

**DISTRIBUIÇÃO DOS MASTÓCITOS NAS FASES INTRA-ÓSSEA E
SUBMUCOSA NA ERUPÇÃO DENTÁRIA HUMANA**

Imunomarcção com ckit (CD117) e triptase

SOLANGE DE OLIVEIRA BRAGA FRANZOLIN

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor no Programa de Fisiopatologia em Clínica Médica, Área de Concentração: Fisiopatologia em Clínica Médica.

BOTUCATU

2009

**DISTRIBUIÇÃO DOS MASTÓCITOS NAS FASES INTRA-ÓSSEA E
SUBMUCOSA NA ERUPÇÃO DENTÁRIA HUMANA**

Imunomarcção com ckit (CD117) e triptase

SOLANGE DE OLIVEIRA BRAGA FRANZOLIN

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor no Programa de Fisiopatologia em Clínica Médica, Área de Concentração: Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Inês M. C. Pardini

Colaborador: Prof. Dr. Alberto Consolaro

BOTUCATU

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Franzolin, Solange de Oliveira Braga.

Distribuição dos mastócitos nas fases intra-óssea e submucosa na erupção dentária humana: imunomarcção com ckit (Cd117) e triptase / Solange de Oliveira Braga Franzolin. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientadora: Maria Inês M. C. Pardini

Assunto CAPES: 40203000

1. Dentes - Genética 2. Erupção dentária 3. Dentição permanente

CDD 616.31

Palavras chave: Erupção dentária; Folículo pericoronário; Mastócito; Odontogênese

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

Assinatura:

Botucatu, fevereiro de 2009

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, USC.

Protocolo: 08/06

Data: 16/02/2006

SOLANGE DE OLIVERIA BRAGA FRANZOLIN

Data e local de nascimento: 07 de abril de 1956
Avai – São Paulo

Filiação: Luiz Braga
Luzia Terezinha de Oliveira Braga

1975-1978 Curso de graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo - USP

1979-1980 Especialização em Odontologia, área de Odontopediatria, pela Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo - USP

1999 - 2003 Mestrado em Odontologia, área de Saúde Coletiva pela Faculdade de Odontologia da Universidade Sagrado Coração - USC

2000-2004 Mestrado no Programa de Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica, pela Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista - UNESP

DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais, Luiz e Luzia, in memorian,
por terem me transmitido tão bem o amor a Deus, o respeito ao próximo e os valores da vida,
junto a meus queridos irmãos Érico e Lavínia.*

*Ao meu querido marido Admir,
pela sua dedicação, companheirismo, compreensão, paciência e amor.*

*Aos meus filhos Luciana, Angela e Luiz Augusto,
por vocês terem sido o motivo maior de meu trabalho e do meu desejo de lhes dar um bom exemplo
e hoje, vocês me presenteiam com os melhores exemplos.*

*À Ana Carolina, minha querida sobrinha,
pela tradução realizada, com tanta presteza e eficiência.*

*À minha querida família,
Sr. Alcides (in memorian), D. Elza,
Érico, Sônia, e Eriquinho,
Lavínia, José Carlos, Bruna, Dante, Luiz Henrique e
Marina, pelo amor que recebo de vocês.*

*À tia Íris, Prof^ª Dr^ª Íris Ferrari,
pelo exemplo que sempre foi para mim, de dedicação, determinação, amor e respeito ao próximo.*

SINCEROS AGRADECIMENTOS

*À Prof^ª. Dr^ª. Maria Inês Campos Moura Pardini,
mais uma vez agradeço por permitir e estimular meu crescimento, tratando-me sempre com afeição,
respeito e interesse real em transmitir conhecimentos. Espero que eu tenha cumprido meu trabalho, sem
decepcioná-la. Para mim foi uma honra tê-la como orientadora.*

*Ao Prof. Dr. Alberto Consolaro,
que aprendi o significado de ser “Fora de Série”, e agora eu tenho que admitir, o senhor é um “Fora de
Série”. Sua participação nesta minha jornada foi fundamental, vi seu compromisso com a ciência e com
a verdade. Agradeço a amizade carinhosa que recebo de você e da querida Maria Fernanda.*

*À Prof^ª. Dr^ª. Elenice Deffune,
que admiro pela capacidade de amar, e este amor aumentar a cada filho que nasce em seu coração;
pela cientista e médica entusiasta, cheia de energia e de luz.*

*Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado
pelo modelo de profissional que o senhor é para todos nós, por ter me recebido como sua aluna
no início de minha caminhada no Doutorado.*

*Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani,
por ter me ensinado a adorar a Estatística, pela gentileza em sempre me receber e por todos os
conhecimentos que me transmitiu.*

*Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Francischone,
por saber que posso contar com o senhor, pelo carinho, estímulo e apoio que sempre recebi.*

*À Prof^ª. Dr^ª. Rosana Rossi Ferreira,
pela amizade, disponibilidade e eficiência em todos os momentos que prescindi.*

*Aos Professores da Clínica Médica,
agradeço em nome da Prof^ª. Dr^ª. Célia Regina Nogueira e Prof. Dr. Luiz Shiguero Matsubara,
por receber-me como aluna e pelos ensinamentos que levarei daqui.*

*Ao Dr. Hilton Coimbra Borgo e sua esposa Célia,
por terem aceitado prontamente e carinhosamente meu convite.*

*À Prof^ª. Dr^ª. Claudia de Almeida Prado Piccino Sgavioli,
Prof^ª. Dr^ª. Maria Cecília Veronese,
Prof^ª. Dr^ª. Elaine Rodini e Dr^ª. Camila Rodini
pela amizade e ajuda carinhosa.*

Ao Laboratório de Consultoria em Patologia Bacchi, em nome do Dr. Carlos E. Bacchi e Prof. Dr. Alberto Consolaro, pela qualidade dos serviços prestados.

Aos amigos da Secretaria da Pós Graduação: Janete, Regina, Sr. Nathanael, Lilian e Andréa pela dedicação, eficiência, empenho e carinho de vocês, tudo se tornou mais fácil. “Vocês são especiais”.

Não sei como agradecê-los por tantas gentilezas.

*À Ana Mengue,
pela sua presteza, eficiência e dedicação com que secretaria a Clínica Médica.*

*À Cléo, pelo jeito tão especial de você me chamar de “Sol”;
Janice, pela meiguice e a todos os funcionários do Hemocentro
pelas gentilezas prestadas; aqui me sinto em “casa”.*

*Às minhas colegas do Mestrado, Doutorado e do Hemocentro:
Adriana, Kamila, Karla, Marjorie, Patrícia, Rejane, Renata...
por terem se tornado minhas amigas.*

*À Selma, em nome do serviço de Biblioteca da Faculdade de Medicina de Botucatu,
pelos serviços recebidos.*

*À Maria Cristina Carrara Felipe, Fátima Aparecida Silveira, Melaine de Almeida Lawall,
amigas da FOB, pelo carinho, ajuda e amizade que recebi de vocês.*

*À Ana Amélia e Marcus
da “Papel e Arte” pelos serviços precisos de impressão, feitos com tanto esmero e competência.*

*Ao Dr. Luis Francisco Thomazini Neves, Dr^a. Olga Maria Lourenço Dias,
Daniela R. Arruda e Karla E. Rosseto Martins,
pelo convívio afetivo, apoio e incentivo que recebo de vocês no nosso DAE.*

*À Alessandra e Valéria,
pela dedicação em meu consultório, sempre gentis e prontas a me ajudar.*

*À Maria Aparecida “Nenê” e Maria Nadir,
por me substituírem tão bem, quando estou ausente de minha casa, com dedicação à minha família.*

*Às amigas de sempre:
Graziela, pela parceria e amizade sincera nas jornadas da Pós Graduação;*

*Leda e Sara,
só aqui colocadas em ordem alfabética, mas vocês sempre estarão de mãos dadas comigo e em meu coração. Sei que vocês torcem por mim e eu por vocês. Muito obrigada por tudo.*

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
I INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	1
II OBJETIVOS.....	8
III MATERIAL E MÉTODOS.....	10
A Casuística.....	11
B Critério de inclusão.....	11
C Característica da amostra e localização dos tecidos.....	12
D Análise microscópica.....	14
E Análise imunocitoquímica.....	15
F Análise estatística.....	15
IV RESULTADOS.....	17
A Análise microscópica descritiva em HE.....	18
B Análise descritiva dos achados imunocitoquímicos.....	25
C Análise quantitativa e comparativa dos mastócitos imunomarcados nos três grupos.....	34
V DISCUSSÃO.....	36
VI CONCLUSÕES.....	42
ANEXOS.....	44
REFERÊNCIAS.....	54

RESUMO

A erupção dos dentes decíduos e permanentes é um processo fisiológico que acompanha o desenvolvimento do ser humano por aproximadamente duas décadas. Vários mecanismos biológicos controlam a odontogênese, erupção e esfoliação fisiológica dos decíduos até o estabelecimento dos dentes permanentes na arcada. A fim de elucidar aspectos anatômicos e fisiológicos relacionados à erupção dentária, sua sintomatologia e outros sinais clínicos, decidiu-se investigar a presença de mastócito nos tecidos pericoronários na fase intra-óssea (Grupo 1) e submucosa (Grupo 2), comparando-os entre si e com a mucosa bucal (Grupo3). Em cada grupo, 14 espécimes foram analisados microscopicamente em cortes corados com hematoxilina e eosina e imunocitoquimicamente marcados com ckit e triptase. A partir dos resultados obtidos concluiu-se que a quantidade/densidade dos mastócitos é diferente nos tecidos foliculares de acordo com a fase de erupção ($P < 0,05$). Na fase intra-óssea da erupção, os tecidos conjuntivos foliculares não revelam pela imunocitoquimicamente uma marcante presença de mastócitos. Na fase submucosa, o número de mastócitos está significativamente elevado quando comparado com a fase intra-óssea da erupção dentária ($P < 0,05$). Nos tecidos conjuntivos foliculares, na fase submucosa de erupção, os mastócitos aumentam sua concentração quando comparados à quantidade/densidade detectada na submucosa da mucosa bucal normal não relacionada aos dentes ($P < 0,05$).

Palavras Chave: erupção dentária, folículo pericoronário, mastócito, odontogênese.

ABSTRACT

The eruption of deciduous and permanent teeth is a physiologic process that takes place during approximately two decades of human development. Several biological mechanisms control odontogenesis, eruption and physiological exfoliation of deciduous leading to the establishment of permanent teeth in the jaw. With the aim to investigate anatomical and physiological aspects related to eruption of tooth, symptoms and other clinical sign, it has been decided to investigate the presence of mastocytes in the pericorony tissue in the intra-osteo (group 1) and submucous (group 2), inter comparing them and with the oral mucous (Group 3). In each group, 14 samples were microscopically analysed in slides stained with hematoxylin and eosin immunocytochemistry marked with ckit and triptase. Results showed that the quantity/density of mastocytes is different in the follicular tissues according to the eruption stage ($P<0.05$). Intra osteo stage of eruption, follicular conjunctive tissues have not shown immunocytochemistry marker for mastocyte. Follicular conjunctive tissues, in the follicular conjunctive tissues, in submucous eruption stage, mastocytes concentration was increased when compared to quantity, density in the submucous from normal oral mucous non related to teeth ($P<0.05$).

Key words: tooth eruption, pericorony follicle, mastocyte, odontogenesis.

I INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

I. INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

Os movimentos eruptivos iniciam simultaneamente ao princípio da formação radicular, bem antes que os dentes sejam vistos na cavidade bucal. O surgimento do dente através da gengiva é apenas o primeiro sinal clínico da erupção. Após seu surgimento, os dentes irrompem em uma velocidade maior até alcançar o plano oclusal. Os movimentos que orientam a erupção dentária podem ser divididos em três fases: pré-eruptiva, fase eruptiva ou pré funcional, e a fase pós-eruptiva ou funcional¹.

O comando genético em cada fase da odontogênese regula a síntese de diferentes fatores de crescimento que regem a morfogênese e a cronologia de erupção dos dentes. Foi descoberto que muitas moléculas de sinalização potenciais são expressas durante o desenvolvimento dentário. A mais proeminente delas inclui o *sonic hedgehog* (SHH), os membros da família Wnt, o fator de crescimento do fibroblasto (FGF) e fator beta de crescimento modificado (TGF- β). O último também inclui as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), as quais, além de seu papel na formação dos dentes, são importantes reguladores do crescimento e da reparação óssea pós-natal. Essas moléculas sinalizadoras interagem com receptores específicos de membrana para estabelecer sinais intracelulares que resultam na expressão específica¹.

As superfícies dos tecidos dentários, durante sua formação, se encontram isoladas das células imunológicas de reconhecimento: o esmalte está recoberto pelo tecido epitelial que o sintetiza, agora constituindo o epitélio reduzido do órgão do esmalte cujas camadas são também formadas pelas células do estrato intermediário, retículo estrelado e epitélio interno do órgão do esmalte. Este epitélio é suportado pelo tecido conjuntivo, em forma de membrana, que o nutre por difusão. O conjunto recebe o nome de folículo pericoronário tem um papel importante na erupção dentária, pois sua remoção causa interrupção total do processo².

Com a formação radicular e a erupção dentária, o folículo ou saco dentário dá origem aos tecidos de suporte dos dentes: o cimento, o ligamento periodontal e o osso alveolar de

suporte. Em todos os estágios de desenvolvimento, os dentes são protegidos e estabilizados pelo folículo dentário¹.

Quando o germe dentário do permanente aparece pela primeira vez, ele está no mesmo folículo dentário que seu predecessor decíduo. Esta relação é mantida até que os dentes decíduos comecem a irromper a partir do que os germes dos dentes permanentes desenvolvem folículos próprios dentro de criptas separadas. Cada cripta tem uma abertura em seu teto através da qual o folículo dentário se estende de forma cordonal para se comunicar com a mucosa bucal. A extensão cordonal fibrosa do folículo dentário, que conecta o germe do dente permanente com a mucosa bucal, é chamada cordão gubernacular e se apresenta rica em remanescentes da lâmina dentária em forma de ilhotas e cordões epiteliais odontogênicos¹.

A reabsorção dentária fisiológica, ou seja, a rizólise dos dentes decíduos é um processo natural, que acontece quando da substituição destes pelos dentes permanentes. Inicia-se com a eliminação dos cementoblastos por apoptose³ expondo a superfície radicular mineralizada, seguida da instalação das BMUs (unidades osteorremodeladoras) que somente acontece em áreas mineralizadas desnudas. Apoptose está presente na fragmentação da lâmina dentária e da bainha epitelial de Hertwig, e também no desaparecimento do epitélio reduzido do órgão do esmalte, especialmente dos ameloblastos reduzidos⁸.

Portanto, a esfoliação dos dentes decíduos caracteriza-se pela perda gradativa e simultânea dos tecidos dentários mineralizados (cimento e dentina) e das estruturas não mineralizadas. Na câmara pulpar isto acontece com o desaparecimento dos odontoblastos resultando na reabsorção interna, frequente nesta dentição. Este processo coincide com o término da rizogênese; assim, o esgotamento das estruturas do dente decíduo está geneticamente programado e define o seu caráter temporário⁴. Já em 1955, Kronfeld e Boyle afirmaram que a erupção do dente permanente não funciona como um estímulo primário responsável pela reabsorção fisiológica, pois mesmo na sua ausência a rizólise acontece⁵.

A substituição da dentição decídua pela permanente é um fenômeno que apresenta importantes implicações clínicas em função das modificações morfológicas e funcionais ocorridas durante a rizólise. Radiograficamente é possível acompanhar a evolução da rizólise dos decíduos e a rizogênese dos permanentes, e a íntima relação que existe entre o folículo pericoronário do dente permanente e o dente decíduo. A presença do folículo pericoronário interfere diretamente na evolução do processo, acelerando-o e influenciando no direcionamento das reabsorções radiculares dos decíduos, visto que representa uma estrutura rica em mediadores^{6,7}.

O folículo pericoronário do germe do dente permanente contém maior concentração de mediadores químicos da osteoclasia e fatores de crescimento: prostaglandinas, fator de crescimento epidermal (EGF), interleucina 1 (IL-1), BMP-4, fator estimulante de colônia 1 (CSF-1), TGF- β , que determinam seu papel importante na reabsorção fisiológica, acelerando-a^{6,7,8}.

Os estudos *in vitro* e *in vivo* mostram a cascata de sinais moleculares, iniciando com EGF ou TGF- β 1 que ativa a produção de IL-1 α no retículo estrelado e o aumento concomitante dos seus receptores no folículo dentário. O EGF também aumenta a expressão gênica do TGF- β 1 nas células do retículo estrelado, participando na transição de IL-1 α nestas células. A IL-1 α por sua vez ativa CSF-1 no folículo dentário capaz de atuar no influxo de monócitos, os quais se diferenciam em clastos e iniciam a reabsorção óssea essencial para a erupção dentária^{2,10}.

A erupção do dente permanente e a reabsorção dentária fisiológica acontecem simultaneamente, devendo haver uma inter-relação de mecanismos e mediadores bioquímicos. A reabsorção fisiológica apresenta-se como um processo programado silencioso, sem danos para o organismo. No passado, o nascimento dos dentes decíduos foi erroneamente relacionado a muitos agravos à saúde, como perturbação do sono ou coceira na orelha ou na bochecha, gengivoestomatite herpética primária, tosse, crupe, bronquite, diarreia, febre, convulsões, e até a morte¹¹. A literatura mundial é vasta e contraditória. McDonald e Avery¹², em seu livro clássico

“Odontopediatria” concluíram que: “Como a erupção dos dentes é um processo fisiológico normal, não se justifica sua associação com febre e distúrbio sistêmicos. Febre ou infecções do trato respiratório durante este período devem ser consideradas coincidentes com o processo de erupção, mas não a ele relacionado. A inflamação dos tecidos gengivais antes do surgimento completo da coroa pode causar dor temporária, que desaparece em poucos dias”. McIntyre e McIntyre¹¹, depois de uma revisão histórica cuidadosa dos “problemas da erupção dos dentes” concluíram que atualmente são identificados e aceitos os seguintes sinais/sintomas relacionados a esta fase: irritabilidade, alteração do sono, inflamação gengival, salivação, diminuição do apetite, diarreia, úlceras intra-bucais, aumento de temperatura, necessidade de morder objetos, prurido e dor de ouvido.

Em 1986, Pierce et al.¹³ em estudo experimental com murinos, através de teste imunoistoquímico, observou acúmulo de imunoglobulina E (IgE) em ameloblastos durante a fase de maturação do esmalte, sugerindo ser consequência da exposição das proteínas da matriz do esmalte às células imunocompetentes no tecido conjuntivo extrafolicular. Desta forma, a reação de hipersensibilidade local poderia elucidar os sinais clínicos frequentemente observados durante a erupção dentária. Estes autores citaram os estudos microscópicos dos tecidos que circundam o dente em erupção mostrando acúmulo de células inflamatórias, principalmente linfócitos¹⁴ aumento de mastócito¹⁵ e ainda, a matriz do esmalte atuando como antigênica e quimiotática para mastócito, cuja ativação está intimamente ligada à IgE¹⁶.

Outros autores desenvolveram estudos histomorfológicos, bioquímicos, imunoistoquímicos dos tecidos envolvidos na formação dos dentes, investigando a rede vascular do epitélio bucal e do epitélio reduzido do órgão do esmalte durante a erupção dentária¹⁷; explorando fator de crescimento, proteínas e enzimas que aceleram ou retardam a erupção dentária¹⁸; observando a participação da apoptose na odontogênese: na lâmina dentária, na bainha epitelial de Hertwig e no epitélio reduzido do órgão do esmalte³; registrando o nível de citocinas inflamatórias: IL-1 β , IL-8 e TNF- α (fator de necrose tumoral) no fluido crevicular

gingival de dentes irrompendo¹⁹; comparando os tecidos moles que recobrem o dente com erupção normal com distúrbios de erupção²⁰. Alguns destes relatos¹²⁻¹⁵ despertam a atenção para que se questione e pesquise a participação de mastócitos na erupção dentária, apesar da metodologia utilizada.

Os mastócitos foram descritos pela primeira vez por Ehrlich, em 1877. Derivam de células pluripotenciais da medula óssea e iniciam sua diferenciação sob a influência do CSF e da IL-3. São células residentes no tecido conjuntivo, localizadas preferencialmente próximas aos vasos sanguíneos e nervos, mudam sua forma de acordo com a localização. O mastócito maduro é uma célula relativamente grande, fusiforme, poligonal ou oval, de 15 a 20µm (micrometros) com citoplasma levemente eosinofílico contendo grânulos no seu interior. O núcleo é basofílico, levemente excêntrico e relativamente grande, com quatro a sete micrometros de diâmetro e múltiplos agregados de cromatina²¹.

Após serem ativados, liberam seus grânulos ricos em mediadores químicos, como histamina, proteoglicanas, proteases, bFGF, NO (óxido nítrico), fosfatase ácida e citocinas, dentre elas os interferons (IFN), o TNF-α e as ILs, além de produtos derivados do ácido aracídico como as prostaglandinas e leucotrienes. Esta grande variedade de mediadores farmacológicos ativos desempenha papel importante tanto em reações de hipersensibilidade quanto em processos inflamatórios, diferindo em suas potencialidades e atividades biológicas. Portanto, os mastócitos podem influenciar significativamente respostas IgE dependentes ou independentes, estendendo seu potencial de células efetoras pró-inflamatórias para componentes reguladores do sistema imunológico, contribuindo, desta forma, para o desenvolvimento e amplificação de respostas inflamatórias específicas e inespecíficas^{21,22}.

Está presente em inúmeros tecidos: pele, pulmão, mucosa dos brônquios, nariz, adenóides, nódulos linfáticos, medula óssea, intestino, fígado, nervos periféricos, íris, coração²¹, sendo que nos tecidos bucais foi reconhecido na doença periodontal²³, na gengiva^{24,25}, e inflamação²⁶.

Os mastócitos humanos são caracterizados ainda pela presença de duas proteases neutras: quimase e triptase. Estas enzimas podem ser imunomarcadas. Outra maneira de se identificar os mastócitos é pela imunomarcação de receptores de superfície^{21, 22}.

A partir de Pierce et al.¹³, e conhecendo as características e propriedades dos mastócitos, pode-se questionar: os mastócitos estariam presentes no folículo pericoronário na fase intra-óssea da erupção dentária em distribuição e número semelhante às da mucosa bucal e dos folículos pericoronários em fase submucosa? As respostas destes questionamentos podem elucidar aspectos anatômicos e fisiológicos relacionados à erupção dentária e sua sintomatologia.

II OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Investigar a presença de mastócitos:

- 1) nos tecidos pericoronários na fase intra-óssea da erupção dentária humana;
- 2) nos tecidos pericoronários na fase submucosa da erupção dentária humana;
- 3) na mucosa bucal, não relacionada à erupção dentária humana.

III MATERIAL E MÉTODOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

A. Casuística

- **Grupo 1:** 14 espécimes cirúrgicos de pacientes com indicação de extração de dente não irrompido e intra-ósseo, três do gênero masculino e 11 do gênero feminino, de 15 a 21 anos, com idade mediana de 18 anos.
- **Grupo 2:** 14 espécimes cirúrgicos de pacientes com indicação de ulectomia, oito do gênero masculino e seis do gênero feminino, de seis a 19 anos, com idade mediana de oito anos.
- **Grupo 3:** 14 espécimes cirúrgicos de pacientes com indicação de remoção de hiperplasia fibrosa inflamatória, seis do gênero masculino e oito do gênero feminino, de 14 a 82 anos, com idade mediana de 56 anos.

B. Critérios de inclusão

- Pacientes saudáveis que frequentaram as Clínicas de Patologia, Cirurgia e Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia da Universidade do Sagrado Coração, Bauru, e da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.
 - Anamnese completa.
 - Pacientes apresentando boas condições bucais.
 - Termo de consentimento livre, esclarecido e assinado.
 - Obtenção do fragmento de tecido livre de contaminação.
- ✓ Atitudes do profissional:
- Medidas antissépticas.
 - Uso de equipamento de proteção individual: avental, gorro, máscara, óculos e luva cirúrgica estéril.

✓ Atitudes com o paciente:

- Limpeza extra e intra bucal: solução antisséptica iodada.
- Aplicação de anestésico tópico.
- Anestesia.

✓ Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da USC, Protocolo n° 08/06 em 16/02/2006.

C. Características da amostra e localização dos tecidos

Para cada caso foram registrados e tabulados os dados: identificação, gênero, idade, localização do tecido ou do dente envolvido (Anexo 1).

- **Grupo 1: Folículo pericoronário na fase intra-óssea de erupção**

Neste grupo, os pacientes apresentavam os terceiros molares intra-ósseos com indicação clínica e radiográfica de exodontia. Foi feita a osteotomia para se ter acesso ao dente, de acordo com a técnica cirúrgica. Assim, foi possível remover cuidadosamente o folículo pericoronário, antes da remoção do dente. As amostras foram selecionadas a partir do Serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Estomatologia da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP (Figura 1).



Figura 1. Aspecto radiográfico do qual foi obtido um espécime cirúrgico do Grupo 1, constituído por folículo pericoronário de dente na fase intra-óssea de erupção.

▪ **Grupo 2. Folículo pericoronário na fase submucosa de erupção**

Os pacientes apresentavam indicação de ulectomia (remoção do tecido epitélio bucal do dente em questão, para permitir o irrompimento deste na cavidade bucal). Assim, foi removido o tecido gengival e parte do epitélio do folículo pericoronário, de acordo com a técnica cirúrgica (Figuras 2 e 3).

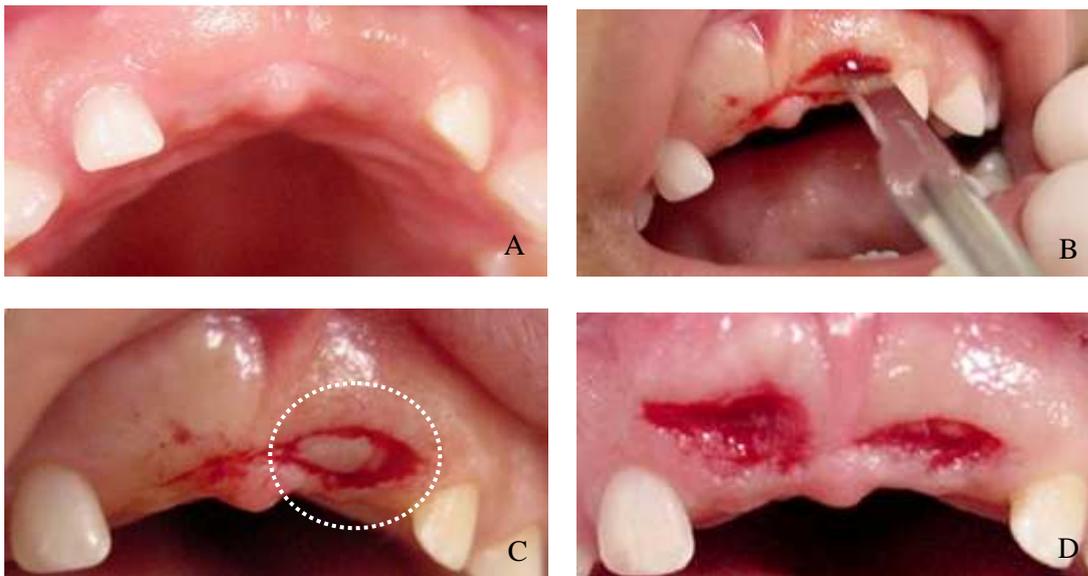


Figura 2. Obtenção de espécies para compor o Grupo 2, de folículos pericoronários de dentes em erupção na fase submucosa. Aspecto clínico (A), incisão na mucosa correspondente ao incisivo central permanente superior esquerdo (B). Destaca-se na ulectomia o fragmento elíptico (em C; círculo) e o leito cirúrgico resultante correspondente às ulectomias (D).



Figura 3. Aspecto clínico normal do dente e gengiva do paciente no qual foi obtido dois espécimes como foi apresentado na Figura 2, após 28 dias.

Grupo 3. Mucosa bucal

Pacientes que apresentavam indicação de remoção cirúrgica de hiperplasia fibrosa inflamatória. As margens desta peça apresentam mucosa bucal sem alterações, isto é, tecido sadio.

D. Análise microscópica

1. Procedimentos laboratoriais

Durante a cirurgia, as amostras de tecido dos três grupos foram estendidas sobre papel cartão, com o lado cruento voltado para o papel, a fim de se evitar dobras no tecido, e embebidas em solução de formol a 10% tamponado por 48 horas para fixação. Em seguida, foram encaminhadas para o Laboratório de Patologia do Departamento de Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, FOB-USP, onde foram preparadas macroscopicamente (cortadas no sentido transversal e longitudinal com lâmina de bisturi), submetidas ao processamento histotécnico de rotina (lavados em água corrente por 24 horas, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol), incluídos em parafina e cortadas em micrótomo (Leica) com quatro μm , sendo aderidas em lâminas de vidro comuns para microscopia e coradas pela hematoxilina e eosina (HE).

2. Análise microscópica e descrição dos resultados

A observação das diversas características microscópicas foi descrita, e os dados foram registrados em laudos. Foi utilizado microscópio óptico Olympus CH2 e as imagens registradas em fotomicrografias.

Os cortes corados em HE foram analisados em microscopia óptica baseando-se nos aspectos morfológicos do epitélio de revestimento (mucosa bucal); parede conjuntiva e epitélio odontogênico do folículo pericoronário.

E. Análise imunocitoquímica

Técnica imunocitoquímica

Cortes de quatro micrometros foram obtidos e fixados em lâminas a 70 °C (graus Celsius) por 12 horas. Realizou-se a desparafinização em xilol (quatro banhos de cinco minutos), hidratação dos cortes em PBS (solução fosfato tampão) por cinco minutos e a remoção da peroxidase endógena com H₂O₂ 3% (água oxigenada), por cinco minutos. A recuperação antigênica foi realizada em *steamer*, em solução de ácido cítrico pré-aquecida a 2,1%, pH 6.00, por 40 minutos em temperatura de até 100 °C. Foi usado o sistema de detecção Dako K4001 Envision System anti-mouse labeled polimer HRP. As lâminas foram incubadas em geladeira a quatro graus Celsius *overnight*; ao serem retiradas da geladeira as lâminas foram lavadas em PBS e o cromógeno foi o Diaminobenzidine (DAB) a 0,1% por cinco minutos. Os cortes foram submetidos a um banho em água destilada e os cortes contracorados com Hematoxilina de Mayer, e montados utilizando-se lamínulas. Esta técnica foi executada no “Laboratório Consultoria em Patologia”, Botucatu, São Paulo. O número de mastócitos, nas duas diferentes técnicas de imunomarcção: ckit (Dako, USA – policlonal) e triptase (Chemicon, USA – policlonal) (Anexos 2 e 3), foi determinado pela média da contagem destas células identificadas em dez campos microscópico distintos para cada espécime, perfazendo 140 para cada grupo e técnica imunocitoquímica empregada. Portanto, para cada grupo foi realizada 280 análises microscópicas; considerando os três grupos da pesquisa, foram feitas 840 análises de campo.

F. Análise estatística

Foi utilizada estatística descritiva para apresentar: o valor mediano das idades de cada grupo de estudo; a média e a amplitude do número de células contados nos dez campos microscópico, para cada espécime (14) de cada uma das duas técnicas usadas, nos três grupos de estudo.

O teste estatístico inferencial selecionado foi Qui-quadrado para comparar as duas técnicas empregadas (ckit e triptase), no mesmo grupo; e *t-student* para análise entre os três grupos, respeitando-se a técnica laboratorial usada (ckit e triptase). Foi considerada diferença estatisticamente significativa o *P-value* inferior a 0,05.

IV RESULTADOS

IV. Resultados

A. Análise microscópica descritiva em HE

Grupo 1: Folículo pericoronário na fase intra-óssea de erupção

Os folículos pericoronários apresentavam epitélio reduzido do esmalte com quatro a cinco camadas e com projeções ou cristas invadindo o tecido conjuntivo (Figura 4). Na superfície notava-se uma camada celular cuboidal e contínua composta por ameloblastos reduzidos (Figura 5). Estas células superficiais tinham citoplasma eosinofílico e bem delimitado; enquanto o seu núcleo apresentava-se com cromatina moderadamente condensada. Nas camadas subjacentes as células eram esféricas e de núcleo bem condensado em sua cromatina. O epitélio reduzido do esmalte se apresentou não contínuo ao longo da superfície do tecido conjuntivo folicular. Mas, havia áreas de preservação total da sua estrutura e organização. (Figura 4 e 5). Em 11 espécimes o epitélio folicular era do tipo reduzido do órgão do esmalte. Os outros três espécimes tiveram epitélio estratificado pavimentoso com três a cinco camadas de células.

Subjacente, o tecido conjuntivo folicular apresentava-se ora frouxo, especialmente nos espaços subepiteliais e perivasculares, ora fibroso. De permeio, ilhotas e cordões epiteliais odontogênicos remanescentes da lâmina dentária foram constantemente observados (Figura 6). Nos tecidos foliculares dos dentes em fase intra-óssea de erupção não foram encontradas áreas com infiltrado inflamatório ou exudato. A mucosa bucal sobrejacente não foi incluída na peça cirúrgica, em todos os espécimes.

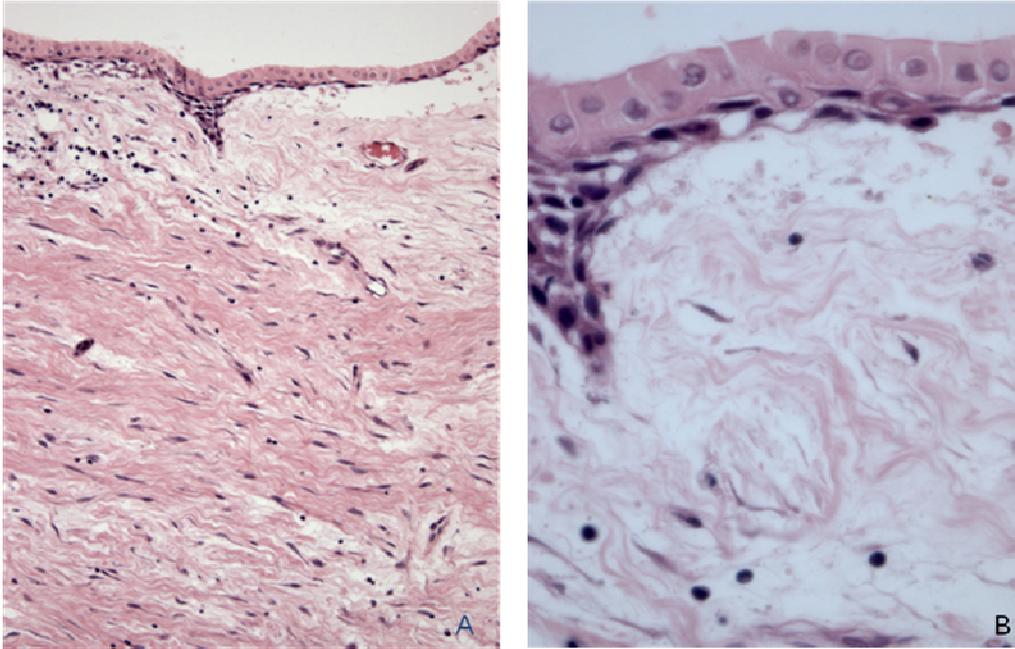


Figura 4. Folículo pericoronário de dente em fase intra-óssea de erupção (G1) com epitélio reduzido do esmalte no qual se destaca os ameloblastos reduzidos na forma cuboidal e individualizada e as camadas subjacentes. O tecido conjuntivo imediatamente subjacente ao epitélio é frouxo, mas logo se mostra fibrosado e com remanescentes da lâmina dentária. (H.E.; A=100X, B=160X).

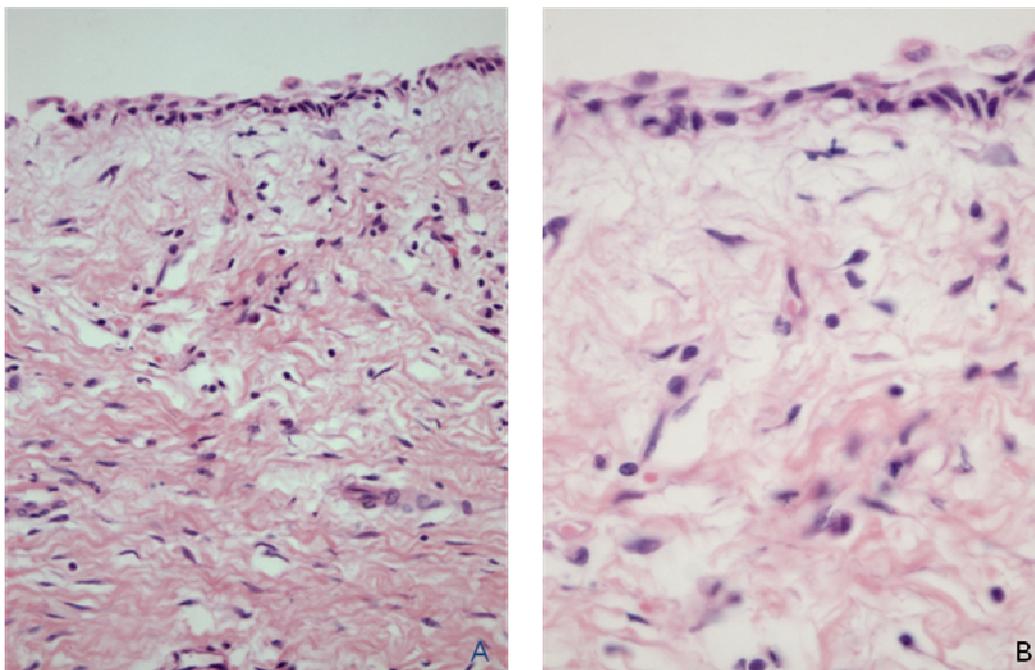


Figura 5. Folículo pericoronário de dente em fase intra-óssea de erupção (G1) com epitélio reduzido do esmalte sem a presença dos ameloblastos reduzidos que ficaram aderidos ao dente. O tecido conjuntivo imediatamente subjacente ao epitélio é frouxo, mas abaixo se mostra fibrosado e com remanescentes da lâmina dentária. (H.E.; A=100X, B=160X).

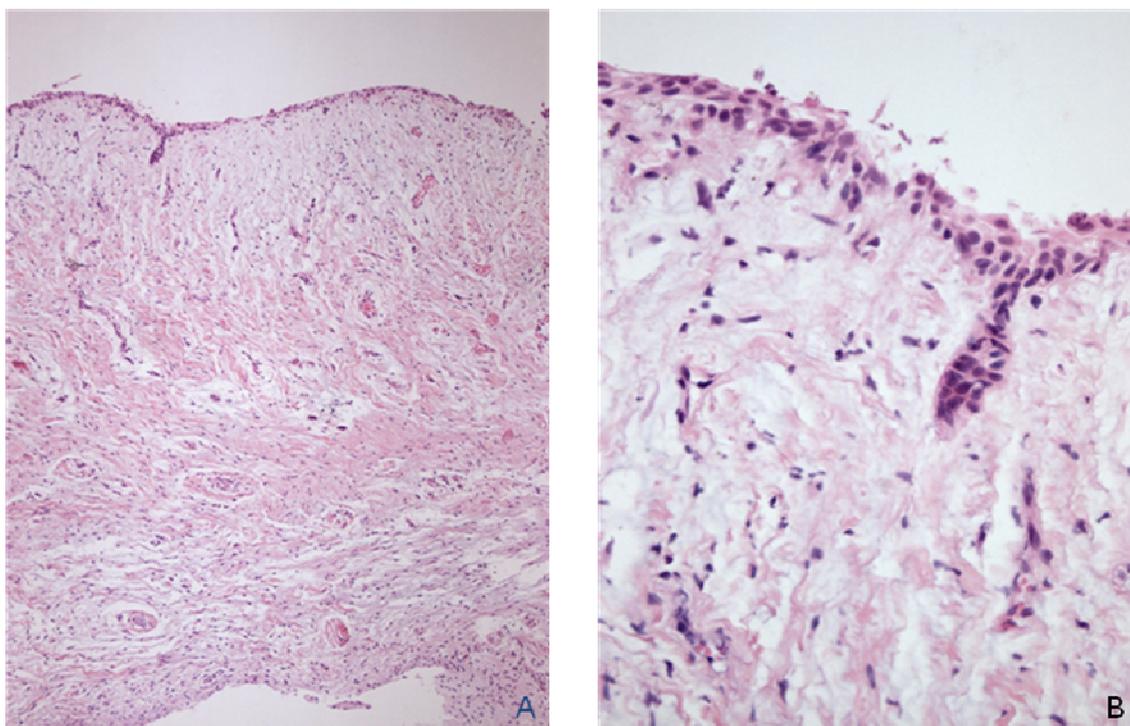


Figura 6. Folículo pericoronário de dente em fase intra-óssea de erupção (G1) com epitélio reduzido do esmalte sem a presença dos ameloblastos reduzidos que ficaram aderidos ao dente. O tecido conjuntivo imediatamente subjacente ao epitélio é frouxo, mas logo se mostra fibrosado e com remanescentes da lâmina dentária. (H.E.; A=40X, B=160X).

Grupo 2: Folículo pericoronário na fase submucosa de erupção

Neste grupo os espécimes apresentavam-se com a mucosa bucal sobrejacente, lâmina própria e submucosa contendo o tecido folicular conjuntivo com fragmentos de epitélio reduzido do esmalte (Figura 7).

Na mucosa bucal, o epitélio estratificado pavimentoso apresentava-se em média com 15 a 30 camadas de células, cristas bem estabelecidas e organizadas e aparentemente com discreto aumento de espessura, provavelmente decorrente de uma discreta hiperplasia (Figura 7).

Na lâmina própria e submucosa notavam-se eventuais leucócitos, ora polimorfonucleares, ora mononucleares, muito embora sem caracterizar um processo inflamatório presente (Figura 7). As ilhotas epiteliais odontogênicas eram raras e dispersas (Figura 7). Os vasos sanguíneos apresentavam-se em número e aspectos normais.

Na face interna do fragmento tecidual correspondente à ulectomia, em algumas regiões, o epitélio apresentava-se revestindo a superfície, mas não de forma contínua. Em quatro espécimes, o revestimento interno, morfológicamente, se apresentava com epitélio reduzido do esmalte. Em dez, o epitélio estratificado pavimentoso se apresentava sem cristas exuberantes. O tecido conjuntivo fibroso da mucosa bucal se continuava sem linhas ou sinais demarcatórios, com o tecido conjuntivo folicular. Entretanto na metade do tecido conjuntivo voltado para o epitélio folicular o mesmo tendia a ser mais frouxo, menos colagenizado (Figuras 8 e 9).

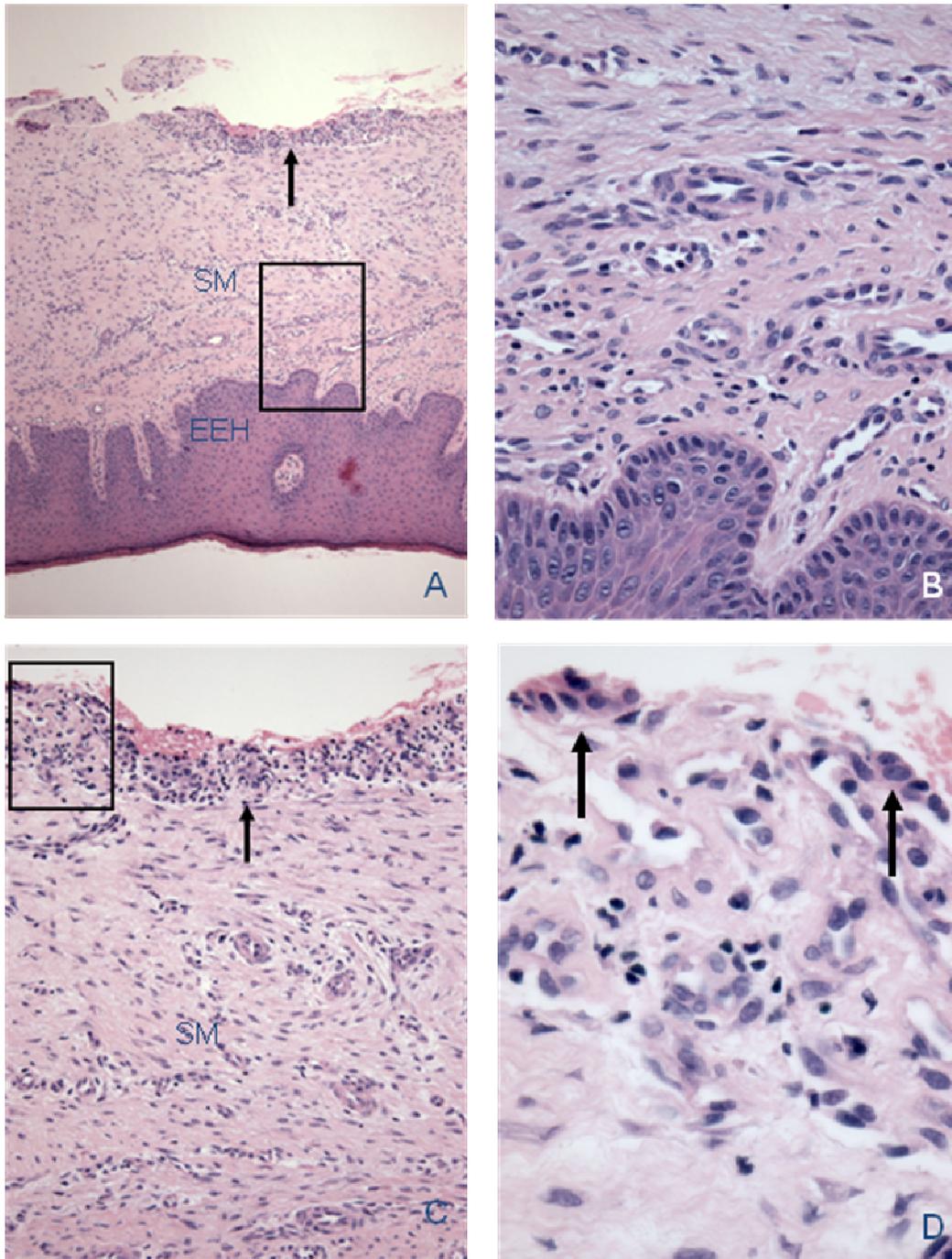


Figura 7. Folículo pericoronário de dente em fase submucosa de erupção (G2) com epitélio de revestimento fragmentado (seta) e desorganizado por infiltrado de células mononucleares. Destaca a mucosa bucal com epitélio estratificado hiperplásico (EEH). A submucosa bucal (SM) constituída pelo tecido conjuntivo fibroso entre os dois epitélios acha-se bem organizada, com rica celularidade e fibrosamento homogêneo (H.E.; A=40X, B=160X, C= 100X, D=400X).

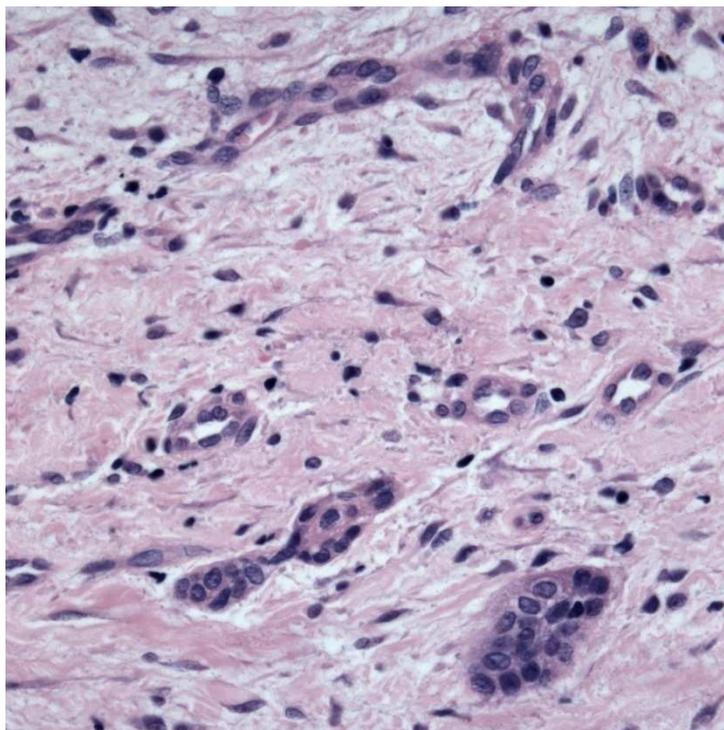


Figura 8. Remanescentes da lâmina dentária em tecido conjuntivo de folículo pericoronário de dente em fase submucosa de erupção (G2) na forma de ilhotas epiteliais odontogênicas. (H.E.; 160X).

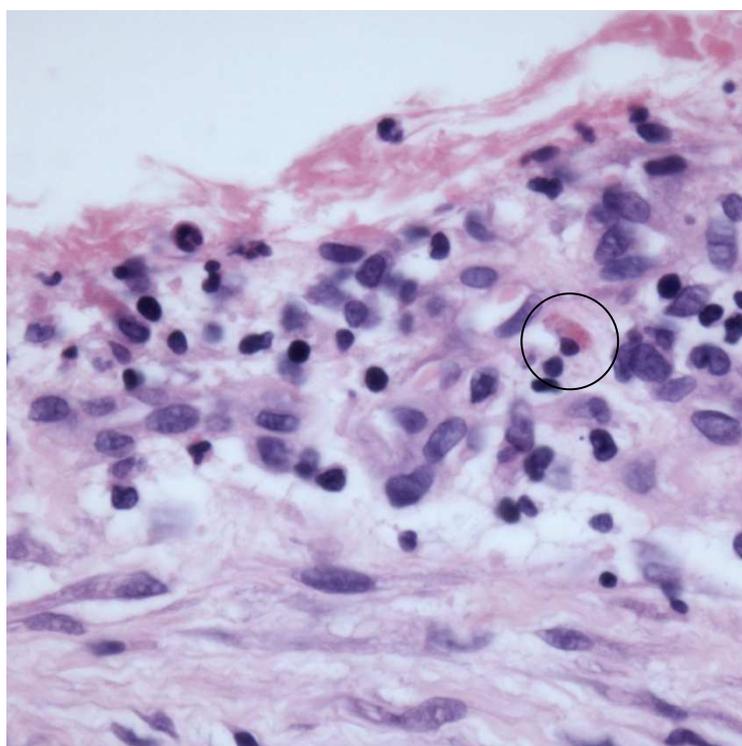


Figura 9. Folículo pericoronário de dente em fase submucosa de erupção (G2) com epitélio de revestimento fragmentado e desorganizado por infiltrado de células mononucleares e eventuais polimorfonucleares. Destaca a presença de eventuais eosinófilos em algumas regiões (círculo). (H.E.; 400X).

Grupo 3: Mucosa bucal

A mucosa bucal nos espécimes analisados apresentava-se constituída por epitélio estratificado com 15 a 30 camadas e lâmina própria livre de inflamação.

O epitélio apresentava-se paraqueratinizado; em algumas áreas, moderadamente hiperplásico. A lâmina própria, por sua vez, apresentava-se constituída por tecido conjuntivo frouxo. Na submucosa bucal, o tecido conjuntivo fibroso apresentava eventuais leucócitos, mas sem caracterizar morfologicamente um processo inflamatório (Figura 10)

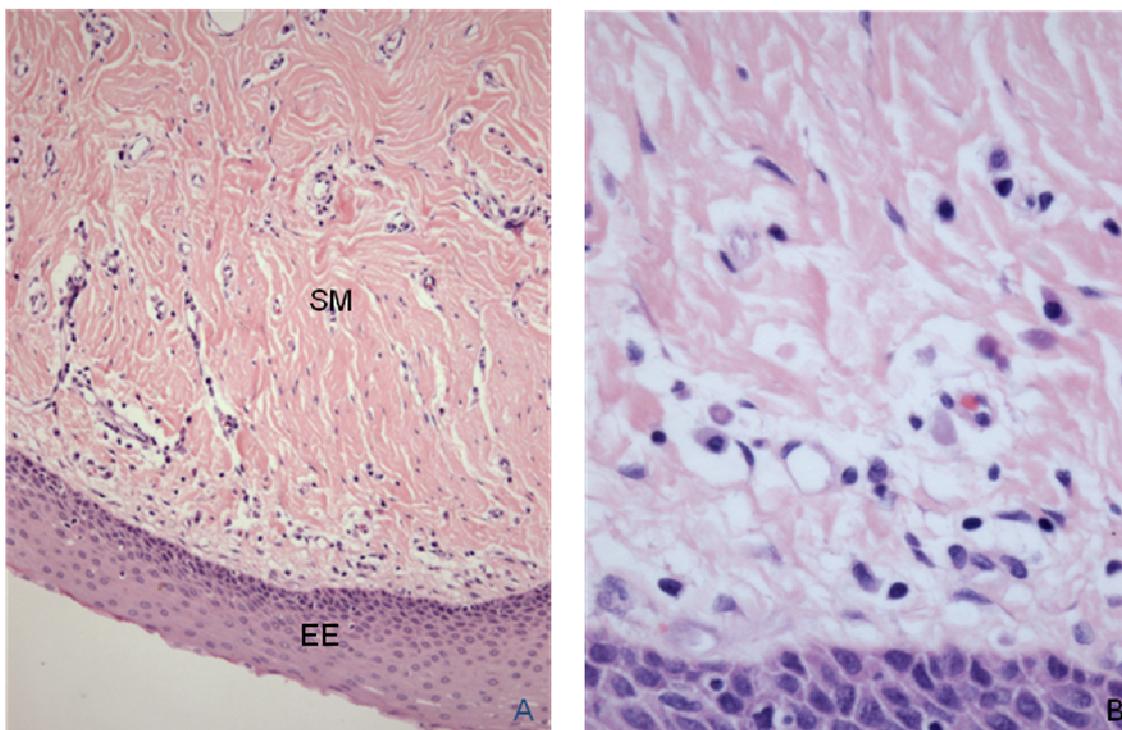


Figura 10. Mucosa bucal (G3) com epitélio estratificado pavimentoso paraqueratinizado (EE) e submucosa bucal (SM). O tecido conjuntivo imediatamente subjacente ao epitélio é frouxo, mas logo se mostra fibrosado com discreta infiltração de células mononucleares. (H.E.; A=100X, B=160X).

B. Análise descritiva dos achados imunocitoquímicos

Grupo 1. Folículo pericoronário na fase intra-óssea de erupção

Nos tecidos foliculares dos dentes na fase intra-óssea houve imunomarcção mínima para mastócitos e alguns espécimes nem se marcaram, tanto para a evidenciação do ckit como para a triptase. A média encontradas neste grupo foi de 0,5 células com desvio padrão de 0,62. (Figuras 11, 12, 13, 14 e 15)

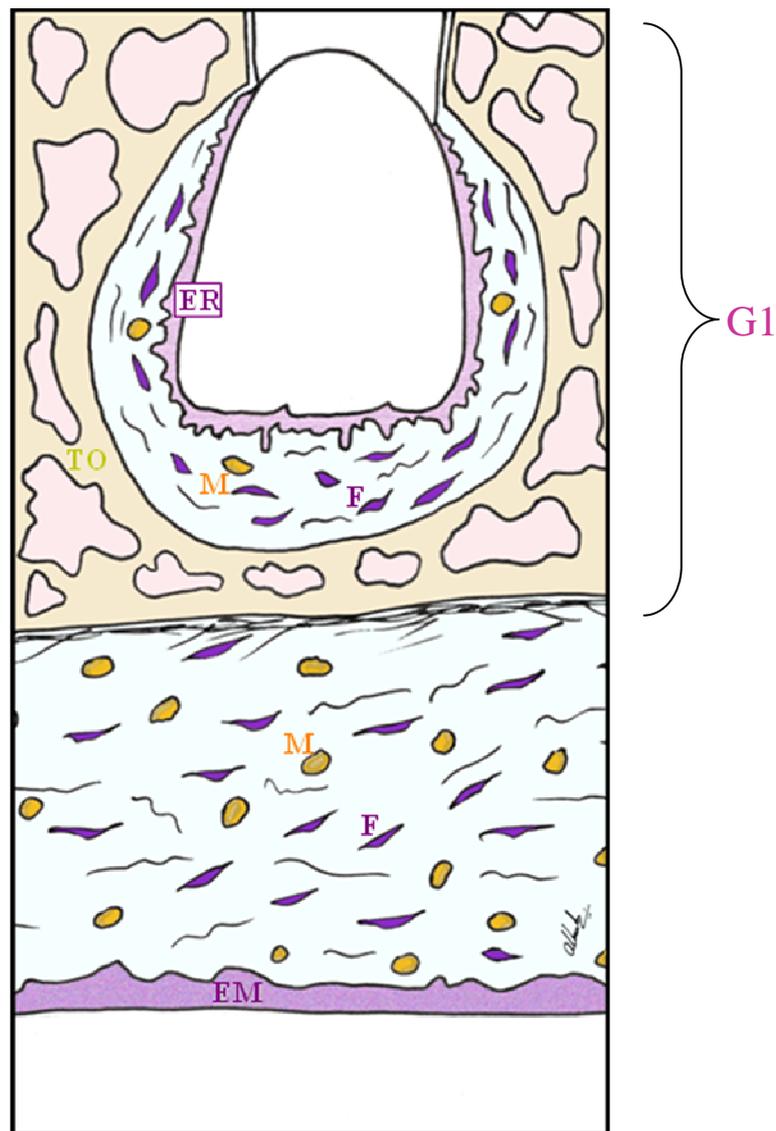


Figura 11. Representação esquemática do folículo pericoronário de dente na fase intra-óssea da erupção (Grupo 1) que se apresentou com número mínimo de mastócitos (M). Em alguns espécimes não houve imunomarcção nos mastócitos para ckit e triptase. (ER = epitélio reduzido do esmalte; F = fibroblasto; TO = tecido ósseo; EM = epitélio da mucosa bucal).

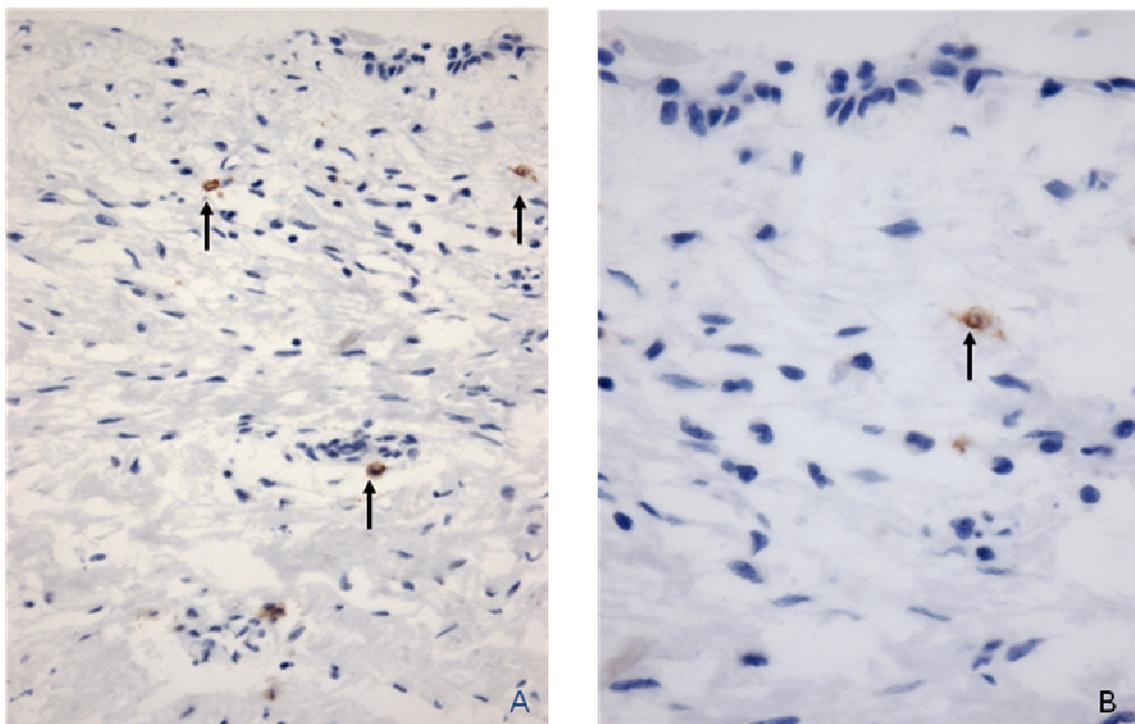


Figura 12. Folículo pericoronário de dente em fase intra-óssea de erupção (G1) com epitélio reduzido do esmalte e imunomarcção pelo ckit dos poucos mastócitos presentes (setas). (A=100X, B=160X).

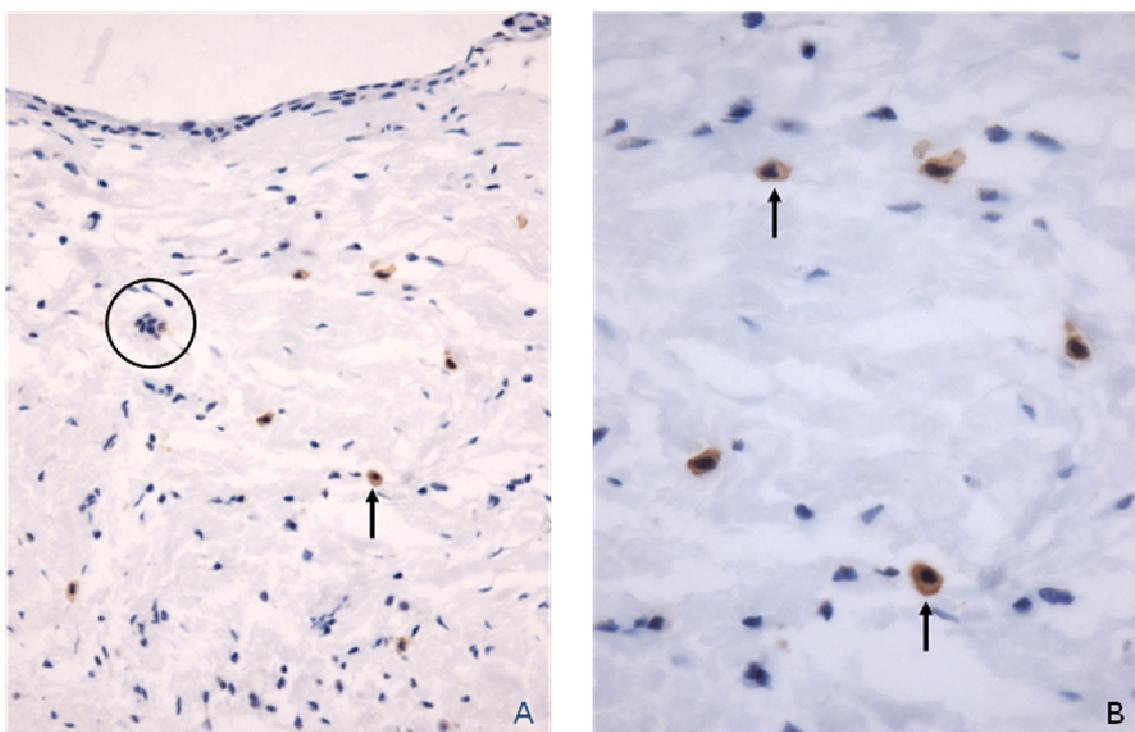


Figura 13. Folículo pericoronário de dente em fase intra-óssea de erupção (G1) com epitélio reduzido do esmalte e imunomarcção pelo ckit dos poucos mastócitos presentes (setas). Nota-se ilha epitelial odontogênica (círculo) (A=100X, B=160X).

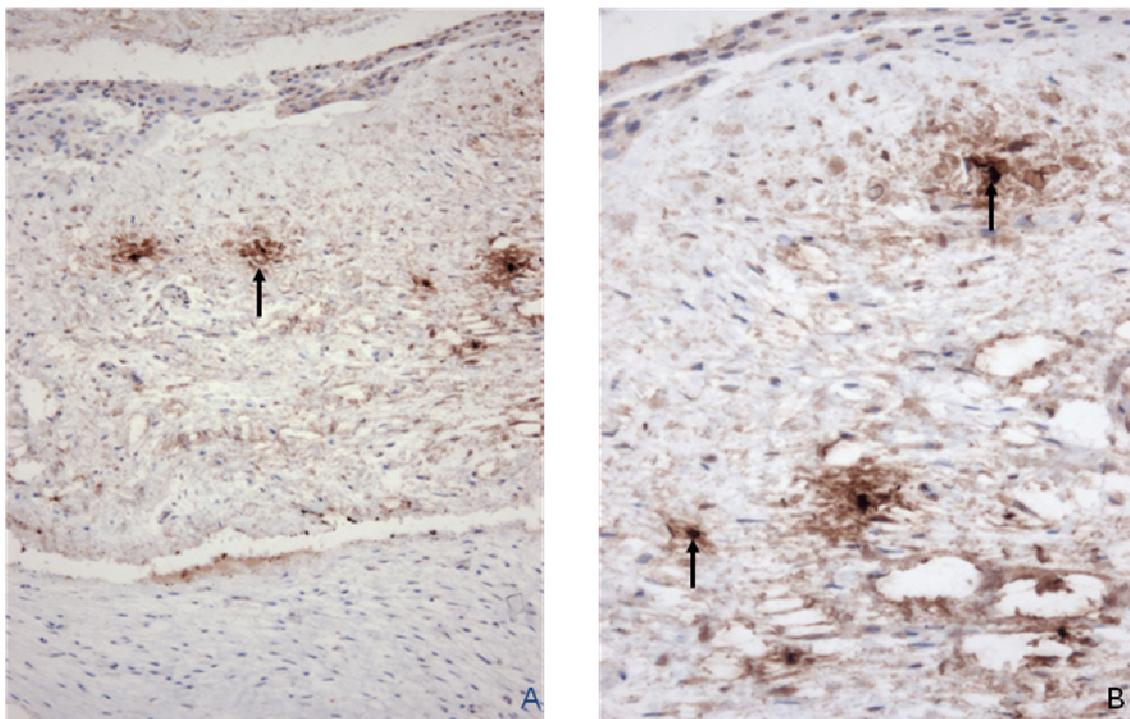


Figura 14. Folículo pericoronário de dente em fase intra-óssea de erupção (G1) com epitélio reduzido do esmalte e imunomarcção pela triptase dos poucos mastócitos presentes (setas). (A=100X, B=160X).

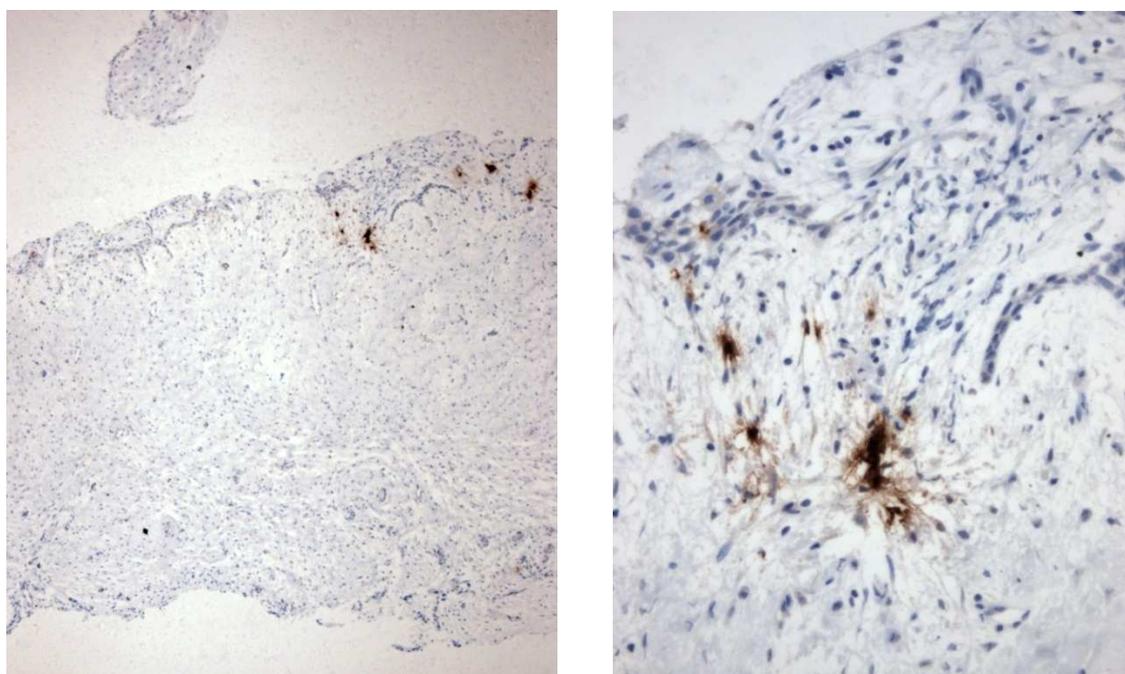


Figura 15. Folículo pericoronário de dente em fase intra-óssea de erupção (G1) com epitélio reduzido do esmalte e imunomarcção pela triptase dos poucos mastócitos presentes (setas). (A=40X, B=160X).

Grupo 2. Folículo pericoronário na fase submucosa de erupção

No tecido conjuntivo da lâmina própria observou-se a presença de mastócitos imunomarcados pelo ckit e triptase. No tecido conjuntivo da submucosa e do folículo pericoronário notou-se a presença de grande número de mastócitos; o tecido conjuntivo folicular apresentou-se então rico em mastócitos, contrastando com a quase ausência dos mesmos nos tecidos foliculares na fase intra-óssea, no qual essas células não estavam presentes. A média das células observadas nos 280 campos microscópico (distintos e aleatórios) foi de 10,96 mastócitos, com desvio padrão de 2,67 células (Figuras 16, 17, 18, 19 e 20).

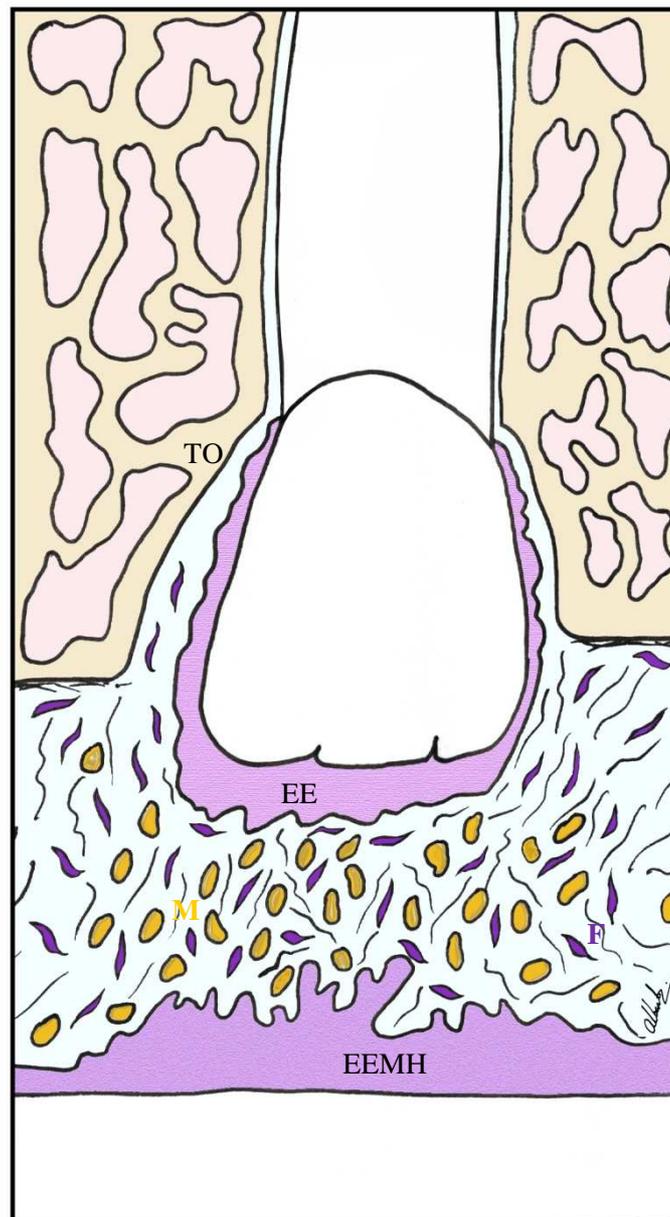


Figura 16. Representação esquemática do folículo pericoronário de dentes na fase submucosa da erupção (Grupo 2) e mucosa bucal analisada conjuntamente. Os mastócitos imunomarcados pelo ckit e triptase se apresentavam em maior quantidade/densidade e com distribuição concentrada na região entre a mucosa bucal e o folículo pericoronário. O epitélio folicular se apresentava, em sua maioria, como estratificado pavimentoso (EE). O epitélio da mucosa bucal mostrava-se hiperplásico (EMH). (F = fibroblasto; TO = tecido ósseo).

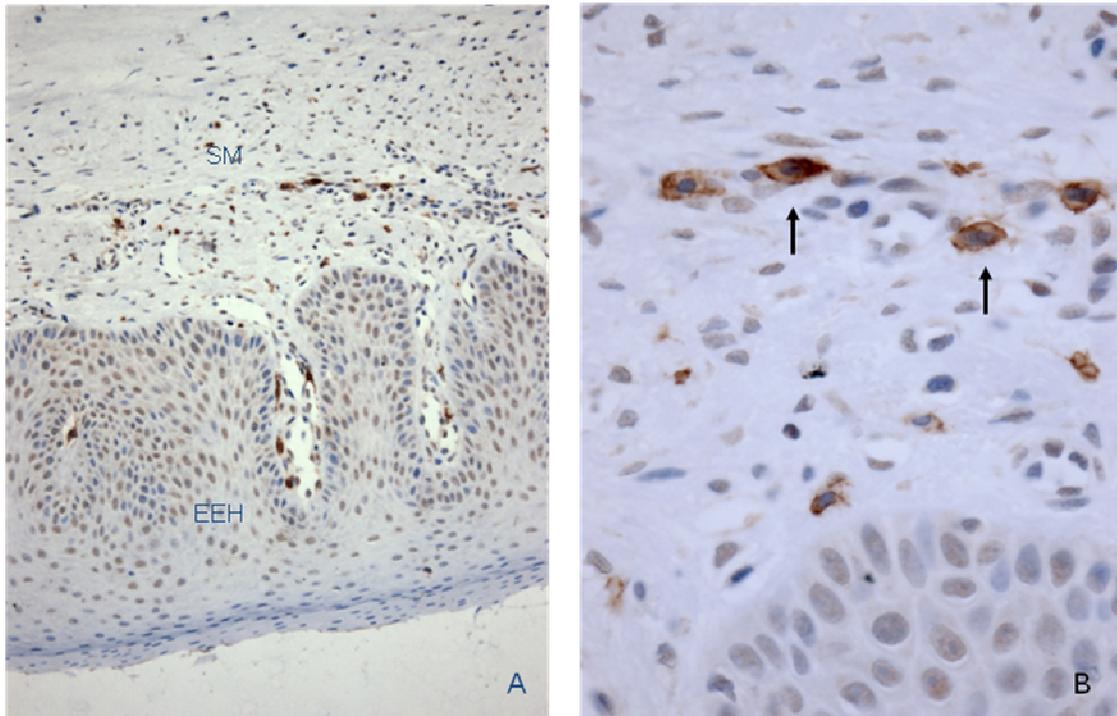


Figura 17. Folículo pericoronário de dente em fase submucosa de erupção (G2) revelando imunomarcagem de mastócitos pelo ckit (setas) em grande número na submucosa (SM). Destaca a mucosa bucal com epitélio estratificado hiperplásico (EEH). (A=100X, B=160X).

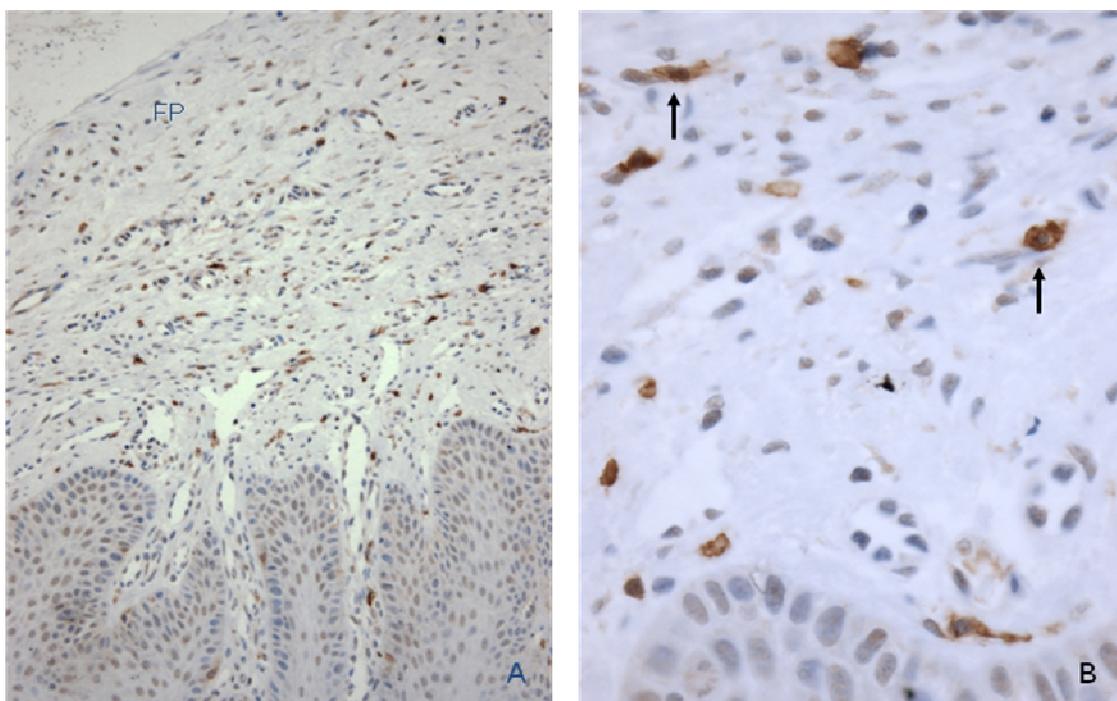


Figura 18. Folículo pericoronário de dente em fase submucosa de erupção (G2) revelando imunomarcagem de mastócitos pelo ckit (setas) em grande número na submucosa (SM) e no tecido conjuntivo folicular (FP). (A=100X, B=160X).

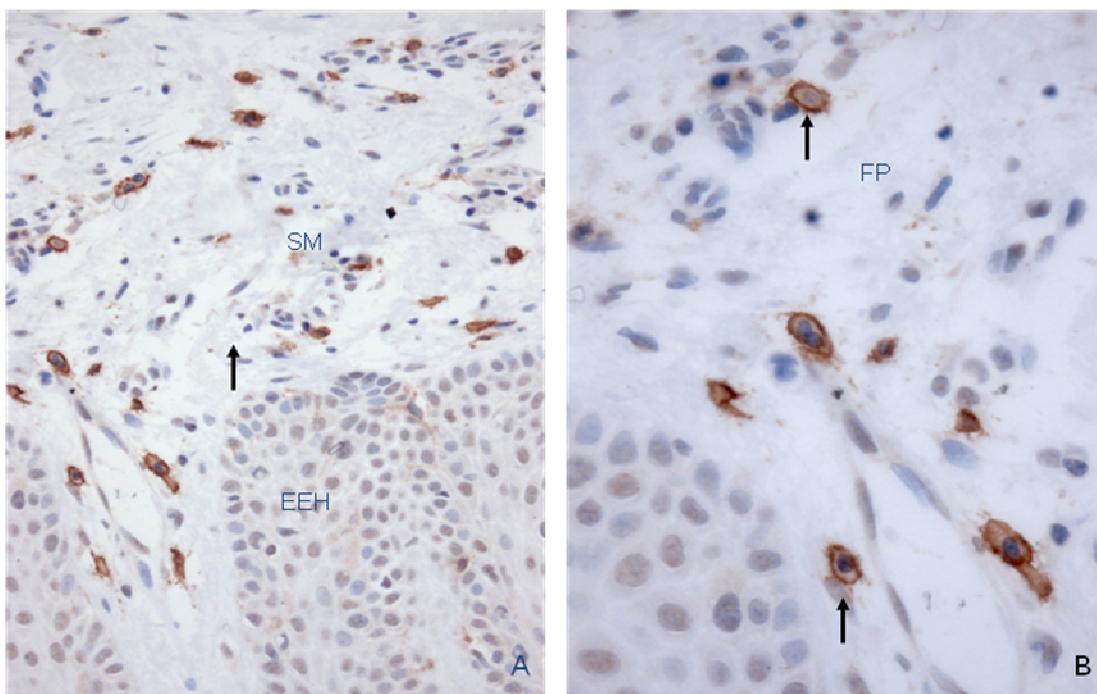


Figura 19. Folículo pericoronário de dente em fase submucosa de erupção (G2) revelando imunomarcção de mastócitos pelo ckit (setas) em grande número na submucosa (SM). Destaca a mucosa bucal com epitélio estratificado hiperplásico (EEH). (A=100X, B=160X).

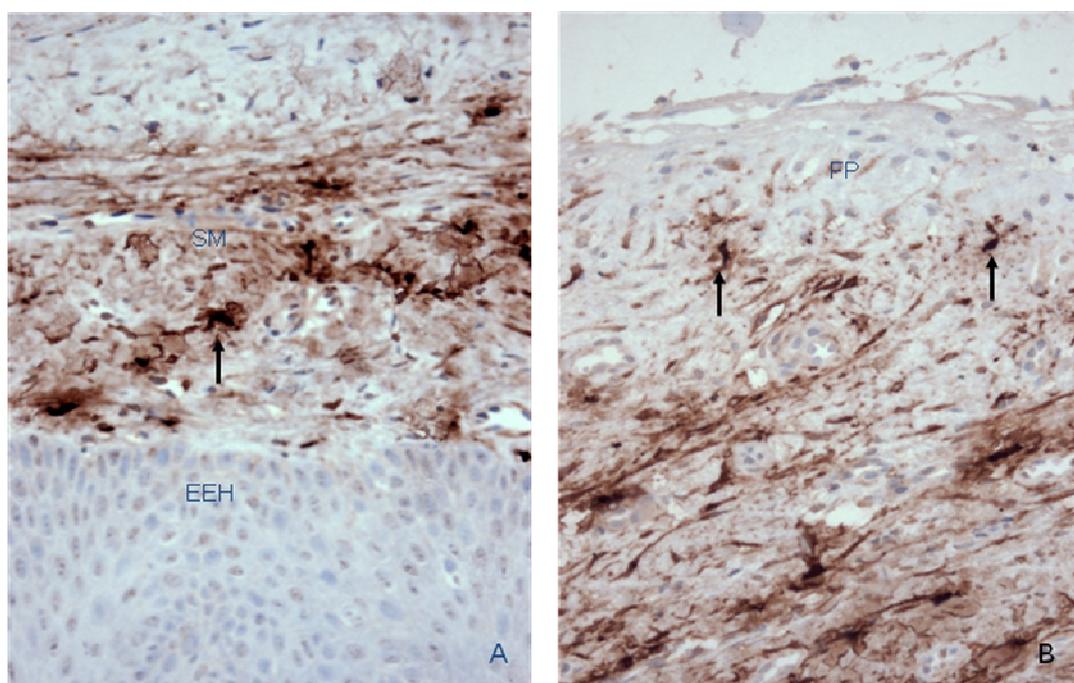


Figura 20. Folículo pericoronário de dente em fase submucosa de erupção (G2) revelando imunomarcção de mastócitos pela triptase (setas) em grande número na submucosa (SM) e tecido conjuntivo folicular (FP). Destaca a mucosa bucal com epitélio estratificado hiperplásico (EEH). (A e B=160X).

Grupo 3. Mucosa bucal

Na lâmina própria e submucosa, os mastócitos imunomarcados pelo ckit e triptase apresentavam-se dispersamente distribuídos. Em algumas áreas a densidade dos mastócitos era semelhante à encontrada no Grupo 2, mas na maioria dos espécimes e regiões a densidade se revelou menor. A média de mastócitos foi de 4,4 células por campo microscópico, com desvio padrão de 1,63 (Figuras 21, 22 e 23).

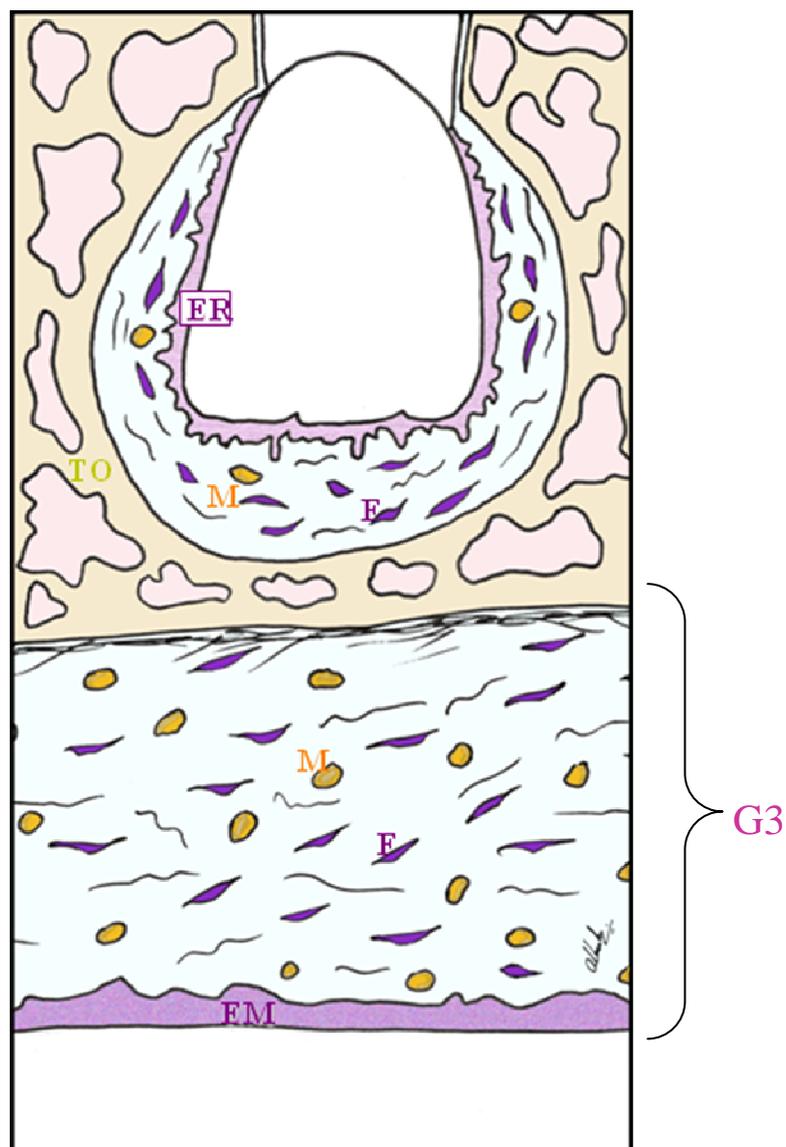


Figura 21. Representação gráfica da mucosa bucal imunomarcada para mastócitos (M) com ckit e triptase, sendo que estas células se apresentavam com distribuição difusa e homogênea. (F = fibroblasto; TO = tecido ósseo; EM = epitélio da mucosa bucal).

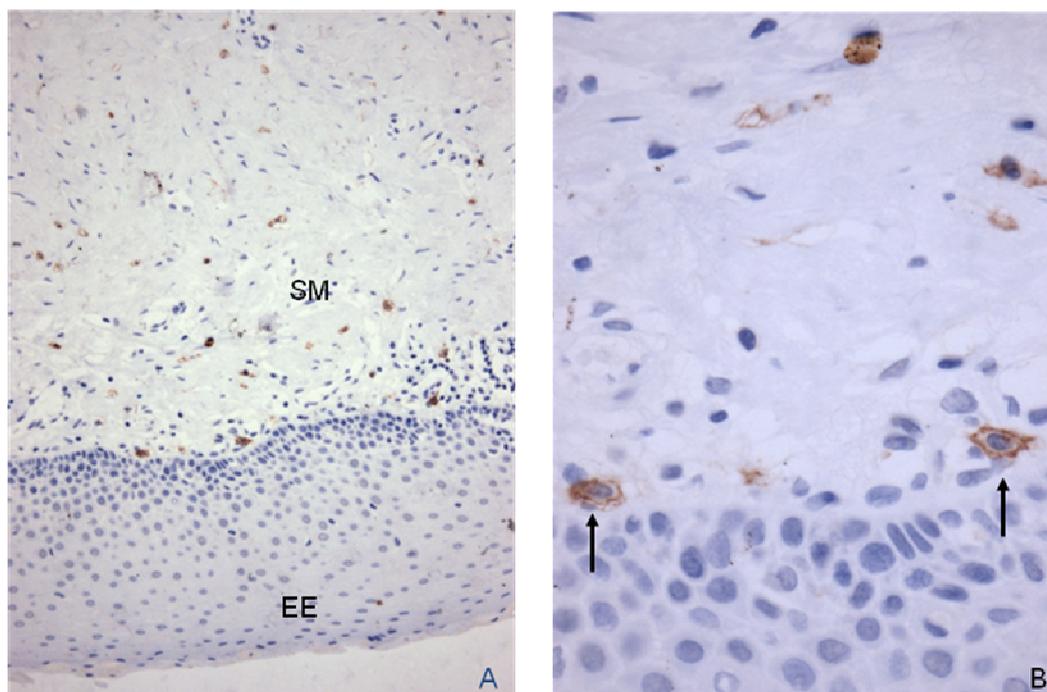


Figura 22. Mucosa bucal (G3) com epitélio estratificado pavimentoso paraqueratinizado (EE) e submucosa bucal (SM) revelando imunomarcaco com ckit dos mastócitos (setas). A=100X, B=160X).

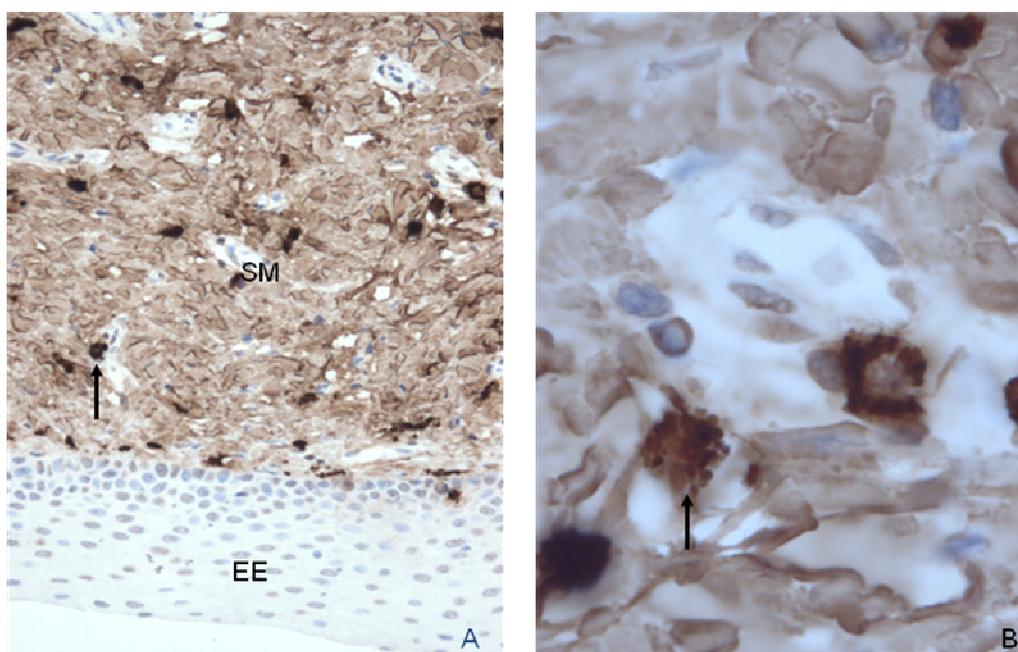


Figura 23. Mucosa bucal (G3) com epitélio estratificado pavimentoso paraqueratinizado (EE) e submucosa bucal (SM) revelando imunomarcaco com triptase dos mastócitos (setas). (A=100X, B=400X).

C. Análise quantitativa e comparativa dos mastócitos imunomarcados nos três grupos

A média (\bar{x}), a amplitude (a; com a quantidade menor e a quantidade maior de células) e o resultado do teste estatístico, de cada um dos dez campos microscópicos, estão apresentados na Tabela 1. Foi realizado o teste estatístico comparando os resultados das duas técnicas (ckit e triptase) para cada grupo, e estas não se diferiram (teste Qui-quadrado) com $p > 0,05$ para cada um dos três grupos. Estes resultados validam as duas técnicas usadas nesta pesquisa, pois mostraram valores muito próximos, uma confirmando os resultados da outra.

Tabela 1. Avaliação e comparação da média dos mastócitos no tecido conjuntivo dos folículos pericoronários (G1 e G2) e da submucosa bucal (G3), de acordo com as técnicas usadas (ckit e triptase) para cada grupo.

Marcadores Grupos	ckit	Triptase	<i>P-value</i> *
	\bar{x} (a)	\bar{x} (a)	
G1	0,5 (5; 0 a 5)	0,84 (6; 0 a 6)	0,768975 [□]
G2	10,96 (9; 8 a 17)	11,5 ± (10; 8 a 18)	0,909283 [□]
G3	4,4 ± (8; 0 a 8)	4,9 (9; 0 a 9)	0,869765 [□]

*considerado diferenças significantes os valores inferiores a 0,05

[□] estatisticamente não significativo

Foi elaborado o teste estatístico (*t-student*), para comparar a mesma técnica nos diferentes grupos, fazendo o cruzamento do Grupo 1 com o Grupo 2; o Grupo 1 com o Grupo 3; e o Grupo 2 com o Grupo 3, para cada uma das técnicas. Os resultados estão apresentados na Tabela 2, comprovando diferença estatisticamente significativa em todas as situações ($p < 0,05$).

Tabela 2. Avaliação e comparação da média dos mastócitos, dos grupos G1, G2 e G3 entre si, de acordo com os marcadores usados (ckit e triptase).

Marcadores	Grupos					
	G1	G2	G1	G3	G2	G3
ckit	0,5	10,96	0,5	4,4	10,96	4,4
triptase	0,84	11,5	0,84	4,9	11,5	4,9
<i>P-value</i> *	0,006028 ^Δ		0,012795 ^Δ		0,001935 ^Δ	

* considerado diferenças significantes os valores inferiores a 0,05

^Δ estatisticamente significante

V. DISCUSSÃO

No relato de Pierce et al.¹³ a presença de IgE nos ameloblastos durante a fase pós-secretora sugere uma reação de hipersensibilidade durante a erupção dentária. A detecção de IgE pode indicar fortemente a presença de mastócitos.

Na literatura foi verificado que os mastócitos se modelam de acordo com o local e as funções. Assim foi proposta a investigação comparativa destas células em três situações distintas: duas relacionadas à odontogênese e uma relacionada à estrutura bucal, esta assumindo o papel de “grupo controle” da pesquisa.

Muitas vezes se faz necessário a remoção de um dente que está ainda se formando, ou já formado, dentro do tecido ósseo, como nos casos dos dentes supranumerários, caninos, pré molares e dos terceiros molares sem espaço nas arcadas para irromperem. Durante o acesso cirúrgico a estes dentes, foi possível obter um fragmento do tecido do folículo pericoronário para investigar a presença de mastócito. Este constituiu o Grupo 1 da pesquisa: “Folículo pericoronário na fase intra-óssea de erupção”.

O Grupo 2 se refere ao momento posterior da erupção dentária. As amostras foram obtidas de pacientes, geralmente crianças de seis a oito anos de idade, com um ou mais dentes atrasados em sua erupção. Na clínica odontopediátrica há indicação de remoção cirúrgica da mucosa bucal que recobre o dente em questão, para exposição da sua coroa dentária. Em poucos dias o dente atinge o nível esperado de exposição na arcada. Num período de dois anos foi possível intervir em 14 destes casos. Este momento foi considerado como o mais próximo do irrompimento do dente na arcada, sendo nomeado como “Folículo Pericoronário na fase submucosa de erupção”.

O Grupo 3 foi considerado como “Grupo Controle”, pois durante a remoção cirúrgica de hiperplasias fibrosas inflamatórias na mucosa bucal, retira-se o tecido hiperplásico com margem de segurança em tecido sadio, para garantir a remoção total da lesão. As margens de

tecidos normais foram selecionadas para esta pesquisa, pois se tratava de mucosa bucal hígida, sem interferência de alguma das fases da odontogênese e/ou erupção dentária. Assim foi constituído o grupo “Mucosa bucal”.

Dois testes específicos de imunomarcção para mastócitos foram selecionados: c-kit e triptase²⁷, amplamente utilizados com este propósito, mostrando resultados semelhantes na contagem de mastócitos imunomarcados nos tecidos deste estudo.

Os pacientes participantes deste estudo constituíram os três grupos amostrais, dos quais foram registrados seu nome, idade, gênero e identificação do local da amostra. Foi usado a mediana como medida central da idade devido à heterogeneidade de um dos grupos. Foi recomendado que os grupos tivessem o mesmo número de participantes, superior a dez, considerando a disponibilidade de pacientes do Grupo 2. Como foi possível obter 14 casos de ulectomia, ficou definido este número para todos os grupos, portanto constituindo amostras equivalentes. No Grupo 1 houve expressiva predominância do gênero feminino, provavelmente devido a menor estrutura óssea nas mulheres, faltando espaço na arcada para acomodação dos terceiros molares, levando à indicação de exodontia. Os outros grupos, quanto ao gênero, apresentavam-se igualmente distribuídos. Os participantes do Grupo 3 apresentavam idades entre 14 a 82 anos. Neste grupo foi avaliado o tecido normal. Os outros dois grupos apresentavam idades mais homogêneas: o G1, de 15 a 21 anos; e o G2, de 6 a 19 anos.

Este trabalho, a nosso ver, apresenta três aspectos que limitam uma precisa extrapolação para correlações clínicas e fisiológicas diretas:

1. a mucosa bucal analisada no Grupo 3 não é da gengiva;
2. a média de idade dos três grupos de estudo não são equivalentes;
3. a localização dos espécimes nos três grupos são diferentes.

No entanto, os dados são tão significantes estatisticamente e coerentes entre si que permitem algumas inferências e os qualificam para indicar novos passos no estudo sobre o assunto.

Morfologicamente, a odontogênese está claramente documentada^{1,5,12} e neste conhecimento estão sendo gradativamente acrescentados os mecanismos biológicos que regem o processo. Através do comando genético, com participação de moléculas sinalizadoras, se define a anatomia dentária (morfogênese), a reabsorção dentária fisiológica e a remodelação óssea. O folículo pericoronário participa deste processo e tem por função proteger estes tecidos das células imunológicas de reconhecimento no tecido conjuntivo⁴, bem como comanda o início da erupção.

A integridade do folículo pericoronário é primordial para que o dente venha a irromper na cavidade bucal². Nele está grande concentração de mediadores químicos da osteoclasia e fatores de crescimento que possibilitam a reabsorção óssea necessária para a movimentação do dente, durante sua erupção^{6,7,9}. Enquanto o dente permanente está se irrompendo, o osso e o dente decíduo correspondente, quando presente, estão em processo de reabsorção. A neoformação óssea também acontece, porém em menor escala para permitir a movimentação do dente. Nos folículos pericoronários de dentes na fase intra-óssea já foram identificados sinais moleculares (EGF, IL-1, CSF) que induzem o influxo de monócitos, os quais se diferenciam em clastos para reabsorção óssea^{2,10}.

Os mastócitos são células que respondem a estímulos imunológicos e inflamatórios, e estavam quase ausentes ($\bar{x} = 0,5$ por campo microscópico) nos tecidos dos folículos pericoronários na fase intra-óssea. Portanto, provavelmente o epitélio do folículo pericoronário, quando íntegro e intra-ósseo, parece proteger o dente da ação destas células.

O grupo 2 representa um segundo momento da erupção dentária. Aqui, a membrana do folículo pericoronário não estaria mais íntegra, havendo exposição do dente ao tecido conjuntivo extrafolicular. Microscopicamente foi observado grande número de mastócitos imunomarcados para c-kit e triptase. Pierce et al. observaram presença de IgE na superfície dos ameloblastos (fase pós-secretora) sugerindo ser consequência da exposição das proteínas da matriz de esmalte às células imunocompetentes do tecido conjuntivo extrafolicular.

Estes dois achados parecem se completarem, se na observação de Pierce et al.¹³, o dente em questão também estiver na fase submucosa de erupção, e não na fase intra-óssea. Os autores não se referem a este fato em seu artigo, porém citam as reações no tecido conjuntivo extrafolicular. O experimento foi em murinos e provavelmente os momentos coincidem, pois os autores relatam que IgE foi claramente observada no 15º dia de vida do animal e pouco observada aos cinco dias de vida. O mesmo artigo, em 1986, relaciona os achados à imunologia e à sintomatologia durante o irrompimento dos dentes^{13,14,15,16}.

Quanto à presença de mastócitos, os três grupos apresentaram resultados distintos, com diferenças estatisticamente significantes. No Grupo 1 foram visualizados poucos mastócitos, em algumas amostras, em outras estas células estavam ausentes. Não foi possível a comparação destes resultados com a literatura, pois não foi localizada publicações com metodologias semelhantes. Pode-se supor que a integridade do epitélio do folículo pericoronário proteja as estruturas internas a ele, como a estrutura dentária da ação das células do tecido conjuntivo relacionadas às reações imunológicas e inflamatórias.

No Grupo 2 foi observado o maior número de mastócitos imunomarcados. A membrana pericoronária estaria provavelmente rompida e expondo as estruturas dentárias ao tecido conjuntivo, e poderia atrair os mastócitos para a região. Para Pierce et al¹³, o dente apresenta-se como um antígeno sequestrado, citando outros trabalhos com este mesmo conceito^{13,14,15,16}.

Outros interesses motivaram pesquisas sobre aspectos que envolve a odontogênese e a erupção dentária^{3,17,18,19,20} e estão apresentados no Anexo 5. Porém a maioria dos artigos disponível está relacionada ao uso de questionários aplicados a profissionais (pediatras, odontopediatras, enfermeiros) e familiares sobre a sintomatologia presente nas crianças¹¹.

Muitas vezes, o odontopediatra é procurado por pais com problemas em seus filhos, relacionando-os à erupção dentária. Embora seja do conhecimento destes profissionais que algumas alterações possam estar relacionadas a este período, como: inflamação localizada na gengiva, irritabilidade na criança, distúrbio do sono, rubor na face, aumento da salivação,

necessidade de morder objetos, perda de apetite, estado febril e diarreia^{11,12,28}, a fundamentação científica ainda precisa ser estabelecida na literatura. O Anexo 6 apresenta um quadro com autores que registraram os sinais e sintomas relacionados à erupção dentária.

Os resultados obtidos detectaram mudanças celulares nos tecidos foliculares pericoronários relacionadas aos mastócitos em duas diferentes fases da erupção dentária e que podem corroborar na compreensão dos sinais e sintomas clínicos deste processo fisiológico.

VI CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos e considerando as limitações inerentes à metodologia empregada, concluímos que:

1. A quantidade de mastócitos é diferente nos tecidos foliculares de acordo com a fase de erupção;
2. na fase intra-óssea da erupção, os tecidos conjuntivos foliculares não revelam imunocitoquimicamente uma marcante presença de mastócitos;
3. na fase submucosa, o número de mastócitos está significativamente elevado quando comparado com a fase intra-óssea da erupção dentária;
4. nos tecidos conjuntivos foliculares, na fase submucosa de erupção, os mastócitos aumentam sua concentração quando comparados à quantidade/densidade detectada na submucosa da mucosa bucal normal não relacionada aos dentes.

ANEXO 1

REGISTRO DOS ESPÉCIMES DO GRUPO 1
FOLÍCULO PERICORONÁRIO NA FASE INTRA-ÓSSEA DA ERUPÇÃO

Número	Localização (dente)	Idade	Gênero
1	21	15	<i>M</i>
2	18	20	<i>F</i>
3	28	15	<i>F</i>
4	38	21	<i>F</i>
5	38	20	<i>M</i>
6	18	18	<i>F</i>
7	28	18	<i>F</i>
8	38	18	<i>F</i>
9	48	18	<i>F</i>
10	48	19	<i>F</i>
11	28	19	<i>F</i>
12	48	17	<i>M</i>
13	18	17	<i>F</i>
14	48	20	<i>F</i>

REGISTRO DOS ESPÉCIMES DO GRUPO 2
FOLÍCULO PERICORONÁRIO NA FASE SUBMUCOSA DA ERUPÇÃO

Número	Localização (dente)	Idade	Gênero
1	21	7	<i>M</i>
2	21	6	<i>M</i>
3	21	7	<i>M</i>
4	11	6	<i>M</i>
5	22	8	<i>F</i>
6	12	8	<i>F</i>
7	11	7	<i>M</i>
8	21	6	<i>M</i>
9	42	17	<i>F</i>
10	21	19	<i>F</i>
11	11	19	<i>F</i>
12	12	19	<i>F</i>
13	22	17	<i>M</i>
14	11	8	<i>M</i>

REGISTRO DOS ESPÉCIMES DO GRUPO 3
MUCOSA BUCAL

Número	Localização (dente)	Idade	Gênero
1	<i>Lábio superior esquerdo interno</i>	46	<i>M</i>
2	<i>Vestíbulo inferior direito</i>	60	<i>F</i>
3	<i>Vestíbulo do rebordo alveolar inf dir (região pré molar)</i> <i>Rebordo alveolar inferior esquerdo</i>	76	<i>M</i>
4	<i>Região da linha alba da mordida na altura do 1 pré molar</i>	14	<i>F</i>
5	<i>Lábio duplo</i>	82	<i>M</i>
6	<i>Mucosa jugal do lado esquerdo</i>	75	<i>F</i>
7	<i>Mucosa jugal próxima à comissura labial direita</i>	21	<i>M</i>
8	<i>Mucosa jugal próxima região comissura labial esquerda</i>	66	<i>F</i>
9	<i>Rebordo alveolar do tuber da maxila</i>	56	<i>M</i>
10	<i>Mucosa jugal do lado direito</i>	59	<i>F</i>
11	<i>Mucosa de fundo de sulco gengivo-labial e</i> <i>mucosa labial do lado direito</i>	49	<i>F</i>
12	<i>Lábio e mucosa jugal</i>	56	<i>F</i>
13	<i>Mucosa jugal do lado direito</i>	48	<i>F</i>
14	<i>Região posterior do rebordo alveolar</i>	30	<i>M</i>

ANEXO 2. ckit (CD117)

A CD117 é uma proteína transmembrana que pertence à classe III de receptores da família da tirosina-quinase. O ligante natural para CD117 tem sido chamados Factor de Células Tronco, “Stell”factor” ou Fator de Crescimento de Mastócitos. Originalmente o CD117 foi identificado como antígeno associado à leucemia mielóide aguda e também foi identificado como marcador para mastócitos teciduais, células troco hematopoiéticas e células progenitoras do tecido ósseo humano normal. A maior parte das células medulares positivas para CD117, também expressam CD34. O CD117 está presente nas células progenitoras e células precursoras de todas as linhagens hematopoiéticas. Entretanto, está ausente em todas as células hematopoiéticas maduras exceto nos mastócitos. Também vem sendo associado a promoção da migração celular, proliferação e viabilidade dos melanoblastos, progenitores hematopoiéticas e células germinativas primordiais do tecido nervoso central e do sistema reprodutivo. Formas alteradas desse receptor podem estar associadas a alguns tipos de câncer e mutações com ganho de função têm sido associadas a doenças como mastocitoses e tumores gastrintestinais, entre outros.

Técnica do ckit

Desparafinização:

- Passar por 4 cubas contendo xilol durante 5 minutos cada.
- Passar por 4 cubas contendo álcool etílico.
- Deixar por 5 minutos em uma cuba contendo PBS.
- Passar por 2 cubas contendo PBS com H₂O₂ 3% 5 minutos cada.
- Passar por 1 cuba contendo PBS para posteriormente iniciar a imunohistoquímica.

Recuperação antigênica:

- Colocar as lâminas em racks contendo ácido cítrico 0,21% PH 6.00. Colocar a cuba no microondas em potencia máxima e marcar 15 minutos, a cada 3 minutos pausar o microondas para completar o ácido evaporado.
- Ao término do tempo pré-determinado, retirar a cuba do forno, deixar esfriar por aproximadamente 20 minutos.
- Retirar as lâminas da cuba contendo ácido cítrico, colocar nas bandejas e pingar PBS sobre as lâminas. Aspirar o excesso de PBS e instilar o Ckit (Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117 – REF.: A4502 - Dako) na diluição de 1:150, e incubar overnight a 4-8 °C.
- Lavar as lâminas com PBS com Tween, aspirar o excesso de PBS e instilar o Envision Rabbit K4003 - Dako e incubar por 45 minutos.
- Lavar as lâminas com PBS com Tween, aspirar o excesso de PBS e instilar o DAB (Diaminobenzidine tetra-hydrochloride – REF.: D-5637 – Sigma)

Preparo do DAB:

- 10 ml de Trisma; 10 mg de DAB; 0,2 ml de H₂O₂ 10%
- Instilar o DAB sobre as lâminas e incubar durante 5 minutos.
- Lavar com H₂O destilada abundantemente, contraporar com Hematoxilina, azulecer em H₂O amoniacal, desidratar em 6 cubas com álcool etílico absoluto, passar em 3 cubas contendo xilol e por ultimo montar com resina permount.
- Rotular e entregar para ser analisada.

ANEXO 3. Triptase

As triptases humanas compreendem uma família de proteases séricas neutras tipo tripsina são predominantemente encontradas nos mastócitos. Na sua forma enzimática ativa, as triptases presentes nos mastócitos existem na forma de um tetrâmero não covalente de 132kDa. Essas proteases ativas são capazes de degradar peptídeos vasoativos intestinais, ativar pré-caliceínas e gerar bradicininas e outros membros da mesma família, todos mediadores importantes envolvidos em fenômenos respiratórios, os quais são participantes ativos nos processos alérgicos das vias respiratórias. Os mastócitos são ativados por um grande número de estímulos, incluindo a presença de antígenos, superóxidos, proteínas do complemento, neuropeptídeos e lipoproteínas, o que resulta na sua ativação e degranulação. A identificação dos mastócitos através do uso das triptases tem sido útil na identificação de infiltrados focais ou difusos ricos em mastócitos, na identificação de mastócitos atípicos, com pouca granulação ou mesmo não metacromáticos, observados principalmente em leucemias, ou ainda para a detecção de infiltrados diminutos com predomínio de mastócitos.

Técnica - Triptase

Desparafinização:

- Passar por 4 cubas contendo xilol durante 5 minutos cada.
- Passar por 4 cubas contendo álcool etílico.
- Deixar por 5 minutos em uma cuba contendo PBS.
- Passar por 2 cubas contendo PBS com H₂O₂ 3% 5 minutos cada.
- Passar por 1 cuba contendo PBS para posteriormente iniciar a imunohistoquímica.

Recuperação antigênica:

- Colocar as lâminas em racks contendo ácido cítrico 0,21% PH 6.00. Colocar a cuba na panela de pressão e colocar um pouco de ácido cítrico na panela. (até +- a metade da cuba). Incubar durante 8 minutos após pegar pressão.
- Ao término do tempo pré-determinado, esperar abaixar a válvula de segurança da panela, abrir e retirar a cuba com as lâminas, deixar esfriar por aproximadamente 20 minutos.
- Retirar as lâminas da cuba contendo ácido cítrico, colocar nas bandejas e pingar PBS sobre as lâminas. Aspirar o excesso de PBS e instilar o anticorpo Tryptase (MAB 1222 Ms X Hu Mast Cell Tryptase - CHEMICON) na diluição de 1:15000, e incubar overnight.
- Lavar as lâminas com PBS com Tween, aspirar o excesso de PBS e instilar o "Post Primary Block – Novocastra REF.:7159 e incubar por 30 minutos.
- Lavar as lâminas com PBS com Tween, aspirar o excesso de PBS e instilar o " Polymer NovoLink – Novocastra REF.: 7161 e incubar por 30 minutos.
- Lavar as lâminas com PBS com Tween, aspirar o excesso de PBS e instilar o DAB (Diaminobenzidine tetra-hydrochloride – REF.: D-5637 – Sigma)

Preparo do DAB:

- 10 ml de Trisma; 10 mg de DAB; 0,2 ml de H₂O₂ 10%
- Instilar o DAB sobre as lâminas e incubar durante 5 minutos.
- Lavar com H₂O destilada abundantemente, contraporar com Hematoxilina, azulecer em H₂O amoniacal, desidratar em 6 cubas com álcool etílico absoluto, passar em 3 cubas contendo xilol e por último montar com resina permount.
- Rotular e entregar para ser analisada.

ANEXO 4. MASTÓCITOS

Os mastócitos foram descritos pela primeira vez por Ehrlich, em 1877. São células multifuncionais sendo a imunidade natural e adquirida a sua principal função. As pesquisas mais recentes concentram-se no estudo dos fatores teciduais e celulares que controlam o número e função dos mastócitos, já que suas propriedades são primordiais às funções de defesa do organismo. Os mastócitos derivam de células pluripotenciais da medula óssea e iniciam sua diferenciação sob a influência do fator de células tronco (*stem cell factor* – SCF) e da IL-3 de uma linhagem distinta dos monócitos e macrófagos e dos precursores dos granulócitos²¹.

Embora estas células mostrem muitas propriedades funcionais, elas realmente possibilitaram ser distinguidas usando critérios morfológicos. A identificação da imunoglobulina E: IgE (formada por proteínas específicas destinadas a reações imunológicas) e alta afinidade com receptores IgE dos mastócitos foi instrumento para o conhecimento do mecanismo de ação e o papel destas células na imediata resposta imunológica. Os mecanismos mediados por Ig-E assim como inúmeros outros estímulos, podem causar rápida liberação de vários mediadores da inflamação pelos mastócitos, sendo a histamina o mais conhecido.

Os mastócitos são reconhecíveis por métodos imunoenzimáticos pela detecção de quimase/triptase. Na microscopia eletrônica, são observados grânulos característicos que estocam aminas biogênicas, enzimas e proteoglicanos. Na célula adulta, os grânulos são menores, ajustam sua forma. A ativação dos mastócitos depende de receptores de alta e baixa afinidade para imunoglobulinas (FcεRI, FcγRII e FcγRIII), moléculas ligadas à imunoglobulina (interleucina, fragmentos do complemento) e a parasitas²¹.

Os mastócitos participam da iniciação da inflamação aguda e da reparação tecidual, bem como promovem as reações de anafilaxia (agudas e tardias) e ainda, estão associadas com condições proliferativas como mastocitose e mastocitoma, ambas relatadas em humanos e animais. Em murinos e humanos a aquisição de receptores de superfície e componentes intracelulares que caracterizam essas células como maduras ou totalmente diferenciadas, ocorre por um processo gradual realizado principalmente pelo SCF que se liga ao receptor tirosina-quinase *ckit* expresso na membrana dos mastócitos. O SCF é produzido por células endoteliais, fibroblastos e células epiteliais e age em conjunto com diversas citocinas que incluem IL-3, IL-4, IL-9, IL-10 e fator de crescimento neural (*nerve growth factor* – NGF). Os mastócitos são expostos continuamente ou seqüencialmente a esses fatores de crescimento. Além de expressarem o receptor *ckit*, os mastócitos expressam FcεRI e FcγRII/III nos estágios iniciais de desenvolvimento antes de exibirem a maturação granular completa para serem reconhecidos morfológicamente²¹.

Durante a maturação de mastócitos cultivados *in vitro*, há expressão de uma variedade de integrinas e receptores quimiotáticos. Essas moléculas de superfície são importantes na determinação da adesão e migração dos mastócitos para os tecidos. Os precursores dos mastócitos migram da circulação para os tecidos periféricos, onde se relacionam intimamente com vasos sanguíneos e linfáticos, nervos periféricos e superfícies epiteliais. A maturação dos mastócitos é altamente dependente dos fatores microambientais produzidos pelos tecidos nos quais eles residem²².

A morfologia dos mastócitos depende da sua localização. No tecido conjuntivo são arredondados, em aposição a vasos são alongados a ovóides e nas fibras dermais são fusiformes, estrelados ou filiformes. O mastócito maduro é uma célula relativamente grande, fusiforme, poligonal ou oval, de 15 a 20 μm com citoplasma levemente eosinofílico contendo grânulos no seu interior. O núcleo é basofílico, levemente excêntrico e relativamente grande, com 4 a 7 μm de diâmetro e múltiplos agregados de cromatina. Um ou mais nucléolos podem estar presentes. O mastócito é caracterizado por grânulos citoplasmáticos de 0,2 a 1,5 μm de diâmetro que ocupam 50 a 55% do citoplasma. Esses grânulos secretores caracterizam os mastócitos e possuem diversas formas: espiralados, cristalinos, ou em partículas. Pode existir um formato predominante ou a combinação deles. Os grânulos característicos dos mastócitos humanos contêm estruturas lamelares ou membranosas que estão dispostas em rolos cilíndricos semelhantes a papiros²¹.

Os mastócitos humanos são classificados principalmente pela presença de duas proteases neutras denominadas quimase e triptase. Possuem diversidade funcional e está relacionada com a morfologia e tamanhos dos grânulos. Estes possuem proteínas, predominantemente a triptase e quimase que compreendem 25% das proteínas celulares.

Mastócitos da pele, pulmão, útero, tonsilas e rim expressam *ckit*, CD9, CD29, CD43, CD44, CD49D, CD51, CD54, CD59 e CD63²¹. Os mediadores produzidos e liberados pelos mastócitos possuem diferentes atividades biológicas. Um mediador pode ter múltiplas funções, bem como vários deles podem ter funções similares²². Os mediadores pré-formados incluem aminas biogênicas como histamina e serotonina (essa última somente em ratos e camundongos), enzimas (triptase, quimase, carboxipeptidase, catepsina G, hidrolases ácidas, fosfolipase, aminopeptidase e hexoaminodase) e proteoglicanos (heparina e sulfato de condroitina). Os mediadores sintetizados incluem IL1 a IL8, TNF- α , IL-12, IL-13, IL-15, quimiocinas, fatores de crescimento e de angiogênese (VEGF e PDGF). Liberam ainda produtos do ácido araquidônico como as prostaglandinas e os leucotrienes

A ampla variedade de mediadores liberados pelos mastócitos permite desenvolver e modular diversos processos fisiológicos e patológicos. A reação anafilática demonstra o poder dos mastócitos na iniciação da resposta inflamatória; quando apropriadamente regulada e localizada, a ativação dessas células é significativamente benéfica²⁶. Os mastócitos também estão intimamente envolvidos com a patogenia da inflamação aguda, principalmente pela liberação da histamina: mediador de ação rápida liberado imediatamente após a ação do estímulo agressor provoca contração das células endoteliais venulares e conseqüente aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, tem destacada participação no mecanismo de formação do edema inflamatório, e ainda, participam dos processos de fibrose e remodelação tecidual. As áreas fibróticas possuem excesso de mastócitos, muitos dos quais estão desgranulados. Embora a produção de colágeno pelos fibroblastos é induzida por TNF- α e TGF- β , a histamina e heparina podem estimular o crescimento dos fibroblastos, síntese de colágeno e formação de cicatriz²².

ANEXO 5

Trabalhos publicados relacionados à erupção dentária

Referência	Material e métodos		Resultado
	Teste	Objeto da pesquisa	
PIERCE et al. ¹³ (1986)	Imunoistoquímica	IgE em ameloblastos na fase pós-secretora	Hipersensibilidade no local que o dente está irrompendo
THESLEFF ⁹ (1987); WISE; LIN ¹⁰ (1995); MARKS JR ¹⁸ (1996)	Imunoistoquímica	Sinais moleculares e expressão gênica das: IL-1, CSF-1, TGF- β e EGF	-
WISE; LIN ¹⁰ (1995); WISE ² (1998)		IL-1 α , CSF-1; monócitos	-
KISHI et al. ¹⁷ (1995)	Microscopia eletrônica (método: resina esmalte corrosiva)	Epitélio bucal e epitélio reduzido do órgão do esmalte	Densa rede de capilares; aumento da permeabilidade vascular e inflamação gengival marginal
LOURENÇO ³ (1997)	Morfológico e técnica de TUNEL Microscopia de luz	Lâmina dentária, bainha epitelial de Hertwig e epitélio reduzido do órgão de esmalte	-
MARKS et al. ¹⁸ (1996)	Bioquímico	Folículo dentário	Mudanças nas células proteínicas, enzimas e fator de crescimento
SHAPIRA et al. ¹⁹ (2003)	Imunoistoquímica (teste Elisa)	Citocinas inflamatórias (IL-1beta; IL-8 e TNF alpha) no fluido crevicular gengival de dentes irrompendo	Febre; distúrbio no sono; distúrbios gastrointestinais (diarréia); distúrbio de apetite
VERMA et al. ²⁰ (2005)	Análise morfolométrica Microscopia eletrônica	Tecido pericoronário	Maior número de vénulas, nervos e mastócitos

ANEXO 6

Trabalhos publicados sobre o assunto

Sinais e sintomas	NORONHA ²⁹ (1983)	WAKE et al. ²⁸ (2000)	MACKNIN et al. ³⁰ (2000)	JONES ³¹ (2002)	PERETZ et al. ³² (2003)	BANKOLE et al. ³³ (2004)	CUNHA et al. ³⁴ (2004)	BAYKAN et al. ³⁵ (2004)	SARREL et al. ³⁶ (2005)	TOTAL
L Dor		X								1
O Dor na gengiva				X						1
C Coceira na gengiva			X							1
A Irritação gengival	X						X			2
I Edema na gengiva									-	-
S Eritema									-	-
Necessidade de morder objetos		X	X							2
Salivação aumentada	X	X	X	X	X	X		X		7
Úlceras na língua				X						1
S Inapetência, dificuldade em se alimentar		X	X	X	X	X				4
I Convulsão		X								1
S Coriza nasal (secreção)		X					X			2
T Distúrbio sono; Insônia	X	X	X	X	X					4
Ê Alterações gastrointestinais (diarréia)	X	X			X	X			X	5
M Dor de ouvido		X								1
I Faces avermelhadas		X								1
C Infecção bacteriana								X		1
O Febre	X	X	X	X		X		X	X	6
S Inquietação								X		2
I Irritabilidade		X	X	X		X			X	4
Orelhas com prurido									X	1
Urina com odor		X								1
TOTAL	5	13	8	6	2	5	2	4	3	3

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Avery JK. Desenvolvimento e histologia bucal. 3th ed. São Paulo: Santos; 2005:87-155.
2. Wise GE. Discovery! Tooth eruption. *J Dent Res* 1998;77:1576-9.
3. Lourenço SQC. Apoptose na odontogênese durante a fragmentação da lâmina dentária e da bainha epitelial de Hertwig e no epitélio reduzido do órgão do esmalte: estudo pela técnica TUNEL modificada em camundongos. Bauru, 1997. 133 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
4. Consolaro A. Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. Maringá: Dental Press; 2005. 615 p.
5. Kronfeld R, Boyle PE. Reabsorção dentária. In: _____. *Histopatologia dos dentes*. Rio de Janeiro: Científica, 1955:297-322.
6. Obersztyn A. Experimental investigation of factors causing resorption of deciduous teeth. *J Dent Res* 1963;42:660-74.
7. Haralabakis NB, Yiagtzis SCH, TOUTOUNTZAKIS NM. Premature or delayed exfoliation of deciduous teeth and root resorption and formation. *Angle Orthod* 1994;64:151-7.
8. Lourenço SQC, Consolaro A. Apoptosis in odontogenesis: dental lamina, Hertwig's epithelial sheath and reduced ameloblasts. *J Dent Res* 1997;76. Special issue. Abstract n. 855.
9. Thesleff I. Does epidermal growth factor control tooth eruption? *J Dent Child* 1987;54:321-9.
10. Wise GE, Lin F. The molecular biology of initiation of tooth eruption. *J Dent Res* 1995;74:303-6.

11. McIntyre GT, McIntire GM. Teething troubles? *Br Dent J* 2002;192:251-5.
12. McDonald RE, Avery DR Erupção dentária: fatores locais, sistêmicos e congênitos que influenciam o processo. In: _____. *Odontopediatria*. 7th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;2000:129-50.
13. Pierce AMP, Lindskog S, Hammarström L. IgE in postsecretory ameloblasts suggesting a hypersensitivity reaction at tooth eruption. *J Dent. Child* 1986;53:23-6.
14. Magnusson B. Tissue changes during molar tooth eruption. In: Pierce AMP, Lindskog S, Hammarström L. IgE in postsecretory ameloblasts suggesting a hypersensitivity reaction at tooth eruption. *J Dent. Child* 1986;53:23-6.
15. Tasanen A. General and local effects of the eruption of deciduous teeth. In: Pierce AMP, Lindskog S, Hammarström L. IgE in postsecretory ameloblasts suggesting a hypersensitivity reaction at tooth eruption. *J Dent. Child* 1986;53:23-6.
16. Schonfeld SE, Herles S. In vitro and in vivo autoimmune response to enamel matrix protein. In: Pierce AMP, Lindskog S, Hammarström L. IgE in postsecretory ameloblasts suggesting a hypersensitivity reaction at tooth eruption. *J Dent. Child* 1986;53:23-6.
17. Kishi Y, Takahashi K, Trowbridge HO. Changes in the vascular network of the oral epithelium and reduced enamel epithelium during tooth eruption. *Acta Anat* 1995;153:168-80.
18. Marks Jr SC, Schroeder H. Tooth eruption. Theories and facts. *Anat Rec* 1996; 245:374-93.
19. Shapira J. et al. Cytokine levels in gingival crevicular fluid of erupting primary teeth correlated with systemic disturbances accompanying teething. *Pediatr Dent* 2003;25:441-8.

20. Verma DK, Nair PN, Luder HU. Quantitative histological features and ultrastructural of opercula of human teeth showing normal and delayed eruption. *J Oral Pathol Med.* 2005;34:109-15.
21. Dvorak AM Human mast cells: Advances in anatomy, embriologi and cell biology, Berlin: Springer-Verlag. 1989.
22. Metcalfe D, Baram D, Mekori YA Mast cells. *Physiological Reviews*1997; 77:1033-79.
23. Carranza FAJ, Cabrini RL. Mast cell in human gingival. *Oral Surg* 1955;8:1093-9.
24. Kobayasi T, Midtgard K, Asboe-Hansen G. Ultrastructure of human mast cell granules. *J Ultrastruct Res* 1968:153-65.
25. Barnett ML. Mast cell in the epithelial layer of human gingival. *J Ultrastruct Res*1973;43:247-55.
26. Walsh LJ. Mast cells and oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:188-98.
27. Walls AF, Jones DB, Williams JH, Church MK, Holgate ST. Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase. *J Pathol* 1990; 162:119-26.
28. Wake M, Hesketh K., Lucas J. Teething and tooth eruption in infants: A cohort study. *Pediatrics* 2000; 106:1374-9.
29. Noronha JC. Alguns aspectos da erupção dentária e suas manifestações bucais na criança. Belo Horizonte, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. 1983 (Tese) 51p.
30. Macknin ML, Piedmonte M, Jacobs J, Skibinski C. Symptoms associated with infant teething: a prospective study. *Pediatrics* 2000;105:p747-52.

31. Jones M. Teething in children and the alleviation of symptoms. *J. Fam Health Care*. 2002; 12:12-3
32. Peretz, B.; Ram, D.; Hermida, L.; Otero, M.M. Systemic manifestations during eruption of primary teeth in infants. *J Dent Child*. 2003;70:170-3.
33. Bankole OO, Denloye OO, Aderinokun GA. Attitude, beliefs and practices of some Nigerian nurses toward teething in infants. *Odontostomatol. Trop* 2004;27:22-6.
34. Cunha RF, Pugliesi DM, Garcia LD, Murata SSI. Systemic and local teething disturbances: prevalence in a clinic for infants. *J Dent Child* 2004;71:24-6.
35. Baykan Z, Sahin F, Beyazova U, Ozçakar B; Baykan, A. Experience of Turkish parents about their infants' teething. *Child Care Health Dev* 2004; 30:331-6
36. Sarrell EM, Horev Z, Cohen Z, Cohen HA. Parents' and medical personnel's beliefs about infant teething. *Patient Educ. Couns* 2005;57:122-5.