

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM CLÍNICAS ODONTOLÓGICAS  
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL**

**Mauro Gomes Trein Leite**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INALAÇÃO DE GLICOCORTICOIDE SOBRE A  
FIBROMUCOSA PALATINA EM RATOS WISTAR**

**PORTO ALEGRE**

**2014**

### CIP - Catalogação na Publicação

Leite, Mauro Gomes Trein

Avaliação do efeito da inalação de glicocorticoide sobre a fibromucosa palatina em ratos Wistar / Mauro Gomes Trein Leite. - 2014.

50 f.

Orientador: Manoel Sant'Ana Filho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Budesonida. 2. Mucosa oral. 3. Glicocorticoide. 4. Ratos. I. Sant'Ana Filho, Manoel, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**MAURO GOMES TREIN LEITE**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INALAÇÃO DE GLICOCORTICOIDE SOBRE A  
FIBROMUCOSA PALATINA EM RATOS WISTAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínicas Odontológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica.

**Orientador:** Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho

**Linha de Pesquisa:** Diagnóstico de Afecções Bucofaciais

**PORTO ALEGRE**

**2014**

Mude suas opiniões, mantenha seus princípios.  
Troque suas folhas, mantenha suas raízes.

Victor Hugo

Aos meus pais, Adão e Sonia,  
por me ensinarem seus valores e princípios,  
por me apoiarem, em todos os momentos da minha vida,  
e pela confiança em mim depositada.

A vocês **dedico este trabalho.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, Prof. Manoel Sant'Ana Filho, por ter aceito este compromisso, pela paciência ao me ensinar conceitos básicos de patologia e por toda sua disponibilidade durante as etapas da realização desta tese.

À Profa. Edela Puricelli, por me formar Cirurgião Bucomaxilofacial na sua escola e pelo estímulo à realização da minha pós-graduação.

À Profa. Fernanda Visioli, por estar presente em todas as fases deste trabalho sempre disposta a me ajudar e ensinar e, principalmente, pela amizade que tornou esta etapa muito mais fácil e tranquila.

A todos os meus colegas do programa de pós-graduação em Patologia Bucal, pelo acolhimento no departamento e pelo auxílio em todos os momentos. Conhecer vocês foi uma das melhores coisas que me aconteceu.

À colega Rúbia, por me auxiliar na finalização deste trabalho e, principalmente, pelo constante incentivo nesta etapa de conclusão.

À Alessandra e Chris, pela dedicação e atenção que tiveram comigo e com toda etapa laboratorial desta tese.

Aos meus colegas, técnicas, assistentes e coordenadoras, da OdontoHosp e do Centro de Odontologia da ISCMPA, pelo incentivo, companheirismo e amizade. Não citarei nomes, mas todos foram e são importantes na minha vida profissional e principalmente, por tornarem o meu dia a dia muito agradável e feliz.

Ao meu colega e amigo Luiz Britto, pela parceria durante estes últimos anos agregando seus conhecimentos de vida e da Odontologia.

À minha irmã Tatiane, meu cunhado Emílio e aos meus sobrinhos Lucas e Laura e a toda minha família, por entenderem estes últimos tempos em que estive mais ocupado e ausente, deixando de dedicar-lhes a atenção que eu gostaria.

À minha namorada Márcia, pelo incentivo nesta fase final, por entender minha ausência e por querer, junto comigo, ir atrás dos nossos sonhos.

À Faculdade de Odontologia e ao Programa de Pós Graduação da UFRGS, por me possibilitarem a realização deste sonho.

A todos os amigos que sempre estiveram comigo durante esta longa jornada.

A Deus, por estar permanentemente ao meu lado.

## RESUMO

Os glicocorticóides inalados vêm sendo amplamente utilizados em diversas abordagens terapêuticas. Apesar de suas inúmeras vantagens, esta terapia pode levar à irritação e inflamação dos tecidos especialmente nos sítios primários de contato. Em virtude da inexistência de estudos que avaliam a repercussão do uso de corticosteroides inalatórios sobre os tecidos moles da cavidade bucal, este trabalho propõe-se a avaliar o efeito da Budesonida inalatória em diferentes concentrações sobre a mucosa palatina de ratos Wistar. Para realização deste estudo foram utilizadas amostras parafinadas provenientes do estudo realizado por Daudt et al., 2011. Cada amostra foi avaliada quanto a proliferação celular pela técnica histoquímica (AgNORs), a porcentagem de células inflamatórias imunomarcadas por CD18 e a espessura epitelial por HE. Não foram encontrados resultados estatisticamente significantes quanto a análise da proliferação celular e imunomarcação pelo CD18 quando comparamos os grupos-teste e o grupo controle. No entanto, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ( $p=0,0027$ ) na camada de queratina, onde o grupo controle apresentou a espessura desta camada menor em relação aos grupos testados. O mesmo resultado não foi encontrado no epitélio, onde não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e os grupos-teste. Com este estudo pode-se sugerir que a inalação de glicocorticoide possui efeito sobre a fibromucosa palatina, observada no espessamento da camada de queratina e que esta resposta resulta em nenhuma ação danosa às estruturas da fibromucosa bucal.



## ABSTRACT

The inhaled glucocorticoids have been widely used in various therapeutic approaches .Despite of its many benefits, this therapy can lead to irritation and inflammation of the tissues especially in the primary sites of contact. Due to the lack of studies that evaluate the impact of the use of inhaled corticosteroids on the soft tissues of the oral cavity, this study aims to evaluate the effect of inhaled Budesonide in different concentrations on the palatal mucosa of Wistar rats . For this study paraffin samples from the study by Daudt et al (2011) were used. Each sample was assessed for cell proliferation by immunohistochemical technique (AgNORs), the percentage of inflammatory cells immunostained for CD18 and epithelial thickness by HE . No statistically significant results for the analysis of cell proliferation by CD18 immunostaining and were found when comparing the test groups and the control group. However, were found statistically significant differences (  $p = 0.0027$  ) in the keratin layer , where the control group had the smallest thickness of this layer relative to the tested groups. The same result was not found in the epithelium, where no statistically significant differences between the control and test groups were observed. With this study it can be concluded that inhaled glucocorticoids have effect on the oral mucosa palate observed in the thickening of the keratin layer and that this response results in no harmful to the oral mucosa of the oral structures action.

## **SUMÁRIO**

<b>1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS .....</b>	<b>8</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>15</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>
<b>APÊNDICE A - TÉCNICA DE COLORAÇÃO PELA HEMATOXILINA-EOSINA .....</b>	<b>47</b>
<b>APÊNDICE B - TÉCNICA DE IMUNUHISTOQUÍMICA.....</b>	<b>48</b>

## 1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

Medicações à base de corticoides, por via inalatória, vêm sendo amplamente administradas para o tratamento de doenças alérgicas e obstrutivas pulmonares,<sup>1</sup> especialmente para a asma, a qual, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), acomete 235 milhões de pessoas no mundo, sendo a doença crônica mais comum em crianças.<sup>2</sup>

Os corticoides são hormônios produzidos pela glândula suprarrenal e dividem-se em mineralocorticoides e glicocorticoides. Estes pertencem ao grupo dos hormônios esteroides, e dividem-se em naturais e sintéticos.<sup>3</sup> O representante natural é o cortisol, produzido pela glândula suprarrenal, diretamente envolvido no controle do estresse.<sup>4</sup> Já os sintéticos, produzidos pela indústria farmacêutica, diferem-se dos naturais pelo fato de apresentarem duas ligações duplas no núcleo básico dos hormônios glicocorticoides. Dentre eles, os mais conhecidos são: budesonida, cortisona, hidrocortisona, beclometasona, betametasona, dexametasona, metilprednisolona, prednisolona e triancinolona.<sup>5,6</sup>

A budesonida constitui-se de um glicocorticoide amplamente utilizado para o controle e alívio da falta de ar em portadores de asma,<sup>6</sup> onde a resposta inflamatória torna-se o principal alvo para o tratamento destas patologias, pois o uso crônico desta medicação favorece a ação dos broncodilatadores e diminui em longo prazo a inflamação dos brônquios, melhorando o fluxo de ar nas vias respiratórias. Como resultado, diminui a frequência e a gravidade das crises asmáticas, bem como o número de hospitalizações, melhorando a qualidade de vida destes pacientes.<sup>7</sup>

Os corticoides agem sobre os leucócitos inibindo sua ativação, proliferação e diminuindo a sobrevivência destas células. Além disso, os corticoides são capazes de inibir a transcrição de citocinas derivadas de linfócitos T.<sup>8</sup> Em doses farmacológicas, os glicocorticoides podem reduzir a atividade do fator de transcrição STAT4 e, conseqüentemente, diminuir a liberação de citocinas Th1, incluindo interleucina (IL)-2 e interferon, além de citocinas Th2, incluindo IL-4, IL-5 e IL-13.<sup>9</sup> Em relação aos linfócitos B, o tratamento com corticoides leva à sua diminuição por apoptose dos seus progenitores. Além disso, reduzem a produção de IgG em modelo de artrite.<sup>10</sup>

Quando a budesonida é administrada através da via respiratória, por meio de inalação, possui efeito anti-inflamatório tópico. A sua ação anti-inflamatória envolve as células T, os eosinófilos e os mastócitos, além, de provocar a inibição da liberação dos mediadores inflamatórios e das respostas imunes mediadas por citocinas.<sup>6</sup> Sabe-se também que a utilização de glicocorticoides por essa via de administração caracteriza-se por promover menores concentrações sistêmicas da droga, refletindo em menores efeitos adversos<sup>11</sup> tais como a catarata<sup>12</sup>, glaucoma<sup>13</sup>, redução da densidade mineral e aumento do risco de fraturas, devido a osteoporose.<sup>14,15</sup> Em contrapartida, embora os corticoides inalatórios tenham efeitos antialérgicos e anti-inflamatórios em suas apresentações, eles podem causar irritação e inflamação dos tecidos, especialmente nos sítios primários de contato, incluindo a mucosa oral e laringofágica, onde os paraefeitos mais incidentes são: candidíase, rouquidão, disfonia, faringite e reflexo de tosse.<sup>16</sup>

Os estudos que apresentam os efeitos adversos dos corticoides inalatórios, geralmente, são realizados de forma subjetiva, utilizando-se de questionários para obter dos pacientes informações sobre os sinais e sintomas mais comuns durante o uso da medicação.<sup>17-19</sup> Estudos que mostram os efeitos dos corticoides sobre os tecidos de passagem da droga, quando utilizados na forma inalatória, são escassos.<sup>20</sup>

Vignola et al.<sup>20</sup>, avaliaram amostras de espécimes biopsiados do epitélio brônquico de 53 pacientes, divididos em quatro grupos. O primeiro grupo composto de 9 indivíduos diagnosticados com asma leve que não faziam uso crônico de corticoides; o segundo grupo composto por 9 indivíduos com asma moderada, tratados com corticoide inalatório; o terceiro grupo, composto por 19 pacientes com asma persistente, tratados com corticoide sistêmico e inalatório, quando necessário; e um quarto grupo, controle, com 16 pacientes jovens saudáveis. Os autores, pelo método da histometria, avaliaram a espessura do epitélio brônquico através da aferição da área ao longo de um comprimento de 100 mm, onde a relação da área pelo comprimento resultou na espessura do epitélio e, pela imuno-histoquímica, através da contagem do número de células positivas por milímetro quadrado do epitélio brônquico, avaliaram a expressão de moléculas relacionadas a apoptose celular (Bcl-2 e p53), a proliferação celular (PCNA) e a ativação celular (NF-kB e CD40/CD40L). Nos resultados encontraram que a espessura do epitélio era maior

nos grupos de indivíduos que faziam uso de corticoide sistêmico e controle do que nos grupos de indivíduos que utilizavam corticoides inalatórios e não tratados. A expressão de Bcl-2 foi maior em todos os grupos que apresentavam asma do que no controle. Os pacientes dependentes de corticoide sistêmico apresentaram uma expressão maior de PCNA, NF-kB, CD40L do que os outros grupos. A expressão de CD40 foi maior nos grupos de uso de corticoide oral e no grupo dos asmáticos não tratados do que nos grupos que usavam corticoide inalatório e controle. Os autores concluíram que, em células epiteliais brônquicas de pacientes asmáticos, dependentes de corticoide, os marcadores de sobrevivência e proliferação celular são coexpressos com os marcadores de ativação celular sugerindo que, no asmático, o reparo tecidual está associado a um estado de ativação persistente das células do epitélio brônquico.

Na literatura, encontramos muitos estudos que avaliam os efeitos do álcool e do tabaco sobre as mucosas bucais, na busca por explicar como ocorrem e quais são as alterações que estes agentes agressores podem causar aos tecidos bucais.<sup>21-24</sup>

Maito et al.<sup>21</sup>, em 2003, avaliaram a expressão do PCNA nas camadas basal e parabasal no epitélio do dorso da língua de camundongos submetidos à duas aplicações tópicas semanais e à ingestão de etanol a 40°GL. Os resultados mostraram que aos 12 meses de experimento o número total de células PCNA positivas da camada intermediária foi maior no grupo de animais que realizou ingestão contínua de etanol. Os autores concluíram que o etanol aumenta a proliferação celular pela sua ingestão após um período mínimo de seis meses, uma vez que só foram encontradas alterações aos 12 meses de experimento.

Carrard et al.<sup>22</sup>, em 2004, avaliaram o efeito do álcool sobre a atividade proliferativa das células epiteliais da mucosa do dorso lingual de camundongos frente a ação do etanol 40°GL, por meio da contagem e mensuração das áreas das regiões organizadoras de nucléolos (AgNORs), através da técnica de impregnação pela prata. Os animais foram divididos em três grupos: início, seis meses e 12 meses de experimento. O resultados mostraram um aumento da média do número e da área das AgNORs na camada parabasal aos 12 meses no grupo que ingeriu o etanol. Os autores concluíram que a ingestão de etanol a 40°GL provocou um aumento da proliferação celular na mucosa bucal.

Semenzati et al.<sup>24</sup>, em 2012, estudaram os efeitos da exposição aguda à fumaça do cigarro nas mucosas de língua, faringe e laringe de ratos. Para a análise foram utilizados 40 ratos divididos em dois grupos: grupo controle formado por 20 animais não expostos à fumaça e grupo teste com 20 ratos expostos à fumaça de 40 cigarros/dia por 60 dias. Após 60 dias os animais foram mortos e biopsias da base da língua, faringe e laringe foram realizadas. As amostras foram avaliadas pela coloração de hematoxilina-eosina para observar alterações histológicas como: hiperplasia da camada basal, hiperkeratose, displasia, crescimento vascular, carcinoma e infiltrado polimorfonucleares e os resultados apresentados através de escores onde: 0 (inalterado), 1 (alteração leve), 2 (alteração moderada), 3 (alteração grave). A displasia foi classificada como leve (apenas o terço inferior do epitélio), moderada (2/3 do epitélio) e grave (epitélio completo). A análise histométrica avaliou a espessura da camada queratina a partir da média de 10 medidas, em micrômetros, de cada lâmina fotografada. O estudo imuno-histoquímico avaliou a expressão das moléculas p53, se positivas ou negativas e Ki67, através da graduação da coloração castanha e altura no epitélio e pontuada como: 0 (sem coloração), 1 (coloração de núcleos apenas das células da camada basal), 2 (coloração de núcleos das células da camada basal e parabasal) e 3 (coloração de células de todo o tecido epitelial). Como resultado os autores obtiveram que a análise histológica da língua, a partir do grupo de tabaco, revelaram hiperplasia epitelial (90%), hiperplasia das células da camada basal (95%), displasia leve a moderada (85%). Na faringe observaram hiperplasia das células da camada basal (85%), displasia (25%). Na laringe encontraram hiperplasia de células basais (70%), hiperplasia epitelial (55%) e infiltrado inflamatório (25%). A análise morfométrica revelou que a espessura da camada de queratina foi maior no grupo exposto à fumaça do cigarro. A expressão da p53 foi negativa em ambos os grupos. A imunoexpressão do Ki-67 foi positiva em núcleos das células da camada basal, mas nos núcleos de células da camada parabasal estava positiva apenas no grupo de tabaco. Os autores concluíram que a exposição de animais à fumaça de cigarro por 60 dias resultou em lesões benignas. A duração da exposição não foi suficiente para fazer com que ocorresse o desenvolvimento do câncer, como confirmado pela expressão negativa da proteína p53 em todas as lâminas examinadas. Análise de expressão ki-67 mostrou intensa proliferação epitelial em resposta ao dano.

Estes resultados só foram possíveis graças a aplicação de técnicas como a histometria, histoquímica e imunohistoquímica. A histometria é uma ferramenta de precisão no estabelecimento de medidas confiáveis de estruturas anatômicas, com aplicação no estudo de alterações patológicas baseadas no grau de alteração tecidual.<sup>25</sup>

Já a técnica da histoquímica tem por objetivo o estudo das regiões organizadoras nucleolares (NORs) que tratam-se de alças de DNA que, em humanos, localizam-se nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22.<sup>26</sup> As NORs são unidades funcionais que compõem parte do nucléolo e realizam a síntese do ácido ribonucleico ribossômico. Composto o nucléolo existe também um grupo de proteínas ácidas, as quais possuem afinidade pela prata. Ao serem impregnadas pela prata são facilmente visualizadas pela microscopia óptica como pontos pretos no interior do núcleo, e passam a ser denominadas de proteínas AgNORs.<sup>27,28</sup> Estas proteínas foram identificadas como nucleolinas, e possuem função regulatória sobre a síntese de RNAr.<sup>29</sup> Durante a interfase, as NORs e as proteínas argirófilas agrupam-se formando o nucléolo, sendo que durante a interfase, o número das AgNORs varia de acordo com a velocidade de duplicação celular, ou seja, quanto mais rápido o ciclo celular, menores são as chances das NORs agruparem-se durante a interfase.<sup>30,31</sup>

As AgNORs podem ser quantificadas através da contagem do número de pontos, da mensuração da área dos pontos e do percentual do número de pontos por núcleo.<sup>32,33</sup> Já o percentual de AgNORs por núcleo é dado pelo pAgNOR.

Grande parte dos estudos de histologia e AgNOR utilizam também pAgNOR como método de quantificação das AgNORs, o qual estabelece a percentagem de núcleos com um ou mais AgNORs em 100 células.<sup>34</sup> Outro método de contagem é o mAgNOR (denominado AgNOR médio), o qual consiste na divisão do número total de NORs pelo número de células contadas.<sup>35</sup>

A técnica de imuno-histoquímica consiste em um conjunto de metodologias que utilizam anticorpos como reagentes específicos capazes de identificar e estabelecer ligação com constituintes tecidulares, os quais funcionam como antígenos. Esta ligação permite situar e identificar a presença de diferentes

substâncias nas células e tecidos por intermédio da cor que é associada aos complexos antígeno-anticorpo formados.<sup>36</sup>

O marcador de superfície CD18 está presente em leucócitos do sangue periférico, tornando-se essencial nas respostas imunodependentes de contato célula-célula. É membro da subfamília de receptores de integrinas, os quais possuem a função de integrar o ambiente extracelular com o citoesqueleto da célula. A família  $\beta 2$  das integrinas (leuointegrinas), é composta por três heterodímeros que usam a cadeia  $\beta$ , denominada CD18, associada não covalentemente a três diferentes cadeias e formando três diferentes integrinas: LFA-1, MAC-1 e p150,95. Estas integrinas se localizam nos leucócitos e estão envolvidas na adesão às células endoteliais ativadas, necessárias para o extravasamento dos linfócitos a partir do endotélio para o foco inflamatório, e também na quimiotaxia dos leucócitos para os locais de inflamação.<sup>37</sup>

Com base no que foi exposto anteriormente, justifica-se a realização do presente estudo à medida que trabalhos avaliando a repercussão do uso de glicocorticoides inalatórios sobre os tecidos moles da cavidade bucal são inexistentes. Portanto, torna-se lícito avaliar o efeito da Budesonida inalatória em diferentes concentrações sobre a mucosa palatina de ratos Wistar utilizando, para este objetivo, técnicas fundamentais como a histometria, histoquímica e a imunohistoquímica.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito da inalação de glicocorticoide sobre a fibromucosa palatina de ratos nos diferentes grupos experimentais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) avaliar a espessura do tecido epitelial por meio da histometria;
- b) avaliar a proliferação epitelial por meio da quantificação de AgNORs;
- c) quantificar as células inflamatórias do mesênquima por meio da imunomarcagem do CD18.

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO\*

## AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INALAÇÃO DE GLICOCORTICOIDE SOBRE A FIBROMUCOSA PALATINA EM RATOS WISTAR

Mauro Gomes Trein Leite<sup>1</sup>, Rúbia da Rocha Vieira<sup>1</sup>, Fernanda Visioli<sup>1</sup>, Luciana Dondonis Daudt<sup>2</sup>, Juliano Cavagni<sup>2</sup>, Cassiano Kuchenbecker Rosing<sup>2</sup>, Manoel Sant'Ana Filho<sup>1</sup>

- 1- Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
- 2- Periodontia, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### RESUMO

Os glicocorticóides inalados vêm sendo amplamente utilizados em diversas abordagens terapêuticas. Apesar de suas inúmeras vantagens, esta terapia pode levar à irritação e inflamação dos tecidos especialmente nos sítios primários de contato. Em virtude da inexistência de estudos que avaliam a repercussão do uso de corticosteroides inalatórios sobre os tecidos moles da cavidade bucal, este trabalho propõe-se a avaliar o efeito da Budesonida inalatória em diferentes concentrações sobre a mucosa palatina de ratos Wistar. Para realização deste estudo foram utilizadas amostras parafinadas provenientes do estudo realizado por Daudt et al.,

---

\* Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* (Qualis Odontologia A1 – Ano Base 2014, fator de impacto 1.359).

2011. Cada amostra foi avaliada quanto a proliferação celular pela técnica histoquímica (AgNORs), a porcentagem de células inflamatórias imunomarcadas por CD18 e a espessura epitelial por HE. Não foram encontrados resultados estatisticamente significantes quanto a análise da proliferação celular e imunomarcção pelo CD18 quando comparamos os grupos-teste e o grupo controle. No entanto, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ( $p=0,0027$ ) na camada de queratina, onde o grupo controle apresentou a espessura desta camada menor em relação aos grupos testados. O mesmo resultado não foi encontrado no epitélio, onde não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e os grupos-teste. Com este estudo pode-se sugerir que a inalação de glicocorticoide possui efeito sobre a fibromucosa palatina, observada no espessamento da camada de queratina e que esta resposta resulta em nenhuma ação danosa às estruturas da fibromucosa bucal.

Palavras-chave: budesonida, glicocorticoides, mucosa oral, ratos.

### **ABSTRACT**

The inhaled glucocorticoids have been widely used in various therapeutic approaches .Despite of its many benefits, this therapy can lead to irritation and inflammation of the tissues especially in the primary sites of contact. Due to the lack of studies that evaluate the impact of the use of inhaled corticosteroids on the soft tissues of the oral cavity, this study aims to evaluate the effect of inhaled Budesonide in different concentrations on the palatal mucosa of Wistar rats . For this study paraffin samples from the study by Daudt et al (2011) were used. Each sample was

assessed for cell proliferation by immunohistochemical technique (AgNORs), the percentage of inflammatory cells immunostained for CD18 and epithelial thickness by HE . No statistically significant results for the analysis of cell proliferation by CD18 immunostaining and were found when comparing the test groups and the control group. However, were found statistically significant differences (  $p = 0.0027$  ) in the keratin layer , where the control group had the smallest thickness of this layer relative to the tested groups. The same result was not found in the epithelium, where no statistically significant differences between the control and test groups were observed. With this study it can be concluded that inhaled glucocorticoids have effect on the oral mucosa palate observed in the thickening of the keratin layer and that this response results in no harmful to the oral mucosa of the oral structures action.

Keywords: budesonide, glucocorticoids, oral mucosa, rats.

## **INTRODUÇÃO**

Os glicocorticóides são hormônios esteróides, sintetizados no córtex da glândula adrenal, os quais afetam o metabolismo dos carboidratos<sup>1</sup> e agem no controle da inflamação das vias aéreas por reduzir o número e a ativação das células inflamatórias presentes nestas áreas.<sup>2,3</sup>

Por atuarem de múltiplas maneiras sobre as células inflamatórias e serem eficazes no controle da inflamação das vias aéreas, medicamentos a base deste hormônio vêm sendo amplamente utilizadas para o tratamento de doenças obstrutivas pulmonares, como por exemplo a asma, a qual constitui-se de uma doença que apresenta broncoconstrição reversível, hiper-responsividade brônquica

com aumento da produção de muco,<sup>4</sup> acometendo, aproximadamente, 235 milhões de indivíduos ao redor do mundo.<sup>5</sup>

Os glicocorticóides sistêmicos são eficazes no manejo da asma; no entanto, o uso prolongado deste, está associado a efeitos colaterais indesejáveis relacionados à dose e ao tempo de tratamento.<sup>6</sup> Neste intuito, a terapia inalatória da asma surgiu com a síntese de produtos com máximo efeito tópico e mínima potência sistêmica e isto foi possível graças ao desenvolvimento de agentes lipossolúveis de alta afinidade ao receptor e de rápida inativação hepática após absorção sistêmica, resultando na redução dos riscos de efeitos colaterais.<sup>7</sup>

Atualmente, diversos glicocorticóides inalatórios estão disponíveis no mercado dentre eles a budesonida, o dipropionato de beclometasona e a flunisolida.<sup>8</sup> A Budesonida é um corticosteroide não halogenado amplamente utilizado para o controle e alívio da falta de ar em portadores de asma,<sup>1</sup> o qual que pode ser usado em solução para nebulização, quando parece apresentar maior eficácia nas crises por melhor fixação ao receptor lipofílico intracelular comparada às formas em spray.<sup>7</sup> No momento em que a budesonida é administrada por meio de inalação, sua ação antiinflamatória envolve as células T, os eosinófilos e mastócitos e provoca a inibição da liberação dos mediadores inflamatórios e de respostas imunes mediadas por citocinas.<sup>1</sup> O uso crônico deste medicamento favorece a ação dos broncodilatadores e diminui a longo prazo a inflamação dos brônquios resultando em uma melhora no fluxo de ar nas vias respiratórias.<sup>9</sup>

Embora os corticosteróides inalatórios apresentem vantagens como efeitos antialérgicos e anti-inflamatórios, eles podem causar irritação e inflamação dos tecidos, especialmente nos sítios primários de contato<sup>10</sup> podendo até ocasionar rouquidão, disfonia e fragilidade na voz.<sup>8</sup>

Baseado no que foi exposto anteriormente e mediante a inexistência de estudos que avaliam a repercussão do uso de corticosteroides inalatórios sobre os tecidos moles da cavidade bucal, este trabalho propõe-se a avaliar o efeito da Budesonida inalatória em diferentes concentrações sobre a fibromucosa palatina de ratos Wistar.

## **METODOLOGIA**

Para a realização deste estudo foram utilizados os blocos produzidos pela parte experimental do trabalho desenvolvido por Daudt et al.,<sup>11</sup> que foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e obedeceu às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e às Orientações Éticas Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS), tendo sua aprovação registrada no protocolo de número 2008128. A metodologia utilizada segue transcrita.

### **Delineamento do Estudo**

Este estudo utilizou um desenho experimental do tipo prospectivo, randomizado, controlado, cego, em modelo animal.

## **Descrição da amostra**

A amostra foi composta de trinta ratos Wistar, machos, com 60 dias de vida e com peso médio de 225g.

Ao longo do período experimental, os animais permaneceram no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL), em ambiente climatizado (20°C) e estiveram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos receberam ração padronizada e água *ad libitum*.

## **Procedimentos prévios**

Previamente ao início do estudo, os animais foram pesados em balança digital (Marte, modelo AS100, SP, Brasil), randomizados e agrupados, conforme grupo experimental, em seis caixas-moradia com cinco animais em cada uma. Após, os mesmos receberam numeração de um a dez, realizadas através de marcações com caneta permanente no rabo, e as caixas identificadas de acordo com o grupo experimental ao qual pertenciam.

A fim de diminuir o estresse gerado pelo efeito de novidade, os animais foram expostos à câmara de ventilação forçada durante um período de cinco minutos diários, sem a nebulização de qualquer solução, por um período de quatro dias, previamente ao início do período experimental. Tal procedimento constituiu-se na colocação dos animais na câmara de ventilação forçada e acionamento do nebulizador, durante o período acima citado.

## **Randomização**

A randomização foi realizada a partir de sorteio, em uma urna, que continha trinta elementos, com a identificação de dez elementos de cada um dos três grupos experimentais.

## **Grupos experimentais**

Os animais foram divididos em três grupos experimentais de dez ratos. Um dos grupos foi considerado controle, ao qual se administrou solução salina. Aos demais grupos foram administradas soluções de Budesonida 30µg/dia (teste 1) e 100µg/dia (teste 2), respectivamente.

## **Preparo da medicação**

A escolha das doses do medicamento estudado baseou-se em dados prévios da literatura. O estudo de Elias et al.<sup>12</sup> verificou que uma dose de 30µg/dia, por 15 dias (teste 1), foi capaz de causar alterações de comportamento em animais. Já em seres humanos, 100 µg/dia (teste 2) é considerada a menor dose terapêutica recomendada para tratamento da asma brônquica.<sup>11</sup>

Previamente ao início do período experimental, verificou-se a capacidade de nebulização do aparelho por meio de múltiplas nebulizações de 5 minutos cada. O volume da solução nebulizada permaneceu o mesmo durante toda a simulação (1,1 ml a cada 5 minutos de nebulização).



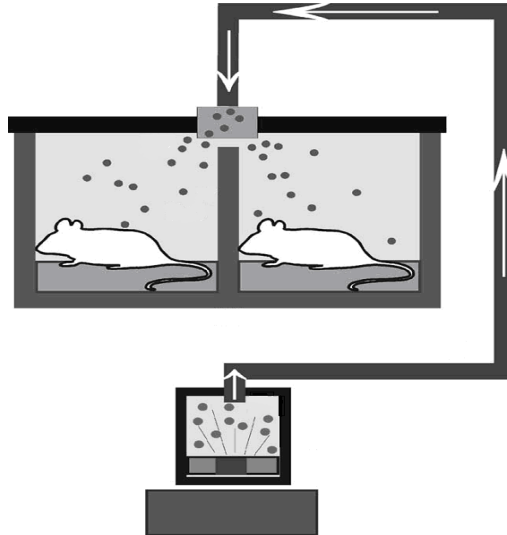
O preparo da medicação foi realizado pelos pesquisadores por meio da diluição de budesonida, sob a forma de suspensão para nebulização (Pulmicort®, 0,5 mg/ml, Laboratório AstraZeneca, Cotia, SP, Brasil). Baseado na capacidade de nebulização do aparelho em 5 minutos (1,1 ml) procedeu-se à diluição de 2,7 ml da suspensão em 97,3 ml de solução salina (NaCl 0,9%) (teste 1) e de 9,1 ml de budesonida em 90,9 ml de solução salina (teste 2).

A fim de verificar a capacidade de nebulização do aparelho no decorrer do estudo, foram realizadas semanalmente mensurações do volume restante da solução no reservatório. Não foram observadas alterações na quantidade nebulizada.

### **Câmara de ventilação forçada e administração da medicação**

Para a inalação das soluções pelos animais, utilizou-se uma câmara de ventilação forçada, de acordo com a metodologia empregada por Elias et al.<sup>12</sup> A câmara consiste em um dispositivo de acrílico transparente com 3 mm de espessura e dimensões de 22 cm de altura, 22 cm de largura e 22 cm de comprimento, dividida em quatro células de igual tamanho e coberta por tampa removível de mesmo material. No centro da tampa, há uma perfuração que permite a conexão da câmara com o aparato de nebulização (NS Indústria de Aparelhos Médicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) (Figura 1).

**Figura 1.** Desenho esquemático da caixa de ventilação forçada (adaptado de Elias et al.).<sup>12</sup>



### **Tratamento por inalação**

Cada grupo experimental foi submetido à câmara de ventilação forçada na seguinte ordem: dois agrupamentos de quatro animais e um agrupamento de dois, totalizando, assim, a exposição dos dez animais. Após a colocação dos mesmos em suas respectivas caixas, cada uma era tampada e selada com fita adesiva (3M do Brasil, Sumaré, SP, Brasil) a fim de que a medicação não fosse perdida durante os procedimentos de nebulização. À caixa e ao reservatório do nebulizador foi acoplada uma cânula para estabelecer a comunicação dos dois dispositivos. O nebulizador era ligado, e as soluções- teste ou controle eram vaporizadas por um período de cinco minutos, devidamente cronometrados. Estimou-se que, em um período de cinco minutos, seriam nebulizados 1,1ml das soluções. Concluído o tempo de nebulização, o aparelho era desligado e os animais permaneciam por mais um

minuto na caixa a fim de que a solução se dissipasse. Os animais eram, então, devolvidos para suas respectivas caixas-moradia, e a câmara devidamente limpa com água e sabão para remover depósitos da medicação junto às paredes da mesma. Todos os procedimentos de nebulização foram realizados no período da manhã, uma vez ao dia, no mesmo horário, durante o período experimental de 14 dias.

Para garantir o adequado funcionamento do dispositivo, foi realizada semanalmente uma nebulização sem os animais no interior da câmara, a fim de verificar o volume de nebulização. Além disso, mensurou-se o volume restante da solução no reservatório do aparelho após essa nebulização, a fim de verificar possíveis alterações no nebulizador.

### **Saúde dos animais**

Os ratos foram pesados em balança digital (Marte, modelo AS100, SP, Brasil) semanalmente, ao longo de todo período experimental, para acompanhamento da sua saúde geral. Durante o procedimento de morte dos animais uma amostra não foi possível ser coletada, ficando o grupo teste 2 com 9 animais.

### **Morte dos animais**

Após 14 dias do início do período experimental os animais foram mortos por decapitação. Esse procedimento foi realizado 24 horas após a última administração da medicação. As maxilas dos animais foram removidas com auxílio de cinzéis e a excisão dos palatos realizada em seguida. Os tecidos removidos foram

armazenados em potes contendo solução de formalina tamponada a 10%. Todos os potes foram etiquetados com o número do animal e grupo ao qual cada rato pertencia.

### **Descarte dos animais**

Após a morte e obtenção das peças para análise morfológica, os ratos foram colocados em sacos plásticos e encaminhados para descarte seguindo o protocolo do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL).

### **Infraestrutura**

Os procedimentos laboratoriais descritos neste trabalho foram realizados no Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia, no Laboratório de Patologia Bucal J. J. D. Barbachan da FO/UFRGS. A avaliação das lâminas histológicas foi realizada na Unidade de Histometria e Morfometria do setor de Patologia Bucal da FO/UFRGS.

### **Estudo histológico**

As peças foram fixadas e conservadas em formalina a 10% e submetidas a processamento de rotina para inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram submetidos a cortes longitudinais em micrótomo (Leica 2155, Heidelberg, Alemanha). De cada bloco foram obtidos três cortes de 4µm, sendo um submetido à coloração por HE, um à imunomarcagem para CD18 e um para técnica de

histoquímica para impregnação pela prata para evidênciação das regiões organizadoras nucleolares (AgNORs).

### **Cegamento**

O cegamento dos pesquisadores ocorreu no momento da análise das lâminas. As lâminas foram codificadas por um examinador externo ao estudo, de modo que o examinador que realizou a análise das lâminas não sabia a que grupo cada peça pertencia.

### **Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade foi confirmada ao longo do estudo onde, a cada 20 lâminas avaliadas, uma foi sorteada para reavaliação após um período de 7 dias. O teste utilizado foi o Coeficiente de Correlação Intraclassa (ICC), onde o valor mínimo aceito foi de 0,75. Durante a avaliação, o examinador estava cego para qual grupo pertencia o material.

### **Imuno-histoquímica**

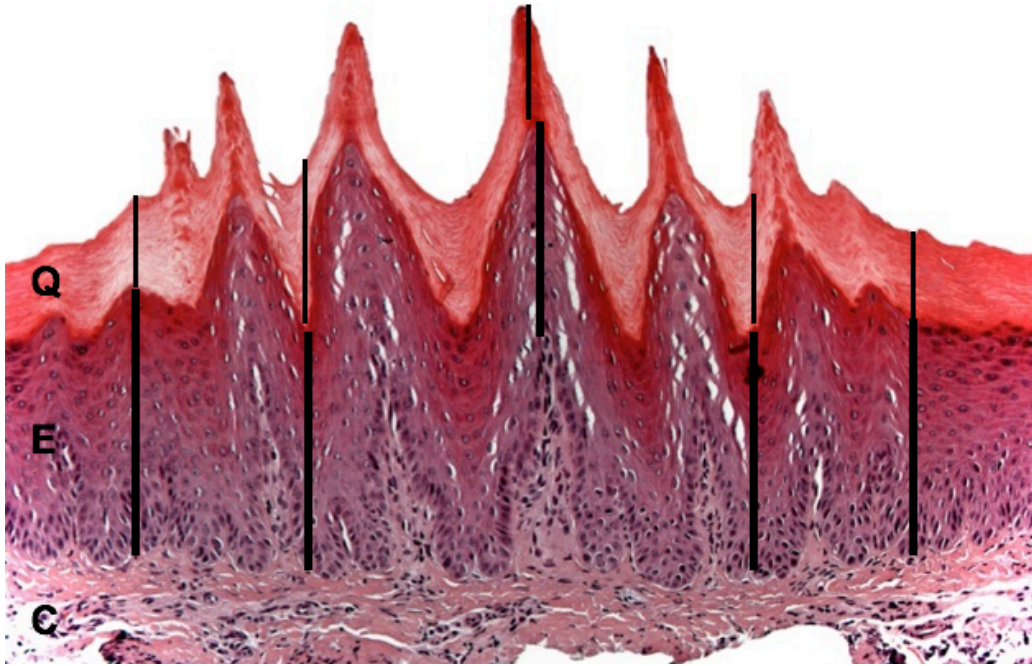
Os cortes selecionados para serem submetidos à técnica imunohistoquímica foram montados em lâminas histológicas silanizadas, desparafinizadas em xilol, reidratadas em álcool e imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em

metanol para bloqueio da peroxigenase endógena. A seguir, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica. Após, foram incubados os anticorpos CD18, na diluição 1:100 (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA) (Clone MEM-48). O controle positivo e negativo dos anticorpos foi realizado em apêndices humanos do material de arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da UFRGS. A detecção imuno-histoquímica foi realizada através do sistema EnVision™ + System (Dako, CA, USA).

### **Análise dos dados**

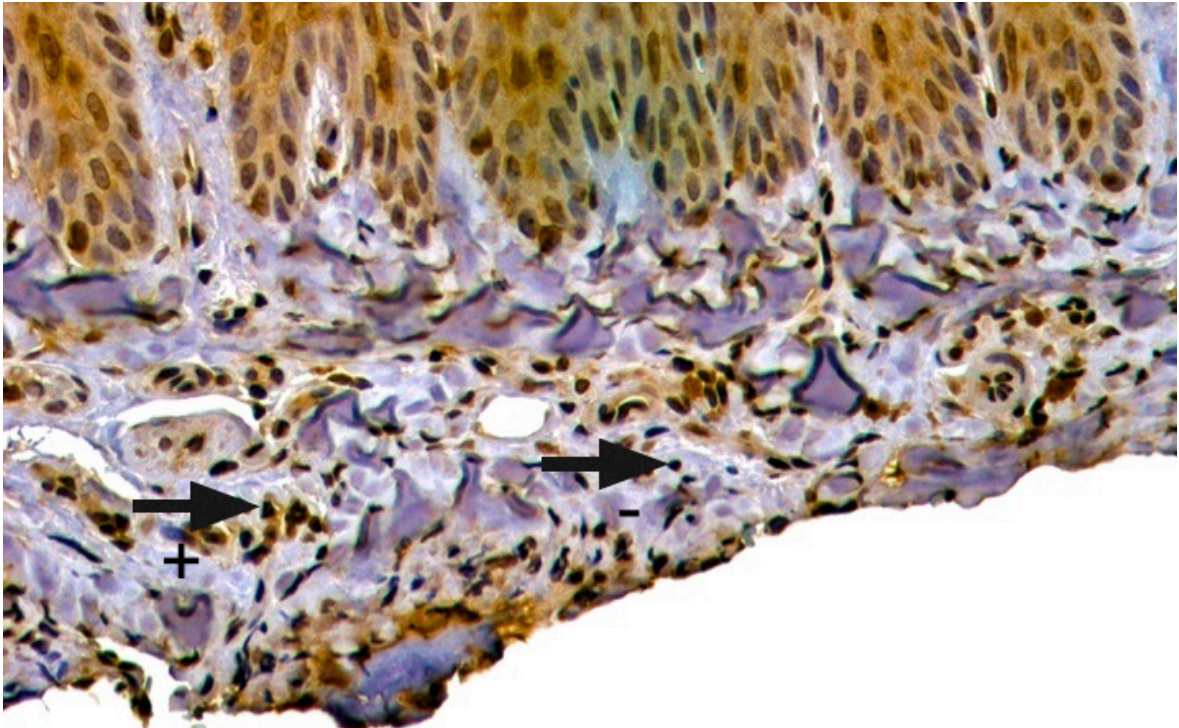
Para a realização da medição da espessura do epitélio foram capturadas imagens das lâminas coradas por HE utilizando-se o aumento de 200 vezes. Foi utilizada a ferramenta de medição de retas do sistema Image J® software (*National Institutes of Health*, Bethesda, MD, USA) calculado em pixels, tomando pontos para medição. Foram distribuídos cinco pontos equidistantes ao longo de todo o comprimento da camada epitelial e da camada de queratina. Os valores obtidos foram lançados numa planilha eletrônica que realizou o cálculo da média do comprimento para cada uma das lâminas (Figura 2).

**Figura 2.** Fotomicrografia da fibromucosa palatina do rato. Observa-se a presença do tecido epitelial (E), tecido conjuntivo (C) e camada de queratina (Q). Técnica de coloração Hematoxilina/Eosina - Aumento original de 200x.



Os cortes histológicos imunomarcados foram submetidos à análise quantitativa realizada por meio do cálculo da porcentagem de linfócitos positivos em cada lâmina (Figura 3).

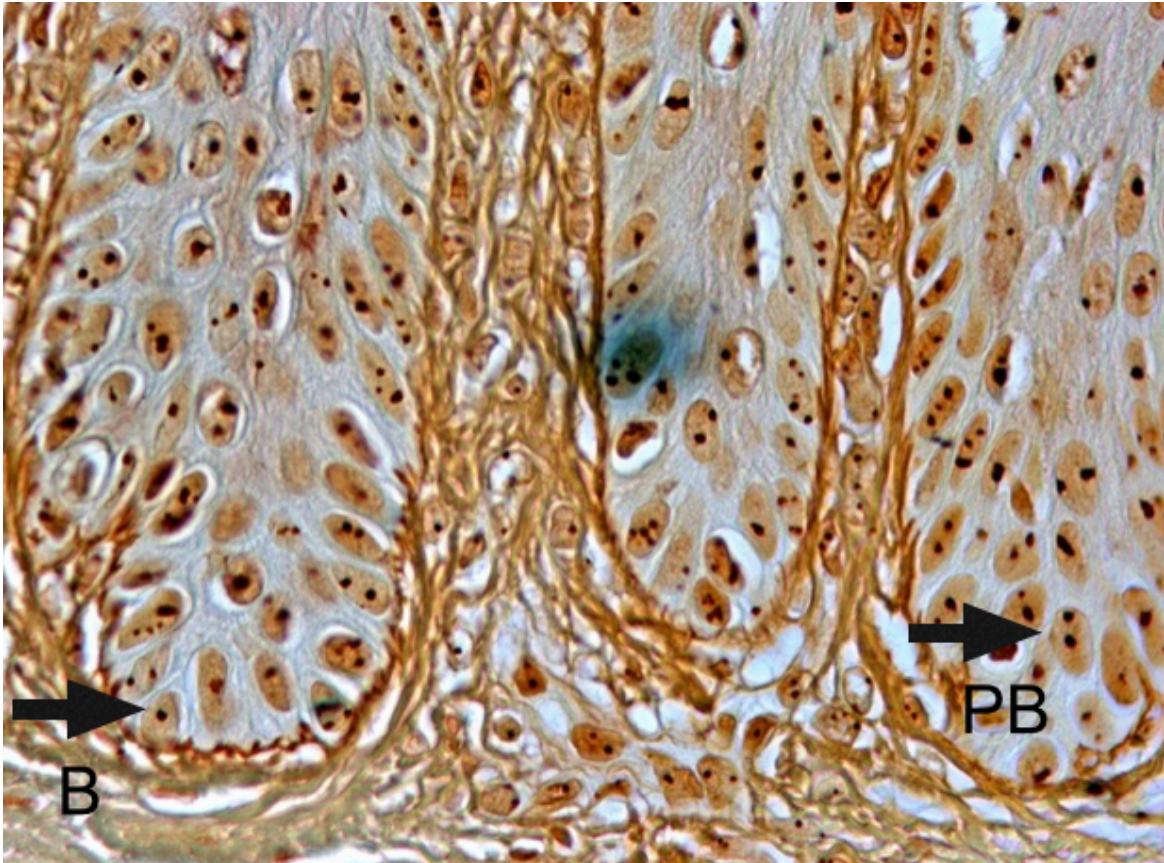
**Figura 3.** Fotomicrografia da fibromucosa palatina. Técnica imunohistoquímica para marcação de CD18 - Aumento original de 400x.



As lâminas coradas pela técnica de AgNOR, foram submetidas à avaliação quantitativa, a partir da contagem dos pontos de AgNOR, segundo os critérios estabelecidos por Crocker et al.<sup>13</sup> Foram calculadas as médias dos pontos de AgNORs por núcleo com mais de 1, 2, 3 e com mais de 4 pontos de AgNORs. Foram analisadas as 50 primeiras células da camada basal e as 50 primeiras células da camada parabasal, no sentido horizontal, da esquerda para a direita de cada lâmina. Considerou-se camada basal aquela na qual as células tinham pelo menos uma porção da sua membrana celular em contato com o tecido conjuntivo. Foram consideradas da camada parabasal as células acima da camada basal, exceto aquelas que apresentavam o achatamento típico das células superficiais (Figura 4).



**Figura 4.** Fotomicrografia da fibromucosa palatina. Técnica de impregnação pela prata - Aumento original de 1000x.



### **Análise estatística**

Os dados foram analisados no programa *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 18.0 (SPSS Ins., Chicago, IL, EUA). Foi testada a normalidade dos dados, e utilizada a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, para dados paramétricos. As diferenças estatísticas, nos diferentes grupos experimentais, foram avaliadas pelo teste Post-Hoc de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

Neste estudo foram utilizados 29 animais divididos em três grupos: controle (GC), concentração de 30µg (T1) e concentração de 100µg (T2), onde foram avaliados a proliferação celular pela técnica histoquímica (AgNORs), a porcentagem de células inflamatórias imunomarcadas por CD18 e a espessura epitelial por HE. Na análise da proliferação celular pela contagem do número de AgNORs por núcleo, não encontramos variações estatisticamente significantes, tanto na camada basal (Tabela 1), quanto na camada parabasal (Tabela 2).

**Tabela 1.** Distribuição das médias e desvios-padrão das contagens do número de AgNORs por núcleo das células da camada basal, nos grupos controle (GC), concentração de 30µg (T1) e concentração de 100µg (T2).

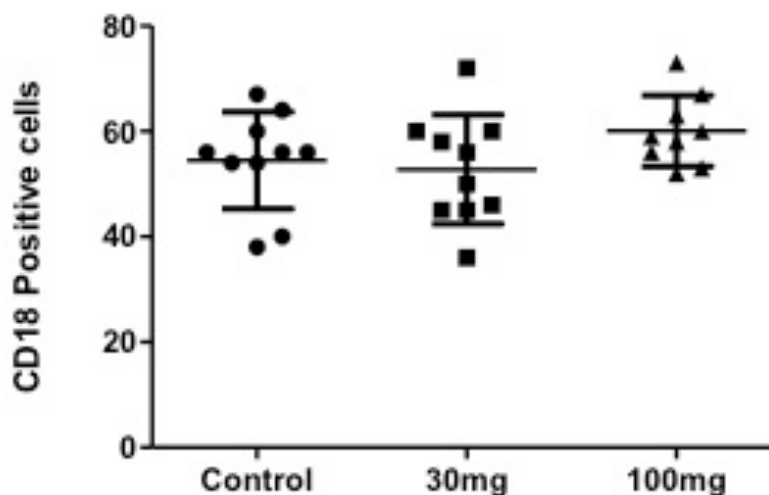
Camada Basal				
	Controle	30µg	100µg	P
mAgNOR	2,152(± 0,247)	2,144(± 0,163)	2,147(± 0,246)	0,99
pAgNORr>1	71,2 (± 10,46)	71,8 (± 6,42)	71,33 (± 7,55)	0,98
pAgNORr>2	33,2 (± 10,76)	31,6 (± 8,47)	33,56 (± 12,07)	0,90
pAgNORr>3	9,8 (± 6,56)	9,6 (± 4,6)	7,77 (± 6,8)	0,73
pAgNORr>4	1,4 (± 1,35)	1 (± 1,41)	0,88 (± 1,45)	0,58

**Tabela 2.** Distribuição das médias e desvios-padrão das contagens do número de AgNORs por núcleo das células da camada parabasal, nos grupos controle (GC), concentração de 30 $\mu$ g (T1) e concentração de 100 $\mu$ g (T2) ao longo do tempo do estudo.

Camada Parabasal				
	Controle	30 $\mu$ g	100 $\mu$ g	P
mAgNOR	1,944( $\pm$ 0,211)	1,862( $\pm$ 0,161)	1,816( $\pm$ 0,089)	0,24
pAgNOR $>$ 1	63,6 ( $\pm$ 8,68)	58 ( $\pm$ 9,93)	58 ( $\pm$ 5,29)	0,24
pAgNOR $>$ 2	23,4 ( $\pm$ 10,33)	19,6 ( $\pm$ 7,41)	21,11 ( $\pm$ 5,20)	0,57
pAgNOR $>$ 3	4,8 ( $\pm$ 3,55)	5,8 ( $\pm$ 5,11)	2,88 ( $\pm$ 2,02)	0,26
pAgNOR $>$ 4	0,2 ( $\pm$ 0,63)	0,6 ( $\pm$ 0,96)	0,22 ( $\pm$ 0,66)	0,43

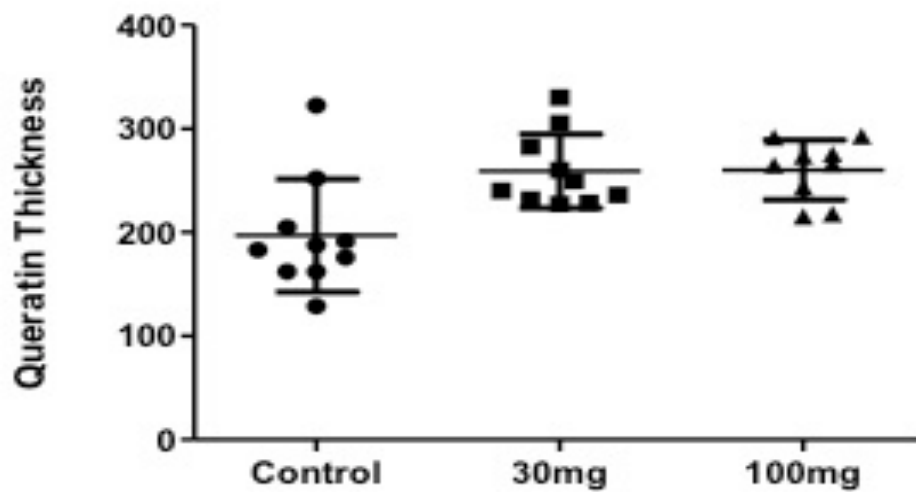
Na avaliação da porcentagem de linfócito marcados positivamente pelo CD18 também não encontramos variações estatisticamente significantes entre os grupos controle e teste (Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Distribuição das médias e desvios-padrão da porcentagem de linfócitos positivos, nos grupos controle (GC), concentração de 30 $\mu$ g (T1) e concentração de 100 $\mu$ g (T2) .

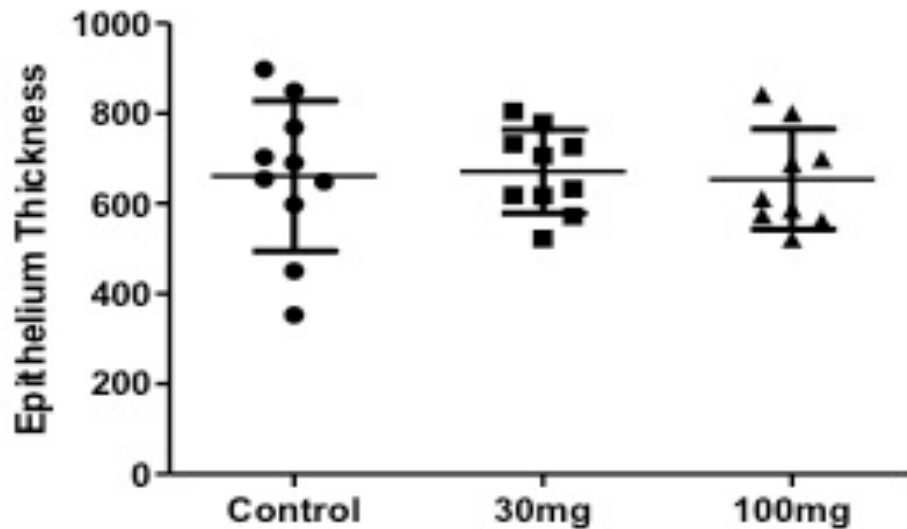


Quando avaliamos a espessura epitelial pela técnica de HE observamos diferença estatisticamente significante ( $P=0,0027$ ) na camada de queratina, onde o grupo controle apresentou a espessura da camada de queratina menor em relação aos grupos testados (Gráfico 2). O mesmo resultado não foi encontrado no epitélio, onde não foram observadas diferenças, estatisticamente significantes, entre o grupo controle e os grupos teste (Gráfico 3).

**Gráfico 2.** Distribuição das médias e desvios-padrão da espessura da camada de queratina, em pixels, nos grupos controle (GC), concentração de 30 $\mu\text{g}$  (T1) e concentração de 100 $\mu\text{g}$  (T2).



**Gráfico 3.** Distribuição das médias e desvios-padrão da espessura da camada epitelial, em pixels, nos grupos controle (GC), concentração de 30 $\mu$ g (T1) e concentração de 100 $\mu$ g (T2).



## DISCUSSÃO

A budesonida, classificada como um esteroide glicocorticoide de uso nasal e oral é muito utilizada em pacientes alérgicos como, por exemplo, os portadores de asma e rinite não infecciosa. Sua ação sobre a mucosa bucal ainda não foi discutida na literatura; pois, a maioria dos trabalhos publicados, se detem, principalmente, no estudo dos efeitos dos glicocorticoides sobre os epitélios respiratórios.<sup>14-16</sup>

Segundo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que visa avaliar as características do tecido epitelial e do mesênquima expostos a este glicocorticoide em diferentes concentrações, utilizando para esta finalidade três técnicas sensíveis: a histoquímica, pelo método de coloração pela prata das regiões organizadoras nucleolares (AgNORs), que tem sido utilizada por muito tempo para investigar padrões de proliferação celular em pacientes expostos a algum tipo de fator

irritante;<sup>17</sup> a imuno-histoquímica, um eficiente meio de identificação de várias estruturas celulares e teciduais que possibilita a combinação de um marcador com um anticorpo, sem provocar danos à ligação específica estabelecida entre antígeno-anticorpo<sup>18</sup> e a histometria, ferramenta de grande precisão no estabelecimento de medidas confiáveis de estruturas, com aplicação no estudo de alterações patológicas baseadas no grau de alteração tecidual.<sup>19</sup>

Procurou-se, neste estudo, avaliar as diferentes características do tecido epitelial dentre elas: espessura, proliferação do tecido epitelial bem como as características do mesênquima quanto à população de células inflamatórias em diferentes grupos experimentais. A partir dos resultados obtidos, notou-se que a espessura da camada de queratina da mucosa palatina foi maior nos ratos submetidos ao tratamento com o glucorticoide inalatório nas concentrações testadas, quando comparado ao grupo controle. Quando analisaram-se os grupos testes, entre si, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre eles, nos permitindo aferir que a concentração da medicação não influenciou na alteração da espessura da camada de queratina. O nosso achado é corroborado pelos resultados encontrados pelo estudo de Gualerzi et al,<sup>19</sup> os quais, após avaliarem a resposta da mucosa oral frente a agentes irritantes, no caso o cigarro, encontraram um aumento da atividade dos queratinócitos da camada basal, após o contato do tecido com o agente irritante.

Acredita-se que tais constatações histológicas, observadas por este estudo, poderiam representar respostas epiteliais à agentes nocivos, neste caso o glicocorticoide inalatório, o qual iria desencadear o aumento na produção de queratina, pelos queratinócitos localizados na camada basal e parabasal do epitélio levando a um aumento da espessura desta camada epitelial. No entanto, não

encontramos diferença estatísticas na espessura da camada do epitélio, excluindo a camada de queratina. Tal resultado pode ser explicado pelo fato do aumento da camada de queratina não permitir que a droga inalada irrite, em profundidade, as camadas basais e parabasais do epitélio, portanto não aumentando o ritmo de proliferação celular. Somado a este fato, podemos inferir que o período 14 dias possa ter sido insuficiente para identificarmos alterações na proliferação celular, conforme os achados observados no trabalho de Carrard et al.<sup>20</sup> que mostram que, o efeito do álcool, aumentando a proliferação da camada parabasal, foi constatado após 12 meses de ingestão contínua do mesmo.

Por outro lado, os estudos, quando avaliam a espessura do epitélio, não segmentam a aferição das camadas, concluindo que o epitélio apresenta um espessura maior como um todo, o que, normalmente, se dá às custas do aumento de espessura da camada de queratina. Esta constatação pode ser observada através do estudo realizado por Hirabayachi et al.<sup>21</sup>, os quais compararam a espessura da mucosa laríngea de pacientes não tabagistas/ não etilistas com as de tabagistas que faziam ingestão de bebida alcólica e observaram que a espessura do epitélio da região supraglótica dos pacientes tabagistas e etilistas estava significativamente aumentada, confirmando a formação de um epitélio de proteção contra o agente agressor.

A ausência de diferença estatística na espessura do epitélio, excluindo a camada protetora do mesmo, é confirmada quando avaliamos os resultados da contagem de AgNORs por núcleo, nas camadas basais e parabasais, onde não foram encontradas diferenças, estatisticamente significantes, nos grupos estudados em relação à proliferação do tecido epitelial. Resultados estes, distintos dos obtidos por Semenzati et al.<sup>22</sup> em seu estudo em ratos, onde os autores concluíram que a

exposição dos animais à fumaça do cigarro, por 60 dias, resultou em lesões benignas, como hiperplasia epitelial, espessamento da camada de queratina e leve displasia. Tal resultado em nosso estudo pode ser explicado, tanto pelo tempo de exposição durante o dia e o número de dias que os animais foram expostos à medicação, como também por ser a Budesonida, um corticoide inalatório, incapaz de gerar agressão ao epitélio suficiente para modificar o padrão de proliferação celular identificável pelo método da contagem de AgNORs. Quando foram avaliadas as características do mesênquima, quanto à população de células inflamatórias, no caso linfócitos marcados positivamente pelo CD18, não encontramos variações, estatisticamente significativas, entre os grupos controle e teste. Questiona-se que este resultado mostrasse resultados diferentes se houvesse algum tipo de lesão na mucosa do palato que pudesse gerar alteração na migração de células inflamatórias para o local alterando a população de leucócitos residentes. Por outro lado, este achado reforça que o espessamento da camada de queratina aumenta a proteção dos tecidos impedindo a proliferação das camadas basais e parabasais do epitélio e não alterando a população de células inflamatórias.

Com este estudo pode-se concluir que a inalação de glicocorticoide possui efeito sobre a fibromucosa palatina, observada pelo espessamento da camada de queratina e que esta resposta resulta em nenhuma ação danosa às estruturas da fibromucosa bucal.

## REFERÊNCIAS

1. Goodman IS, Gilman AG. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007.



2. Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T. A comparative study of the effects of an inhaled corticosteroid, budesonide, and a beta 2-agonist, terbutaline, on airway inflammation in newly diagnosed asthma: a randomized, double-blind, parallel-group controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 32-42.
3. Van Hal PT, Overbeek SE, Hoogsteden HC, Zijlstra FJ, Murphy K, Oosterhoff Y, et al. Eicosanoids and lipocortin-1 in BAL fluid in asthma: effects of smoking and inhaled glucocorticoids. *J Appl Physiol* (1985) 1996; 81: 548-55.
4. III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. *J Pneumol* 2002; 28: 1-28.
5. World Health Organization. Chronic respiratory diseases, 2008. Geneva: WHO, 2008.
6. Noonan M, Chervinsky P, Busse WW, Weisberg SC, Pinnas J, de Boisblanc BP, et al. Fluticasone propionate reduces oral prednisolone use while it improves asthma control and quality of life. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1467-73.
7. Sarinho E. Budesonida inalatória em asma aguda: uma questão de tempo e espaço? *J Pediatr* 2004; 80: 88-9.
8. Derendorf H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of inhaled ciclesonide. *J Clin Pharmacol* 2007; 47: 782-9.
9. O'Byrne PM. Therapeutic strategies to reduce asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 257-63.
10. Akpınar ME, Tekke NS, Yigit O, Ercan F, Durna Y, Kiran D. Histological effects of inhaled corticosteroids and  $\beta$ 2-agonist on laryngeal mucosa in an allergic rat model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2013; 149: 457-65.
11. Daudt LD, Cavagni J, Gaio EJ, Souza A, Torres IL, Ferreira MB, et al. Effect of inhaled corticosteroid on TNF- $\alpha$  production and alveolar bone loss in Wistar rats. *Arch Oral Biol* 2011; 56: 1398-403.

12. Elías PC, Sagua D, Alvarez EO. Chronic aerial exposure to glucocorticoids or beta-agonists affects avoidance learning and exploratory motivation in rats. *Behav Brain Res* 2004; 149: 95-105.
13. Crocker J, Boldy DA, Egan MJ. How should we cont Ag NORs? Proposal for a standardized approach. *J Pathol* 1989; 158: 185-8.
14. Vignola AM, Chiappara G, Siena L, Bruno A, Gagliardo R, Merendino AM, et al. Proliferation and activation of bronchial epithelial cells in corticosteroid-dependent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 738-46.
15. Mastruzzo C, Greco LR, Nakano K, Nakano A, Palermo F, Pistorio MP, et al. Impact of intranasal budesonide on immune inflammatory responses and epithelial remodeling in chronic upper airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 37-44.
16. Cançado RP, Yurgel LS, Filho MS. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Oral Oncol* 2001; 37: 446-54.
17. Kumar G, Rudbeck L, ed. *Immunohistochemical staining methods*. 5th ed. Carpinteria: Dako, 2009.
18. Brito LA, Hinsching C, Araújo EG, Damasceno AD, Vieira RC. Uso da técnica de histometria para graduação da lesão renal de nefrite intersticial em suínos abatidos em frigoríficos industriais. *Cienc Animal Bras* 2005; 6: 261-5.
19. Gualerzi A, Sciarabba M, Tartaglia G, Sforza C, Donetti E. Acute effects of cigarette smoke on three-dimensional cultures of normal human oral mucosa. *Inhal Toxicol* 2012; 24: 382-9.

20. Carrard VC, Filho MS, Rados PV, Chaves AC, Lauxen Ida S. Quantification of silver-staining Nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of alcohol. *Alcohol* 2004; 34: 233-8.
21. Hirabayashi H, Koshii K, Uno K, Ohgaki H, Nakasone Y, Fujisawa T, et al. Laryngeal epithelial changes on effects of smoking and drinking. *Auris Nasus Larynx* 1990; 17: 105-14.
22. Semenzati GO, Salgado BS, Rocha NS, Matheus SMM, Carvalho LR, Garcia Martins RH. Histological and immunohistochemical study of the expression of p53 and ki-67 proteins in the mucosa of the tongue, pharynx and larynx of rats exposed to cigarette smoke. *Inhal Toxicol* 2012; 24: 723-31.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o diagnóstico de lesões bucais muitos são os sinais e sintomas aos quais o profissional, assistente, precisa estar atento. A história pregressa, o tempo de evolução, as características da lesão e o uso de medicações são ferramentas importantes no processo de diagnóstico.

Muitas vezes nos deparamos com lesões que desafiam o conhecimento prévio e dificultam o estabelecimento de um diagnóstico presuntivo, principalmente por não encontrarmos relação de causa e efeito. Baseado nisto, este trabalho se propôs a estudar, de forma inicial, os efeitos dos corticoides inalatórios sobre a fibromucosa bucal, tendo em vista que muitos pacientes, principalmente jovens, fazem uso destas drogas para tratamento e prevenção de doenças inflamatórias crônicas como, por exemplo, a asma.

Para o estabelecimento da metodologia de estudo, optamos por avaliar o epitélio através da aferição de sua espessura, por acreditar que este é um bom parâmetro para observarmos a resposta clínica inicial do epitélio frente a agentes agressores.

Para avaliarmos a proliferação celular utilizamos o a técnica de impregnação por prata das regiões organizadoras nucleolares (AgNORs), metodologia bem estabelecida na literatura e no desenvolvimento desta linha de pesquisa pelo nosso grupo do estudo.

No estudo das células inflamatórias foi utilizado um marcador de membrana de leucócitos (CD18), com o intuito de verificarmos se a passagem do corticoide pelo epitélio bucal traria alguma alteração inflamatória no mesênquima desta fibromucosa.

Acreditamos que a associação destas três técnicas nos permitiu observar que a formação de um epitélio protetor, às custas do espessamento da camada de queratina, possa ter impedido a interferência do corticoide na proliferação do tecido epitelial e, pelo mesmo motivo, não observamos alteração na presença de células inflamatórias residentes no tecido conjuntivo da fibromucosa palatina.

Sugerimos, prosseguir com este estudo, aumentando o tempo, em dias, de exposição dos animais ao corticoide e acrescentando uma análise intermediária

entre o tempo inicial e final. Para uma melhor avaliação do efeito do corticoide inalatório sobre as células inflamatórias, sugerimos a indução de uma lesão local, que altere a presença destas células na fibromucosa palatina.

## REFERÊNCIAS

1. O'Byrne PM, Bisgaard H, Godard PP, Pistolesi M, Palmqvist M, Zhu Y, et al. Budesonide/formoterol combination therapy as both maintenance and reliever medication in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jan;171(2):129-36.
2. World Health Organization. Chronic respiratory diseases, 2008. Geneve: WHO; 2008.
3. Fuchs FD, Wanmacher L, Ferreira MB. Farmacologia clínica. Fundamentos da terapêutica racional. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
4. Damiani D, Kuperman H, Dichtchekian V, Della Manna T, Setian N. Corticoterapia e suas repercussões: a relação custo-benefício. *Pediatria (São Paulo)*. 2001;1:71-82.
5. Bavaresco I, Bernardi A, Bastastini AM. Glicocorticoides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. *Infarma*. 2005;17(7/9):58-60.
6. Goodman IS, Gilman AG. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2007.
7. O'Byrne PM. Therapeutic strategies to reduce asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Aug;128(2):257-63.
8. Franchimont D, Galon J, Gadina M, Visconti R, Zhou Y, Aringer M, et al. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *J Immunol*. 2000 Feb;164(4):1768-74.
9. Maneechotesuwan K, Yao X, Ito K, Jazrawi E, Usmani OS, Adcock IM, et al. Suppression of GATA-3 nuclear import and phosphorylation: a novel mechanism of corticosteroid action in allergic disease. *PLoS Med*. 2009 May;6(5):e1000076.
10. Anderson R, Franch A, Castell M, Perez-Cano FJ, Bräuer R, Pohlert D, et al. Liposomal encapsulation enhances and prolongs the anti-inflammatory effects of water-soluble dexamethasone phosphate in experimental adjuvant arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):R147.
11. Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. Asthma. *Lancet*. 2002 Oct;360(9342):1313-22.
12. Wang JJ, Rochtchina E, Tan AG, Cumming RG, Leeder SR, Mitchell P. Use of inhaled and oral corticosteroids and the long-term risk of cataract. *Ophthalmology*. 2009 Apr;116(4):652-7.

13. Garbe E, Suissa S, LeLorier J. Association of inhaled corticosteroid use with cataract extraction in elderly patients. *JAMA*. 1998 Aug;280(6):539-43.
14. Wong CA, Walsh LJ, Smith CJ, Wisniewski AF, Lewis SA, Hubbard R, et al. Inhaled corticosteroid use and bone-mineral density in patients with asthma. *Lancet*. 2000 Apr;355(9213):1399-403.
15. Walsh LJ, Lewis SA, Wong CA, Cooper S, Osborne J, Cawte SA, et al. The impact of oral corticosteroid use on bone mineral density and vertebral fracture. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Sep;166(5):691-5.
16. Akpınar ME, Tekke NS, Yigit O, Ercan F, Durna Y, Kiran D. Histological effects of inhaled corticosteroids and  $\beta_2$ -agonist on laryngeal mucosa in an allergic rat model. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013 Sep;149(3):457-65.
17. Ivanova JI, Birnbaum HG, Hsieh M, Yu AP, Seal B, van der Molen T, et al. Adherence to inhaled corticosteroid use and local adverse events in persistent asthma. *Am J Manag Care*. 2008 Dec;14(12):801-9.
18. Molimard M, Le Gros V, Robinson P, Bourdeix I. Prevalence and associated factors of oropharyngeal side effects in users of inhaled corticosteroids in a real-life setting. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2010 Apr;23(2):91-5.
19. Pinto CR, Almeida NR, Marques TS, Yamamura LL, Costa LA, Souza-Machado A. Eventos adversos locais associados ao uso de corticoides inalatórios em pacientes com asma moderada ou grave. *J Bras Pneumol*. 2013 Jun-Ago;20(4):409-17.
20. Vignola AM, Chiappara G, Siena L, Bruno A, Gagliardo R, Merendino AM, et al. Proliferation and activation of bronchial epithelial cells in corticosteroid-dependent asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Nov;108(5):738-46.
21. Maito FL, Rados PV, Filho MS, Barbachan JJ, Quadros O. Proliferating cell nuclear antigen expression on tongue of mice after intake of, or topical exposure to, alcohol. *Alcohol*. 2003 Aug-Oct;31(1-2):25-30.
22. Carrard VC, Filho MS, Rados PV, Chaves AC, Lauxen Ida S. Quantification of silver-staining Nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of alcohol. *Alcohol*. 2004 Oct-Nov;34(2-3):233-8.
23. Gualerzi A, Sciarabba M, Tartaglia G, Sforza C, Donetti E. Acute effects of cigarette smoke on three-dimensional cultures of normal human oral mucosa. *Inhal Toxicol*. 2012 May;24(6):382-9.

24. Semenzati GO, Salgado BS, Rocha NS, Matheus SMM, Carvalho LR, Martins RHG. Histological and immunohistochemical study of the expression of p53 and ki-67 proteins in the mucosa of the tongue, pharynx and larynx of rats exposed to cigarette smoke. *Inhal Toxicol.* 2012 Sep;24(11):723-31.
25. Brito LA, Hinsching C, Araújo EG, Damasceno AD, Vieira RC. Uso da técnica de histometria para graduação da lesão renal de nefrite intersticial em suínos abatidos em frigoríficos industriais. *Cienc Animal Bras.* 2005 Out-Dez;6(4):261-5.
26. Goodpasture C, Bloom SE. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma.* 1975;53:37-50.
27. Derenzini M, Ploton D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int Rev Exp Pathol.* 1991;32:149-92.
28. Trerè D. AgNOR staining and quantification. *Micron.* 2000 Apr;31(2):127-31.
29. Derenzini M, Trerè D, Pession A, Montanaro L, Sirri V, Ochs RL. Nucleolar function and size in cancer cells. *Am J Pathol.* 1998 May;152(5):1291-7.
30. Derenzini M. The AgNORs. *Micron.* 2000 Apr;31(2):117-20.
31. Derenzini M, Trerè D, Pession A, Govoni M, Sirri V, Chieco P. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *J Pathol.* 2000 Jun;191(2):181-6.
32. Cançado RP, Yurgel LS, Filho MS. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Oral Oncol.* 2001 Jul;37(5):446-54.
33. Gedoz L, Lauxen Ida S, Sant'Ana MF, Rados PV. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the AgNOR staining technique. *Anal Quant Cytol Histol.* 2007 Aug;29(4):231-8.
34. Oliveira MG, Lauxen IS, Martins Neto M, Rados PV, Jaeger F, Kaizer MR, et al. Tongue squamous cell carcinoma: relationship between argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORS) and histopathologic grading. *Applied Cancer Research.* 2005; 25(1):20-4.
35. Romão-Corrêa RF, Maria DA, Soma M, Sotto MN, Sanches JA Jr, Neto CF, et al. Nucleolar organizer region staining patterns in paraffin embedded tissue cells from human skin cancers. *J Cutan Pathol.* 2005 May;32(5):323-8.



36. Polak JM, Van Noorden S. Introduction to immunocytochemistry. 3rd ed. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 2003.
37. Hsiao KC, Bajorath J, Harris LJ. Humanization of 60.3, an anti-CD18 antibody; importance of the L2 loop. *Protein Eng.* 1994 Jun;7(6):815-22.

**APÊNDICE A - TÉCNICA DE COLORAÇÃO PELA HEMATOXILINA-EOSINA**

- Xilol: 10 minutos
- Xilol: 10 minutos
- Álcool absoluto: 5 minutos
- Álcool absoluto: 5 minutos
- Água destilada: 1 minuto Hematoxilina de Harris: 5 minutos Água: 3 lavagens
- Eosina: 1 minuto
- Álcool: 1 minuto
- Álcool: 1 minuto
- Álcool: 1 minuto
- Xilol: 10 minutos
- Xilol: 10 minutos
- Montagem em Entellan®

**APÊNDICE B - TÉCNICA DE IMUNUHISTOQUÍMICA**

- Xilol 15' e 10'; Álcool 2x5'; H<sub>2</sub>O; PBS;
- Bloqueio da peroxidase endógena 2x15' no escuro;  
3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em metanol
- PBS 2x2';
- Recuperação antigênica: na panela de pressão: sp1: 3:30' a 115 °C sp2: 0,30' a 95 °C;  
solução pH=6,0 1:10 EDTA
- PBS 2x2';
- Anticorpo primário CD18 1:100, *overnight* na geladeira;
- PBS 2x2';
- Anticorpo secundário Envision 30 °C na estufa por um turno;
- PBS 2x2';
- DAB 0,5ml + 1gota = Vortex;
- H<sub>2</sub>O;
- Hematoxilina só passagem;
- Álcool 2x5';
- Xilol 2x10';
- Montagem.