitelial. Os números médios de *Candida albicans*/mm² de toda a amostragem estão demonstrados na Figura 7.

Os controles positivos representados por cortes de intestino grosso foram corados por Grocott de prata e por PAS, assim como por imunofluorescência (Figura 8).

A análise estatística entre o número de *Candida* com as características demográficas, como gênero e raça foi feita através do teste *t* de student, e a correlação com a idade, através do teste de Pearson, como demonstrados nas Tabelas 1 e 2.

A comparação do número de células/mm² com as características epiteliais como espessura, cristas alongadas e o tipo de epitélio, se para ou ortoqueratinizado e ainda com a intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear mostrou não haver diferenças estatisticamente significativas, como demonstrado na Tabela 3.

Figura 5 - Mucosa bucal normal: Nota-se a ausência de imunomarcção para *Candida albicans* no revestimento epitelial.

Figura 6 - Hiperplasia papilar: Nota-se leveduras de *Candida albicans* superficialmente ao revestimento epitelial.

Figura 7 - Número médio de *Candida albicans* nas amostras do grupo HP.

Figura 8 - Controles positivos: PAS (A); Grocott de Prata (B); Imunofluorescência (C) em cortes de intestino grosso.

Tabela 1 - Análise estatística comparativa entre o número médio de *Candida albicans*, o gênero e a raça através do teste *t* de student.

Variáveis	Média	Desvio padrão	Probabilidade
Gênero			p= 0,6963
Feminino	13,50	10,78	
Masculino	15,37	10,54	
Raça			p= 0,6666
Branca	13,09	8,11	
Negra	11,20	5,54	

Tabela 2 - Análise estatística comparativa entre o número médio de *Candida albicans* e a idade através do teste de Pearson.

Variáveis	Correlação	Prob (bicaudal)	Intersecção	Coef. Ang.
<i>Candida</i> versus Idade	0,14	0,56	55,78	0,20

Tabela 3 - Análise estatística comparativa entre o número médio de *Candida albicans* e as variáveis do revestimento epitelial e do infiltrado inflamatório, através do teste de Spearman.

Variáveis	Correlação	Prob (bicaudal)
<i>Candida</i> versus Espessura	0,13	0,53
<i>Candida</i> versus Cristas alongadas	-0,15	0,48
<i>Candida</i> versus Epitélio Paraqueratinizado	0,25	0,22
<i>Candida</i> versus Epitélio Ortoqueratinizado	0,02	0,90
<i>Candida</i> versus Infiltrado Mononuclear	0,17	0,42
<i>Candida</i> versus Infiltrado Polimorfonuclear	0,04	0,86

Os resultados demonstraram haver diferença significativa apenas em relação ao número médio de *Candida albicans* imunomarcadas entre os grupos Controle e HP, através do teste estatístico de Mann Whitney com $p= 0,00004081$.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A Hiperplasia Papilar (HP) é uma proliferação epitelial benigna que se desenvolve em pacientes, geralmente idosos, que fazem uso de prótese total de superfície acrílica. Estas próteses são muitas vezes antigas, mal higienizadas e geralmente usadas continuamente pelo indivíduo. A lesão pode ser múltipla e localizada no palato duro, geralmente associada à presença de microrganismos como *Candida* (BUDTZ-JORGENSEN et al., 1996; INFANTE-COSSIO et al., 2007).

Segundo a classificação utilizada por Newton (1962), a HP é considerada do tipo III da estomatite por dentadura, a qual se caracteriza por ser uma reação inflamatória dos tecidos bucais que estejam em contato com as próteses totais, sendo bastante comum em idosos. A HP, muitas vezes, está associada à presença de câmara de sucção.

Os nossos resultados demonstraram que as amostras de HP foram prevalentes em indivíduos idosos, com média de 59 anos, do gênero feminino e raça branca. Estes dados corroboram estudos prévios (BUDTZ-JORGENSEN; STENDERUP; GRABOWSKI, 1975; ETTINGER, 1975; KAPLAN; MOSKONA, 1990; MOSKONA; KAPLAN, 1992; NEVILLE et al., 1995) que detectaram a maior prevalência da HP, em idosos. Ainda, dos 27 pacientes estudados, sete eram portadores de próteses com câmara de sucção. Verificou-se também a idade da prótese utilizada pelos pacientes, variando de 5 a 50 anos, o que foi abordado também previamente (BUDTZ-JORGENSEN; STENDERUP; GRABOWSKI, 1975; BUDTZ-JORGENSEN et al., 1996; DAMM; FANTASIA, 2002; INFANTE-COSSIO et al., 2007).

Microscopicamente, as lesões de HP são representadas por hiperplasia do epitélio, com superfície papilar, hiperplasia pseudoepiteliomatosa, cristas epiteliais e cristas epiteliais alongadas. O tecido conjuntivo subjacente apresenta uma resposta inflamatória variável, muitas vezes invadindo o tecido epitelial, constituído principalmente por linfócitos e plasmócitos, e alguns polimorfonucleares também podem estar presentes (FISHER; RASHID, 1952; NAGAI; TAKESHITA; SAKU, 1992; KAPLAN et al., 1998).

Embora alguns autores acreditem que os nódulos sejam provocados pela prótese total, esta, de fato, não faz mais que agravar o problema (CAWSON; BINNIE; EVESON, 1997). A HP, por apresentar revestimento epitelial com superfície de

aspecto papilar, ou seja, projeções epiteliais nodulares múltiplas exofíticas, tais projeções podem sugerir alterações semelhantes àsquelas observadas nos epitélios de lesões infecciosas como o papiloma e a verruga vulgar, que apresentam projeções papilíferas exofíticas. Talvez, o comportamento das células epiteliais frente ao fungo e seus componentes, seja semelhante àquele frente a alguns tipos de vírus, em que as alfa- e beta-defensinas inibem os estágios iniciais de replicação viral, facilitando a resposta epitelial contra os microrganismos (CHONG et al., 2006).

Achados histopatológicos indicam a presença de células fúngicas tanto dentro das células epiteliais quanto entre elas (NAGAI; TAKESHITA; SAKU, 1992; FILLER; SHEPPARD, 2006). Postula-se que a localização intracelular dos microrganismos protege-os da resposta imune do hospedeiro (FILLER; SHEPPARD, 2006), mas possivelmente a permanência do fungo juntamente com a produção de proteínas fúngicas possam exacerbar a resposta proliferativa do epitélio.

De fato, o fungo *Candida* tem sido muito encontrado em lesões de estomatite por dentadura, sendo que o uso das próteses é relatado como um fator favorecedor da presença e crescimento deste fungo (ARENDORF; WALKER, 1979; KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLU, 1997). A espécie fúngica mais frequentemente envolvida nas doenças micóticas bucais é *Candida albicans* (CATEAU et al., 2008), um dos motivos pelo qual decidimos analisar a sua presença no epitélio de amostras de HP.

C. albicans é um fungo dimórfico, que pode existir tanto em forma de levedura quanto em forma de hifas. O fungo, na forma de hifa, pode invadir o epitélio e, na maioria dos casos, induz uma resposta proliferativa epitelial (CAWSON; BINNIE; EVERSON, 1997). A presença do fungo no epitélio causa a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células epiteliais (DONGARI-BAGTZOGLU; FIDEL JR, 2005). Acreditamos que o fungo ative outras vias intracelulares nas células epiteliais ou mesenquimais, resultando na produção de fatores de crescimento envolvidos com a proliferação e hiperplasia epiteliais. Entretanto, não existem trabalhos na literatura confirmando esta suposição, havendo a necessidade de estudos mais específicos. Devemos considerar ainda a presença do trauma da prótese sobre a mucosa que a suporta, levando às alterações epiteliais que podem refletir um processo de adaptação.

Dois diferentes mecanismos de invasão das células epiteliais são descritos. O primeiro mecanismo é a produção de enzimas líticas, como a aspartil proteinase (SAP), secretada pela *Candida*. Tem sido proposto que estas enzimas digerem a

superfície das células epiteliais e, assim, proporcionam a entrada nas células. SAP pode ser especialmente importante para a invasão dos queratinócitos. Outro mecanismo é a indução da endocitose nas células epiteliais. Tem sido observado que *C. albicans* induz as células epiteliais a produzirem pseudópodos, os quais circundam e internalizam o microrganismo. A formação destes pseudópodos se dá pelo acúmulo dos microfilamentos das células epiteliais em torno do fungo (FILLER; SHEPPARD, 2006). Além disso, estudos comprovam que *C. albicans* também utiliza a força mecânica para penetrar nos tecidos (JAYATILAKE; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2005; KUMAMOTO; VINCES, 2005).

Segundo Uhl et al. (2006), em um estudo feito *in vitro*, *Candida albicans* coloniza o ambiente primeiramente na forma de blastóporo (levedura) e sua aproximação das células induz rapidamente a formação de hifas e essa forma é responsável pela invasão do epitélio. Observamos *Candida albicans* principalmente na superfície, das amostras de HP, em sua maioria na forma de levedura e, em alguns casos, notamos a presença de poucas pseudohifas no interior do epitélio. No grupo Controle não detectamos a presença do fungo *C. albicans*.

Padilha e Souza (1998) acreditam que este tipo de hiperplasia, presente principalmente no palato de idosos portadores de próteses totais, justifica-se pela diminuição da camada de queratina apresentada pelo epitélio palatino. Nas amostras de HP analisadas em nosso estudo, geralmente o epitélio apresenta-se paraqueratinizado e com áreas de ausência de queratina, corroborando Padilha e Souza (1998). Acreditamos que a ausência de queratina observada comumente em lesões de HP seja favorecedora para a entrada do fungo no revestimento epitelial, contribuindo também para as alterações morfológicas.

Ainda, a morfologia papilar do revestimento epitelial pode facilitar a colonização por *Candida*. Estudos feitos em Carcinoma Verrucoso e em lesões leucoplásicas verrucosas, lesões comparadas a HP pela sua intensa superfície papiloforme, mostraram que a maioria das amostras apresentou o fungo *Candida* (SCIUBBA, 1995; EL-BARRAWY et al., 1996; ODELL; MORGAN, 1998; SITHEEQUE; SAMARANAYAKE, 2003) como encontrado neste estudo.

Embora tenha sido observada maior quantidade de *Candida albicans* nas lesões do grupo HP que no grupo Controle, não obtivemos relação entre esta e os diferentes aspectos do revestimento epitelial e do infiltrado inflamatório subjacente, ou as características demográficas.

Portanto, a detecção de *Candida albicans* na quase totalidade das amostras de HP permite-nos sugerir a etiologia microbiana da afecção, já que o uso de próteses é relatado como um fator favorecedor da presença e crescimento de várias espécies de *Candida*, cujas colônias se mostram mais intensas nos indivíduos usuários de próteses por um longo período (ARENDORF; WALKER, 1979; KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLU, 1997; DAMM; FANTASIA, 2002; INFANTE-COSSIO et al., 2007).

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos e com os resultados obtidos, pudemos verificar:

- ❖ A presença de *Candida albicans* no revestimento epitelial de todas as biópsias de Hiperplasia Papilar, perfazendo um número médio de 14 C. albicans/mm².
- ❖ O número médio de *Candida albicans* no epitélio do grupo HP não apresentou correlação estatisticamente significativa com as diferentes variáveis do epitélio e do infiltrado inflamatório, bem como demográficas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AKPAN A, MORGAN R. Oral candidiasis. *Prostgrad Med J*. 2002;78:455-459.
- ARENDORF TM, WALKER DM. Oral candidal populations in health and disease. *Brit Dent J*. 1979;147(4):267-271.
- AYBAY C, IMIR T. Tumor necrosis factor (TNF) induction from monocyte/macrophages by *Candida* species. *Immunobiology*. 1996;196(4):363-74.
- BADAUY CM, BARBACHAN JJD, RADOS PV, SANT'ANA FILHO M, CHIES JAB. Relationship between *Candida* infection and immune cellular response in inflammatory hyperplasia. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20:89-92.
- BARBEAU J, SÉGUIN J, GOULET JP, KONINCK L, AVON SL, LALONDE B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95:51-9.
- BECK-SAQUÉ C, JARVIS WR. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis*. 1993;167(5):1247-51.
- BERGENDAL T, ISACSSON G. A combined clinical, mycological and histological study of denture stomatitis. *Acta Odontol Scand*. 1983;41(1):33-44.
- BHASKAR SN, BEASLEY JD, CUTRIGHT DE. Inflammatory papillary hyperplasia of the oral mucosa. Report of 341 cases. *JADA*. 1970; 81:949-952.
- BUDTZ-JORGENSEN E. *Candida*-associated denture stomatitis and angular cheilitis. In: Samaranayake LP, MacFarlane TW, editors, *Oral candidosis*. London: Wright; 1990.
- BUDTZ-JORGENSEN E, BERTRAM U. Denture stomatitis I: The etiology in relation to trauma and infection. *Acta Odont Scand*. 1970a;28:71-92.
- BUDTZ-JORGENSEN E, BERTRAM U. Denture stomatitis II: The effect of antifungal and prosthetic treatment. *Acta Odont Scand*. 1970b;28:283-304.
- BUDTZ-JORGENSEN E, STENDERUP A, GRABOWSKI M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. *Commu Dent Oral Epidem*. 1975;3(3):115-19.
- BUDTZ-JORGENSEN E, MOJON P, BANON-CLÉMENT JM, BAEHNI P. Oral candidosis in long-term hospital care: comparison of edentulous and dentate subjects. *Oral Diseases*. 1996;2:285-290.
- BUFFO J, HERMAN MA, SOLE DR. A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 1984;85:21-30.

BURIK JH, MAGEE PT. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:743-72.

CALDERONE RA, FONZI WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001;9(7):327-35.

CANNON RD, CHAFFIN WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Reviews Oral Biol Med.* 1999;10:359-83.

CATALAN A, HERREVA R, MARTINEZ A. Denture plaque and palatal mucosa in denture stomatitis: Scanning electron microscopic and microbiologic study. *J Prosthet Dent.* 1987;34:254-261.

CATEAU E, BERJEAUD JM, RODIER MH, IMBERT C. Fungal biofilm inhibition by a component naturally produced by *Candida albicans* yeast growing as a biofilm. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31:166-170.

CAWSON RA, BINNIE WH, EVESON JW. Estomatites. In: Cawson RA, Binnie WH, Eveson JW. *Atlas colorido de enfermidades da boca: correlações clínicas e patológicas.* 2ª ed. São Paulo: Artes médicas. 1997;11.2-11.33.

CAWSON RA, BINNIE WH, EVESON JW. Estomatites. In: Cawson RA, Binnie WH, Eveson JW. *Atlas colorido de enfermidades da boca: correlações clínicas e patológicas.* 2ª ed. São Paulo: Artes médicas. 1997;13.2-13.17.

CHANDLER FW, KAPLAN W, AJELLO L. Color atlas and text of the histopathology of mycotic disease. London: Wolfe Medical Publications LTDA. 1980; 42-46.

CHAVASCO JK, PAULA CR, HIRATA MH, ALEVA NA, MELO CE, GAMBALE W, et al. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med trop.* 2006;48(1):21-26.

CHONG K, XIANG L, WANG X, JUN EL, XI L, SCHWEINFURTH JM. High level expression of human epithelial β -defensins (hBD-1, 2 and 3) in papillomavirus induced lesions. *Virology.* 2006;8(3):75-83.

DAMM DD, FANTASIA JE. Red, bump palate, inflammatory papillary hyperplasia. *Gen Dent.* 2002; 50(4):378-80.

DANILEWICZ-STYSIAK Z. Allergy as a cause of denture sore mouth. *J Prost Dent.* 1971;25(1):16-18.

DEVLIN H, WATTS DC. Acrylic "Allergy"? *Br Dent J.* 1984;157(8):272-75.

DIAS MFG, RAMOS-E-SILVA M. Hiperplasia papilar do palato. *An Bras Dermatol.* 1994;69:28-31.

DONGARI-BAGTZOGLOU A, FIDEL JR PL. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. J Dent Res. 2005;84(11):966-77.

DUPONT B. Clinical manifestations and management of candidosis in the compromised patient. In: Warnock DW, Richardson MD editors. Fungal infection in the compromised patient, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons. 1991; 55-83.

EL-BARRAWY MA, ISMAIL KA, EL-BARRAWI SA, SULTAN AA. Detection of Herpes Simplex Virus and *candida* infection with special emphasis on their possible role in human Squamous Cell Carcinoma and its variants. J Egypt Public Health Assoc. 1996;71(3-4):285-307

ETTINGER RL. Dental care of the elderly. Nurs Times. 1975;71(26):1003-6.

FARAH CS, ASHMAN RB, CHALLACAMBE SJ. Oral candidosis. Clin Dermatol. 2000;18:553-62.

FILLER SG. Candida-host cell receptor-ligand interactions. Curr Opin Microbiol. 2006;9:333-339.

FILLER SG, SHEPPARD DC. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. PLoS. Pathogens. 2006;2:1099-1105.

FISHER AK, RASHID PJ. Inflammatory papillary hyperplasia of the palatal mucosa. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1952;5:191-98.

FOX JL. Fungal infection rates are increasing. ASM News. 1993;10:515-518.

FREITAS JB, GOMEZ RS, ABREU MHNG, FERREIRA E FERREIRA E. Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. J Oral Rehab. 2008;35:370-74.

GOLECKA M, OLDAKOWSKA-JEDYNAK U, MIERZWINSKA-NASTALSKA E, ADAMCZYK-SOSINKA E. Candida-associated denture stomatitis in patients after immunosuppression therapy. Trans Proceed. 2006;38:155-56.

INFANTE-COSSIO P, MARTINEZ-DE-FUENTES R, TORRES-CARRANZA E, GUTIERREZ-PEREZ JL. Inflammatory papillary hyperplasia of the palate: Treatment with carbon dioxide laser, followed by restoration with an implant-supported prosthesis. Brit J Oral Maxillofacial Surg. 2007;45:658-660.

JÄRVENSIVU A, RAUTEMAA R, SORSA T, RICHARDSON M. Specificity of the monoclonal antibody 3H8 in the immunohistochemical identification of *Candida* species. Oral Disease 2006;12:428-33.

JAYATILAKE JAMS, SAMARANAYAKE YH, SAMARANAYAKE LP. An ultrastructural and a cytochemical study of candidal invasion of reconstituted human oral epithelium. J Oral Pathol Med. 2005;34:240-6.

JOHANNESSEN AC, ISACSSON G, NILSEN R, BERGENDAL T. In situ characterization of the inflammatory cell infiltrates of hyperplastic denture stomatitis. *Acta Odont Scand*. 1986;44(3):185-92.

KAPLAN I, MOSKONA D. A clinical survey of oral soft tissue lesions in institutionalized geriatric patients in Israel. *Gerodontology*. 1990;9:59-62.

KAPLAN I, VERED M, MOSKOVA D, BUCHNER A, DAYAN D. An immunohistochemical study of p53 and PCNA in inflammatory papillary hyperplasia of the palate: a dilemma of interpretation. *Oral Dis*. 1998;4:194-9.

KING RD, LEE JC, MORRIS AL. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infect Immun*. 1980;27:667-674.

KNAK G, LANGE KP, SEYFARTH M, STRUPP K. Immunological studies on patients with denture stomatitis. *Stomatol DDR*. 1983;33:401-07.

KULAK Y, ARIKAN A, KAZAZOGLU E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in dentare stomatitis patients. *J Oral Rehabil*. 1997;10(24):788-790.

KUMAMOTO CA, VINCES MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: Growth on surfaces. *Ann Rev Microbiol*. 2005;59:113-33.

KUSCH H, ENGELMANN S, BODE R, ALBRECHT D, MORSCHHÄUSER J, HECKER M. A proteomic view of *Candida albicans* yeast cell metabolism in exponential and stationary growth phases. *Int J Med Microbiol*. 2008;298:291-318.

LILLY EA, LEIGH JE, JOSEPH SH, FIDEL JR PL. *Candida*-induced oral epithelial cell responses. *Mycopathologia*. 2006;162:25-32.

MANDELL GL, BENNETT JE, DOLIN R. Principles and practice of infectious diseases. 6th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005.

MARCILLA A, VALENTÍN E, SENTANDREU R. The cell wall structure: developments in diagnosis and treatment of candidiasis. *Int Microbiol*. 1998;1(2):107-16.

MCCULLOUGH MJ, CLEMONS KV, STEVENS DA. Molecular and Phenotypic Characterization of Genotypic *Candida albicans* Subgroups and Comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J Clin Microbiol*. 1999;37:417-21.

MOSKONA D, KAPLAN I. Oral lesions in elderly denture wearers. *Clin Prev Dent*. 1992;14:11-14.

NAGAI Y, TAKESHITA N, SAKU T. Histopathologic and ultrastructural studies of oral mucosa with *Candida* infection. *J Oral Pathol Med*. 1992;21:171-5.

NEWTON AV. Denture sore mouth. *Brit Dent J*. 1962;1(112):357-60.

NEVILLE BW, DAMM DD, ALLEN CM, BOUQUOT JE. Oral and maxillofacial pathology. WB Saunders Co. Philadelphia. 1995;367-368.

ODDS FC. Candida and candidosis. London: Balliere Tindall; 1988.

ODELL EW, MORGAN PR. Non-dysplastic and white lesions of the oral mucosa. In: Biopsy pathology of the oral tissues. 1a ed. London: Chapman & Hall Medical, 1998;151-181.

OLSEN I. Denture stomatitis: Occurrence and distribution of fungi. Acta Odont Scand. 1974;32:329-33.

ORÓS J, ARENCIBIA A, FERNÁNDEZ L, JENSEN HE. Intestinal candidiasis in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*): an immunohistochemical study. Vet J. 2004;167:202-7.

PADILHA DMP, SOUZA MAL. Estado dentário e edentulismo observado em dois grupos de idosos do Brasil e da Inglaterra. Rev Odonto Ciência. 1998;25:175-202.

POULOPOULOS A, BELAZI M, EPIVATIANOS A, VELEGRAKI A, ANTONIADES D. The role of *candida* in inflammatory papillary hyperplasia of the palate. J Oral Rehabil. 2007;34:685-92.

RADFORD DR, CHALLACOMBE SJ, WALTER JD. Denture plaque and adherence of candida albicans to denture-base materials in vivo and in vitro. Crit Rev Oral Biol Med. 1999;10(1):99-116.

SAMARANAYAKE LP, MACFARLANE TW. Oral Candidosis. London: Butterworth. 1990.

SCIUBBA JJ. Oral leukoplakia. Crit Rev Oral Biol Med. 1995;6(2):147-160.

SEGAL E, LEHRMAN O, DAYAN D. Adherence in vitro of various Candida SP to acryls. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1988;66:670-673.

SEGAL E, KRAMER I, DAYAN D. Inhibition of adherence of Candida albicans to acrylic by a chitin derivative. Eur J Epidemiol. 1992;8:350-355.

SIDRIM JJC, ROCHA MFG. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

SITHEEQUE MAM, SAMARANAYAKE LP. Chronic hyperplastic candidosis/candidiasis (candidal leukoplakia). Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(4):253-67.

TSUCHIYA H, HOSHINO Y, TAJIMA K, TAKAGI N. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. J Prothet Dent. 1994;71(6):618-24.

UHL MA, BIERY M, CRAIG N, JOHNSON A. Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C. albicans*. 2003;22(11):2668-2678.

VARDAKAS KZ, MICHALOPOULOS A, KIRIAKIDOU KG, SIAMPLI EP, SAMONIS G, FALAGAS ME. Candidaemia: incidence, risk factors, characteristics and outcomes in immunocompetent critically ill patients. European Society of Clinical Microbiol and Infectious Diseases. In press 2009

WEBB BC, THOMAS CJ, WILLCOX MDP, HARTY DWS, KNOX KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 2. Oral diseases caused by *candida* species. Austral Dent J. 1998;43(3):160-6.

WESCOTT WB, CORRELL RW. Multiple recurrences of a lesion at the base of the tongue. J Am Dent Assoc. 1984;108(2):231-232.

WILLIAMS DW, JONES HS, ALLISON RT, POTTS AJC, LEWIS MAO. Immunocytochemical detection of *Candida albicans* in formalin fixed, paraffin embedded material. J Clin Pathol. 1998;51:857-9.

ZAITS C, CAMPBELL I, MARQUES AS, RUIZ LRB, SOUZA VM. Compêndio de Micologia Médica. Rio de Janeiro: Medsi, 1998.

ANEXO

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
mferrari@fob.usp.br

Processo nº 060/2008

Bauru, 10 de setembro de 2008.

Senhora Professora,

Informamos que após o envio da documentação solicitada referente ao projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa "**Hiperplasia Papilar: Análise quantitativa de Candida albicans no revestimento epitelial e sua correlação com as características microscópicas**" de autoria de Maria Carolina Vaz Goulart, sob sua orientação foi novamente analisado e considerado **APROVADO** em reunião deste Colegiado, realizada no dia 27 de agosto de 2008.

Solicitamos que ao término do trabalho, seja enviado a este Comitê um relatório final para novo parecer, o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta
Coordenadora

Profª Drª Vanessa Soares Lara

Docente do Departamento de Estomatologia