

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**ESTUDO DOS LINFÓCITOS CD20, CD8 E CD4 NAS  
HIPERPLASIAS INFLAMATÓRIAS E SUA RELAÇÃO COM A  
INFECÇÃO POR *CANDIDA sp.***

Cristiano Macabú Badauy

DISSERTAÇÃO APRESENTADA COMO PARTE DOS REQUISITOS  
OBRIGATÓRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE  
EM ODONTOLOGIA NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM  
PATOLOGIA BUCAL

Prof. Dr. João Jorge Diniz Barbachan

Orientador

Porto Alegre, Agosto de 2003.

Dedico este trabalho e faço meus agradecimentos:

A Deus pelo dom da vida, pela saúde e por iluminar os meus caminhos.

Aos meus pais Jamil e Amarílis pelo amor que sempre tiveram por mim e pelo apoio em todos os momentos.

À minha irmã, Gisele, pelas palavras de força e perseverança.

Ao meu orientador, professor Dr João Jorge Diniz Barabachan, pelo carinho paternal que me dispensou.

Aos professores Drs Pantelis e Manoel, exemplos de dedicação a esta faculdade e pela compreensão nos momentos em que não pude estar presente na pós graduação.

Aos colegas de mestrado Cristina, Paula, Cristiane, Ricardo e Vinícius pela amizade e convivência nestes 2 anos.

Às laboratoristas Isabel e Bianca que, pelo seu excelente trabalho, permitiram a realização deste estudo.

Às funcionárias da administração D. Lourdes e Marilise, pelo apoio.

Às bibliotecárias Norma e Heloísa pela disponibilidade e atenção.

Aos colegas da Policlínica Militar de Porto Alegre, especialmente aos seguintes oficiais dentistas: Major Cláudio, pelo apoio durante todo o curso; Capitão Daniel, pelo seu exemplo de caráter e de amizade. Aos colegas da clínica, que sacrificaram seus próprios horários para que eu pudesse estar presente em algumas aulas, tenentes Stella, Mariana, Patrícia, Renner, Liane Galvão, Dilli e Gelson.

Aos eternos amigos da cidade de Manhumirim (MG) que, apesar da distância, mantiveram uma torcida constante para que eu pudesse concluir este curso.

## RESUMO

O objetivo do presente estudo é mapear e quantificar as populações de células CD 20, CD 8 e CD 4+ em Hiperplasias inflamatórias (HI) e estabelecer relação com a infecção por *Candida sp.* Foram utilizados 41 casos de HI do Laboratório de Patologia Bucal da UFRGS. Novos cortes de todos os casos foram submetidos à técnica de coloração do PAS, criando – se 2 grupos: com e sem infecção por *Candida sp.* Seguiu – se a marcação imunohistoquímica com os anticorpos monoclonais anti CD 20, anti CD 8 e anti CD 4, para se avaliar a localização, a distribuição e quantificação das células positivamente marcadas em 3 campos consecutivos (400x), escolhidos sobre a área de maior concentração do infiltrado inflamatório. Os resultados da recontagem dos campos mostraram que o examinador estava calibrado pelo teste “t” de Student. As células CD 8+ apresentaram localização próxima às hifas de *Candida sp.* e foram mais numerosas no grupo com infecção (diferença estatisticamente significativa  $p= 732 \times 10^{-20}$ ). As células CD 20 e CD 4 positivas não apresentaram relação com a infecção por *Candida sp.* Concluiu – se que as células CD 8+ apresentaram localização relacionada às hifas de *Candida sp.*, além de uma razão células positivamente marcada/ linfócitos totais estatisticamente mais alta no grupo com infecção por *Candida sp.*

## ABSTRACT

The aim of this study is register and quantify the CD 20, CD 8 and CD 4+ lymphocyte population in inflammatory hiperplasia (IH) and to establish a relationship with Candida infection. 41 cases of the IH from the Laboratory of Oral Pathology of the UFRGS were stained with PAS for Candida evidenciation and dividided into two groups: infected and control. After immunoreaction with monoclonal antibodies, the localization and distribution of the marked cells was appraised. The lymphocyte positive were quantified in 3 consecutive fields (400x), where the inflammatory infiltration was concentrated. The researcher was calibrated for Student's "t" test ( $p < 0,05$ ). The CD 8+ were near of the fungi hiphae, and were more numerous in the infected group ( $P < 0,05$ ). The CD 4+ and CD 20+ cells did not show relashionship with Candida infection. It was conclude that CD 8+ cells presented localization related with candida hiphae, and a more pronounced ratio positive cells/lymphocyte in the *Candida sp.* infected group.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01 – Fotomicrografia mostrando a hifa de *Candida sp.* penetrando o epitélio de uma lesão de hiperplasia inflamatória. (coloração pelo PAS, aumento aproximado de 400x).....27
- FIGURA 02 – Fotomicrografia mostrando infiltrado com distribuição focal (marcação com anticorpo anti – CD 20; aumento aproximado de 100x).....29
- FIGURA 03 - Fotomicrografia mostrando infiltrado com distribuição difusa (marcação com anticorpo anti – CD 20; aumento aproximado de 100x).....30
- FIGURA 04 - Fotomicrografia mostrando os critérios de positividade: marcação completa da membrana celular, presença de núcleo e morfologia de linfócito. (marcação com anticorpo anti – CD 8; aumento aproximado de 400x).....32

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Comparação das médias / desvios padrão entre os grupos com infecção e controle para marcação com anti – CD 20.....36

TABELA 02 - Comparação das médias / desvios padrão entre os grupos com infecção e controle para marcação com anti – CD 8..... 37

TABELA 03 - Comparação das médias / desvios padrão entre os grupos com infecção e controle para marcação com anti – CD 4.....38

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01 - Comparação da contagem de células CD 20 positivas e dos linfócitos totais entre os grupos com e sem infecção.....	35
GRÁFICO 02 - Comparação da contagem de células CD 8 positivas e dos linfócitos totais entre os grupos com e sem infecção.....	36
GRÁFICO 03 - Comparação da contagem de células CD 4 positivas e dos linfócitos totais entre os grupos com e sem infecção.....	37

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	2
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABELAS.....	6
LISTA DE GRÁFICOS.....	7
INTRODUÇÃO.....	9
REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1 Distribuição das células do infiltrado na Hiperplasia Inflamatória.....	11
2 Relação entre a Candidíase e a Hiperplasia Inflamatória.....	14
3 Funções dos linfócitos na resposta imunitária.....	20
PROPOSIÇÃO.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
1 Obtenção da amostra.....	27
2 Preparação da amostra para análise.....	27
3 Análise qualitativa.....	29
4 Análise quantitativa.....	31
RESULTADOS.....	35
1 Descrição da amostra.....	35
2 Análise qualitativa.....	35
3 Análise quantitativa.....	36
DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS: Anexo 01 – Técnica de coloração da Hematoxilina – eosina.....	54
Anexo 02 – Técnica de coloração do PAS.....	55
Anexo 03 – Técnica de Imunohistoquímica.....	56
Anexo 04 - Avaliação quantitativa.....	59
Anexo 05 - Avaliação quantitativa.....	65



## INTRODUÇÃO

As hiperplasias inflamatórias são um grupo de lesões do tecido conjuntivo fibroso e do tecido epitelial caracterizadas por crescimentos submucosos que podem se ulcerar secundariamente quando traumatizadas, mostrando a coloração normal da mucosa ou levemente avermelhada (REGEZI, SCIUBBA 1991).

A hiperplasia inflamatória caracteriza-se pela proliferação tecidual devido ao aumento na velocidade de divisão celular com manutenção do padrão morfofuncional do tecido (PINTO et al. 1996). Na maioria dos casos apresenta-se clinicamente como lesão elevada, consistência firme e base séssil ou pediculada (COUTINHO, SANTOS 1998).

Diversos pesquisadores atribuíram diferentes nomes à hiperplasia inflamatória, como *épulis fissuratum*, fibroma irritativo, estomatite protética, hiperplasia fibrosa, hiperplasia fibro-epitelial e hiperplasia por prótese (CUTRIGHT, 1974; BASSI et al.1998; ZANETTI et al.,1996).

Entre os agentes etiológicos destaca-se o uso de prótese total desadaptada, que exercendo trauma constante sobre a mucosa bucal gera uma reação inflamatória crônica (FLORES 1998). Para alguns autores a quantidade de células inflamatórias presentes na hiperplasia inflamatória é proporcional ao traumatismo exercido sobre a lesão, mas os critérios utilizados para quantificar as células inflamatórias são subjetivos, uma vez que utilizam termos como intenso ou moderado, sem definir critérios para utilização dos mesmos. (LUCAS 1976; PRIDY 1992; BASSI, VIEIRA, GABRIELI 1998).

Esta reação inflamatória favorece a superposição de outros agentes como a *Candida*, que ocorre em cerca de 85 % dos pacientes que usam prótese total (BARBACHAN,

DOMINGUES, RADOS 1996). A análise do padrão microscópico da hiperplasia inflamatória mostra variação desde uma proliferação fibrosa até um aspecto predominante de células inflamatórias (COELHO e ZUCOLOTO 1998).

O infiltrado inflamatório destas lesões é semelhante ao das inflamações crônicas (COELHO, ZUCOLOTO 2000), composto basicamente de células mononucleares (KIGNEL et al. 1999), sendo os linfócitos as células mais numerosas, e também as mais ativamente envolvidas na resposta imune (BOGLIOLO 1994 ; PINTO et al. 1997).

A presença de infiltrado inflamatório é uma das características microscópicas freqüentemente vistas nas hiperplasias inflamatórias (TIECKE 1965; SHAFER, HINE, LEVY 1985; DRUMMOND, NEWTON, YEMM 1995), entretanto os padrões microscópicos das células inflamatórias variam quanto à sua distribuição em difusa e focal, e quanto à localização, que pode ser: penetrando no epitélio, na camada subepitelial ou profundamente no tecido conjuntivo (SPOUGE 1973; NEVILLE et al. 1995).

Sabendo-se que a infecção por *Cândida sp.* ativa a resposta imune, o objetivo do presente trabalho é caracterizar a população de linfócitos CD 20, CD 8 e CD 4 positivos nas hiperplasias inflamatórias e verificar a sua relação com a infecção por este agente.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS DO INFILTRADO NA HIPERPLASIA INFLAMATÓRIA

Tyldesley (1974) constatou que a hiperplasia inflamatória dos tecidos da boca pode ocorrer como uma resposta ao traumatismo crônico exercido pela borda de uma prótese sobrestendida e que a remoção do fator irritante é suficiente para reduzir consideravelmente o tamanho da lesão num curto período de tempo.

De acordo com Bogliolo (1994), o número de linfócitos presentes no tecido depende dos estímulos induzidos pelo agente inflamatório, sendo maior com participação da resposta imunitária. Nas inflamações crônicas, caso das hiperplasias inflamatórias, os linfócitos T podem ser ativados e proliferar, adquirindo o aspecto morfológico de imunoblastos, enquanto as células B diferenciam-se em plasmócitos. Estas transformações indicam que há participação das respostas imunitárias celular e humoral no tecido inflamado e que esta influencia a evolução das inflamações.

Cutright (1975) afirmou que a extensão da hiperplasia que ocorre no palato varia com a intensidade do fator irritante e se modifica com o aumento da duração da lesão. No início da lesão o infiltrado inflamatório pode envolver completamente o tecido conjuntivo ao redor das papilas dérmicas. Numa etapa posterior a reação inflamatória diminui no ápice das papilas e aumenta na porção mais profunda das cristas epiteliais. A inflamação crônica estimula a proliferação epitelial e deposição de colágeno no tecido conjuntivo. Com o aumento da acantose do epitélio e diminuição do seu suprimento sangüíneo surgem fendas

no tecido que permitem a passagem de toxinas bacterianas, restos celulares e partículas alimentares que perpetuam a reação inflamatória.

Cutright (1974) em estudo microscópico de 583 casos de hiperplasia inflamatória observou que a reação inflamatória foi mais intensa diretamente sob a borda da prótese total e onde a camada muscular foi traumatizada os feixes de fibras musculares apresentaram um infiltrado inflamatório intenso, rico em células mononucleares.

Budtz - Jorgensen, Theilade, Theilade (1983) propuseram que o uso de uma prótese total desadaptada, além de traumatizar o tecido de suporte promove a retenção de microorganismos no biofilme localizado entre a base da prótese e o tecido, os quais desempenham um papel significativo na manutenção da hiperplasia inflamatória pela associação do trauma a um agente imunogênico.

Por outro lado Feltrin et al. (1993) estudaram 17 pacientes desdentados totais e portadores de prótese total removível, sendo 8 com mucosa clinicamente normal e o restante com hiperplasia inflamatória. O estudo foi realizado através do exame da mucosa palatina, avaliação da superfície da prótese em contato com a mucosa em microscópio eletrônico de varredura e exame histopatológico. Os resultados da microscopia eletrônica de varredura mostraram que a superfície da resina se mostrava totalmente coberta pela placa e seu padrão de organização não diferia nos pacientes com e sem hiperplasia. O exame histopatológico mostrou atrofia do epitélio, distúrbios da ceratinização e um intenso infiltrado inflamatório com localização perivascular e subepitelial nas biópsias de pacientes com lesão, em contraste com as raras células inflamatórias observadas nas biópsias dos pacientes sem lesão. A pesquisa de *Candida* pelo método PAS foi negativa em todos os pacientes, donde concluíram que o trauma provoca a perda de integridade do epitélio facilitando a ação de

enzimas microbianas nos tecidos e provocando uma reação inflamatória que leva ao desenvolvimento da lesão.

Um estudo microscópico em hiperplasias inflamatórias por prótese mostrou que a maioria dos linfócitos se acumula na camada subepitelial, enquanto algumas células penetraram o epitélio e o aumento do seu número dentro do epitélio mostrou uma correlação significativa com a intensidade do eritema do palato, que é o critério clínico da severidade desta lesão (BERGENDAL, ISACSSON 1983).

Flores (1998) descreveu na hiperplasia inflamatória um infiltrado inflamatório rico em linfócitos e plasmócitos, com número variável de células localizado na porção papilar do tecido conjuntivo fibroso, como características microscópicas presentes nesta lesão.

Johannessen et al. (1986) demonstraram que o infiltrado inflamatório nas hiperplasias por prótese é composto principalmente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Os linfócitos T são as células inflamatórias mais abundantes e se concentram principalmente na zona papilar do tecido conjuntivo, próximo à membrana basal. Estes pesquisadores concluíram que esta reação inflamatória complexa é muito semelhante ao quadro histológico presente nas lesões crônicas da gengiva e do periápice.

Badauy, Barbachan e Rados (2002) estudaram as características microscópicas presentes em 25 casos de Hiperplasia inflamatória, como resultados prévios do presente estudo, e concluíram que o infiltrado inflamatório presente nestas lesões é composto principalmente de linfócitos e plasmócitos distribuídos de forma focal e localizados na camada subepitelial. Quando havia o predomínio de polimorfonucleares neutrófilos, eles se localizavam no interior do epitélio formando microabcessos.

## 2. RELAÇÃO ENTRE CANDIDÍASE E HIPERPLASIA INFLAMATÓRIA

Reichart, Althoff (1982) afirmaram que a etiologia da hiperplasia inflamatória por prótese é multi-fatorial, destacando se como causas mais importantes a infecção por *Candida albicans*, a irritação mecânica devida ao mal assentamento da prótese e oclusão desbalanceada e a resposta tecidual ao material da prótese.

Axelsen (1973) realizou estudos sorológicos em pacientes com hiperplasia inflamatória por prótese e obteve títulos aumentados de anticorpos contra *Candida albicans*. Concluiu que a grande maioria de pacientes que usam prótese total apresenta também infecção pelo fungo.

Com o objetivo de esclarecer a etiologia da hiperplasia inflamatória Budtz - Jorgensen; Bertram (1970) estudaram 116 pacientes portadores de prótese total removível igualmente distribuídos em 2 grupos: um grupo com mucosa bucal normal e outro grupo com hiperplasia inflamatória localizada no palato. Foram avaliados a qualidade do suporte mucoso, pesquisa por *Candida sp.* através da raspagem da mucosa do palato e da língua submetidos à técnica de coloração do PAS e realização de moldagem seguida de cultura. Os resultados mostraram que a qualidade do suporte mucoso (quanto mais desenvolvido o processo alveolar e menos compressível a mucosa) estava relacionada com a menor prevalência da lesão. A pesquisa por fungos no raspado da mucosa da língua e do palato mostrou a sua presença em 40 % dos pacientes do grupo controle e em 90 % do grupo com lesão, sendo que neste grupo o número de hifas e micélios foi invariavelmente maior. A cultura das moldagens mostrou que em 30 dos 33 casos de inflamação localizada e hiperplasia de palato houve crescimento de colônias de fungos na área das lesões.

Em contrapartida, Cannon et al. (1995) afirmaram que o isolamento de qualquer espécie de *Cândida* da cavidade bucal, sem evidência clínica de lesão, não deve ser considerado infecção. Na presença de fatores predisponentes, como: redução do fluxo e do pH salivar, aumento de consumo de glicose e uso de prótese removível desadaptada, este fungo antes comensal, e encontrado isoladamente, assume a forma de hifas e se torna patogênico. Entre 25 e 65 % dos pacientes que usam próteses removíveis apresentam a forma atrófica da candidíase, que se manifesta clinicamente como área eritematosa e ocasionalmente hiperplásica na área de suporte mucoso da prótese. Histologicamente observa – se a penetração do fungo através da camada córnea até o estrato espinhoso do epitélio, e infiltrado de neutrófilos e linfócitos .

Fotos, Vincent, Hellstein (1992) estudaram 100 pacientes com diagnóstico clínico de candidíase, que foi confirmado através da raspagem de 4 sítios da mucosa bucal dos pacientes, coloração com PAS modificado e observação de blastóforos ou hifas junto às células epiteliais. As lesões mais freqüentes na mucosa bucal foram: eritema (60 casos), placas brancas removíveis (36 casos), áreas de hiperkeratose resistentes à raspagem (24 pacientes) e úlceras (20 pacientes). As lesões hiperplásicas ou hiperkeratóticas resistentes ao tratamento com antifúngicos devem ser biopsiadas para confirmar a presença de pseudohifas invadindo o epitélio (o que pode ser considerado um comportamento patogênico) e excluir a possibilidade de uma neoplasia.

Barbachan et al. (1995) realizaram um estudo em 9 pacientes portadores de prótese total removível com hiperplasia inflamatória. Um grupo de 4 pacientes teve suas próteses substituídas e recebeu orientação de higiene bucal e de como desinfetar as próteses, enquanto o outro grupo (5 pacientes) recebeu as mesmas instruções e teve suas próteses reembasadas. Em ambos os grupos houve melhora do quadro clínico, mais rápida com a

substituição da prótese, mostrando o caráter multi-fatorial desta patologia (trauma e infecção pela *Candida*), pois ao se corrigir a desadaptação e combater o fungo houve melhora da lesão.

Bergendal, Holmberg (1982) estudaram a associação Candidíase/ hiperplasia inflamatória e concluíram que os pacientes que faziam uso de prótese total e apresentavam estomatite eram mais suscetíveis à contaminação local e infecção pela *Candida albicans*, pois o espaço entre a prótese e o tecido de suporte funcionam como reservatório para o fungo e facilitam a sua proliferação com a infecção subsequente do tecido bucal localizado sob a prótese.

Budtz - Jorgensen (1970) avaliou 122 pacientes portadores de prótese total, sendo 64 com estomatite protética e 58 pacientes com mucosa clinicamente sadia. Os pacientes do grupo estomatite e 16 pacientes do grupo controle foram biopsiados antes e 1 mês após o tratamento com antifúngicos e substituição das próteses e foi realizada a associação entre o aspecto clínico, a presença de hifas e a localização e intensidade do infiltrado de linfócitos. Apenas 1 espécime do grupo com mucosa clinicamente normal mostrou infiltrado intra epitelial apenas na camada basal. Os pacientes com infecção clinicamente branda mostraram infiltrado de leucócitos na camada basal do epitélio em 15 casos mas apenas em 1 caso se observou hifas de *Candida*. Os pacientes com infecção generalizada (24) mostraram infiltrado de linfócitos na camada basal e subepitelial de intensidade variável e a presença de hifas em 20 casos ( micélio em 12 e hifas simples nos 8 restantes). Os pacientes com hiperplasia (25 casos) mostraram infiltrado intra epitelial e um denso infiltrado subepitelial de linfócitos e em 19 pacientes se observou hifas ( micélio em 15 casos). O autor concluiu que em 41 casos a *Candida sp.* foi a responsável pela inflamação da mucosa enquanto o trauma foi responsável pelos outros 23 casos e que houve uma relação estatisticamente



significante entre a presença de hifas e a intensidade do infiltrado e penetração de linfócitos no epitélio

Pacientes portadores de próteses parciais ou totais mucosuportadas frequentemente apresentam alterações patológicas da mucosa de suporte e estas alterações se dão sob a forma de estomatite protética que evolui para hiperplasia inflamatória, que é uma doença multifatorial, dependente do trauma e da presença de placa (que está associada a má higiene bucal). Um estudo realizado em 30 pacientes portadores de prótese total superior e com estomatite protética mostrou que 90 % destes pacientes não tomavam nenhum cuidado especial com a higiene e desinfecção da prótese. O tratamento realizado através de instrução de higiene e desinfecção da prótese seguido da substituição ou ajuste oclusal e reembasamento da prótese levou à cura clínica em 27 casos e nos outros 3 diminuiu a severidade da lesão (WALBER, RADOS 2000).

Barbachan, Domingues, Rados (1996) submeteram 20 casos de biópsias de hiperplasia inflamatória à técnica de coloração pelo PAS a fim de evidenciar a presença de glicoproteínas em várias formas de *Candida*. Os resultados mostraram que em 85 % das hiperplasias inflamatórias estudadas o fungo estava presente no epitélio, mas a densidade das células inflamatórias no tecido conjuntivo não estava relacionada à presença ou ausência da *Candida*.

Williams et al. (1997) estudaram as células presentes no infiltrado inflamatório de 10 lesões de hiperplasia inflamatória por *Candida* e concluíram que os linfócitos T foram o tipo celular predominante em 7 espécimes, representando 53,9 % das células contadas. Sua distribuição era focal ou difusa em igual número de casos, enquanto as células B, em número reduzido, predominaram na região superior do tecido conjuntivo em distribuição focal. Concluíram que o número de hifas de *Candida* não está relacionado com a intensidade nem

com a composição do infiltrado inflamatório o que pode indicar uma resposta comum à presença do fungo.

Um estudo realizado em 7 pacientes HIV positivos que possuíam hiperplasia inflamatória no palato, mas sem o uso de prótese total mostrou que a lesão, nestes casos, estava associada à presença de *Candida albicans*. O reservatório do fungo foi o dorso da língua destes pacientes que desenvolveram uma reação inflamatória na mucosa palatina caracterizada por tecido conjuntivo fibroso e hiperplásico onde se acumulava um infiltrado moderado de células inflamatórias (REICHART et al. 1994).

Katou et al. (1999) usaram o método da estreptoavidina - biotina para marcar linfócitos em enxertos de pele realizados na mucosa bucal de 20 pacientes tratados com cirurgia radical para remoção de tumores intra - bucais. Os espécimes foram submetidos à coloração por PAS para pesquisa e contagem das hifas de *Candida albicans* e na comparação dos resultados observaram que o número de células CD 4 e CD 8 positivas aumentou nos enxertos com *Candida* em relação aos que não apresentaram o fungo, enquanto o número de células CD 20 positivas permaneceu imutável. Concluíram que o número e a distribuição das células inflamatórias não diferiu no enxerto de pele sem *Candida* e na epiderme normal, mas diferiu dos enxertos que apresentaram o fungo apesar do número e distribuição não diferirem com o aumento do número de hifas.

Entretanto a *Candida albicans* também é um microrganismo presente na cavidade bucal de indivíduos com mucosa clinicamente sadia. Rindum, Stenderup, Holmstrup (1994) realizaram biópsia da cavidade bucal de 21 pacientes com candidíase eritematosa e raspagem da mucosa palatina, da língua e da bochecha de 100 pacientes com mucosa clinicamente normal e dos pacientes com lesão. Colônias de fungos foram isoladas do raspado de células da bochecha, palato mas principalmente da língua em 67 % dos casos nos pacientes com

mucosa normal enquanto os pacientes com candidíase eritematosa apresentaram fungo em 100 % dos casos e a *Candida* foi a principal espécie isolada (presente em mais de 94 % dos casos). Hifas foram detectadas nos cortes histológicos corados pelo PAS em 76 % dos casos de candidíase eritematosa. Os autores concluíram que colônias de *Candida* podem estar presentes no epitélio da cavidade bucal de pacientes com mucosa clinicamente normal obtidos através de raspagem da mucosa.

Nagai, Takeshita e Saku (1992) estudaram as alterações na mucosa bucal de 18 pacientes com diagnóstico clínico de candidíase, que foram submetidas à técnica do PAS para identificação da *Candida*. Os resultados mostraram 15 dos casos com hiperplasia epitelial, com hifas penetrando na camada paraceratinizada mas poucas na camada espinhosa. O epitélio de revestimento mostrou grau variado de paraceratose e acantose, células espinhosas com citoplasma eosinófilo e perda da definição do espaço intercelular e das pontes intercelulares. Observaram um infiltrado inflamatório de neutrófilos e linfócitos, no tecido conjuntivo adjacente à área infectada. Concluem que há uma diminuição da espessura do epitélio nos estágios iniciais da infecção pela *Candida* seguido de um aumento da espessura deste tecido.

Por outro lado a presença de hifas de *Candida* pode ativar a resposta imune e ocasionar alterações nos tecidos da cavidade bucal. Neste sentido, Eversole et al. (1997) estudaram a relação entre as populações linfocitárias, a infecção por *Candida* e as respostas dos queratinócitos da mucosa bucal de 15 pacientes HIV positivos e 10 controles normais. A detecção da *Candida* foi realizada pela técnica do PAS e a contagem do infiltrado inflamatório foi feita em 2 campos randomizados com aumento de 160 vezes. Nas lesões eritematosas houve uma perda da camada ceratinizada, restringindo – se a 2 ou 3 células paraceratinizadas, enquanto havia microabscessos com numerosos neutrófilos na camada

espinhosa. Os linfócitos, de tamanho variado, acumulavam – se no tecido conjuntivo. Na forma pseudomembranosa da Candidíase, as células epiteliais perdiam sua adesividade e estavam penetradas por numerosas hifas, com uma discreta acantose. Havia linfócitos intra epiteliais e no tecido conjuntivo subjacente, sendo os últimos muito mais numerosos e constituídos de uma mistura de células B e T.

Heimdahl, Nord (1990) discutiram o mecanismos de defesa imunológica contra infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos. Afirmaram que o principal mecanismo de defesa contra *Candida sp.* é a resposta imune inespecífica representada por neutrófilos e macrófagos.

### 3. FUNÇÕES DOS LINFÓCITOS NA RESPOSTA IMUNITÁRIA

A resposta imunológica é uma complexa série de eventos biológicos interrelacionados, cuja função primária é proteger o organismo de elementos a ele estranhos, através da sua neutralização e eliminação. Os linfócitos são as células mais importantes do sistema imunológico e por exercerem diferentes funções se diferenciam em subpopulações especializadas. As moléculas que identificam estas subpopulações, conhecidas como CD (cluster of differentiation) servem como importante fator de adesão entre células T e as células apresentadoras de antígeno, através da afinidade bioquímica entre estas moléculas e as moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade, e também como marcadores de classes. (PINTO et al, 1997).

De acordo com Siqueira Jr., Dantas (2000), os linfócitos são as células mais importantes da resposta imune adaptativa e suas funções incluem respostas contra microrganismos, rejeição de enxertos, reação de hipersensibilidade retardada tipo 4, modulação da atividade de outras células do sistema imune e produção de imunoglobulinas. Dentro das subpopulações de linfócitos, as células B são importantes na resposta imune humoral, onde reconhecem o antígeno e se diferenciam em plasmócitos, que vão sintetizar as imunoglobulinas. As células T são responsáveis pela resposta imune celular, ativando linfócitos B e macrófagos (auxiliar, CD4), lisando células infectadas e células tumorais ou exercendo atividade reguladora do sistema imune (citotóxico, CD8).

O tecido inflamado cronicamente caracteriza-se pela presença de infiltrado de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos), que reflete uma reação persistente à agressão, além de destruição tecidual induzida pelas células inflamatórias e tentativas de reparação por fibrose e angiogênese. Os linfócitos são mobilizados nas reações imunológicas mediadas por células, nas mediadas por anticorpos e também na resposta imune inespecífica (COTRAN et al. 1994).

A resposta imune envolve mecanismos de reconhecimento do patógeno e elaboração de uma reação dirigida a este elemento, que é executada principalmente através dos linfócitos (ROITT, BRUSTOFF, MALE 1999).

CD4 e CD8 são glicoproteínas da superfície celular expressas primariamente em tímócitos e células T maduras. Linfócitos T que expressam CD4 são auxiliares ou indutores, enquanto os que expressam CD8 são citotóxicos e a razão CD4/ CD8 no timo, sangue periférico e linfonodos normais é de 2 para 1. Alteração na razão das células T pode ser a manifestação da fase efetora não específica da resposta imune ao invés de eventos induzidos por antígenos e pode ser vista nas doenças autoimunes, nas imunodeficiências, na

inflamação crônica e em malignidades. Entretanto a proporção alterada vista em lesões periapicais sugere que mecanismos imunoreguladores podem contribuir para a patogênese e manutenção da periodontite apical crônica (MARTON, KISS 1993).

Os linfócitos B podem ser reconhecidos através de imunoglobulinas localizadas na superfície celular. Outro marcador importante é a molécula B1, que marca canais de cálcio, conhecido como CD 20. Os linfócitos B possuem função de produção de anticorpos (ao se diferenciarem em plasmócitos) e de células de memória imunológica. (SOL et al., 1998).

Maiese et al. (1995) estudaram a razão linfócitos T CD4 positivos/ CD8 positivos e a proporção de células B (CD19 e CD20) em biópsias de linfonodos de 62 pacientes. Observaram que as células CD4 positivas corresponderam a 42 +- 15% do total de células enquanto as CD8 positivas 15 +- 10% com uma razão CD4/ CD8 de 3,9 +- 2,6. As células B CD20 positivas corresponderam a 43 +- 18% das células avaliadas e as células T superaram as células B em 66 % dos casos, em 1 se equivaleram e no restante as células B predominaram sobre as células T.

Um estudo das células inflamatórias em lesões periapicais humanas mostrou que os linfócitos representam 52 % das células destas lesões, e os linfócito T estiveram presentes numa proporção de 2 para 1 em relação aos linfócitos B. Dentro da subpopulação de linfócitos T, as células CD4 (auxiliares) são importantes na iniciação e manutenção da produção de imunoglobulinas, enquanto as CD8 (supressores/ citotóxicos) suprimem reações imunológicas e podem estar envolvidas na regulação da produção local de anticorpos em granulomas e cistos periapicais (KOTIAINEM, RANTA, LAUTESNSCHLAGER 1986).

Hahn (1989) estudou células B e T em patologias pulpares, e observou que o número de linfócitos aumentava significativamente dos grupos polpa normal para pulpíte reversível e deste para o grupo pulpíte irreversível. As proporções de células B/T e CD4/CD8

aumentaram de forma semelhante, o que sugere mudanças imunológicas em resposta à agressão antigênica continuada. Portanto, quanto mais células CD4 estiverem presentes, maior será a estimulação das células B e mais duradoura e persistente será a resposta inflamatória.

Bohne (1990) estudou lesões periapicais humanas crônicas e constatou que o infiltrado inflamatório presente nestas lesões é composto de células mononucleares, com grande número de linfócitos no tecido conjuntivo e poucas células penetrando a parede epitelial dos cistos. A intensidade da reação inflamatória nas lesões periapicais crônicas foi baixa mas não mostrou um padrão uniforme, o que dificultou a determinação do papel do infiltrado na patogenia destas lesões.

Os linfócitos T CD4 (auxiliares) exercem papel importante na diferenciação dos linfócitos B para produção de IgG, através da produção de fatores de crescimento e de diferenciação derivados das células T. A alta porcentagem de células Ig G positivas e de células CD4 em infiltrados focais de lesões periapicais humanas suporta esta afirmação. As células CD8 (linfócitos T citotóxicos) exercem funções regulatórias em respostas imunes e sua presença em infiltrados difusos e no epitélio em proliferação do granuloma desenvolvido indica seu papel na destruição inicial de células e na origem dos cistos periapicais (LUKIC et al. 1990).

Theyer et al. (1992) caracterizaram o infiltrado de leucócitos na hiperplasia benigna de próstata. Seus resultados mostraram um aumento de linfócitos numa frequência 10 vezes maior que no grupo controle constituído de próstata normal. As células inflamatórias se acumularam principalmente no interstício e ao redor dos ductos epiteliais, que em alguns casos foram invadidos pelos linfócitos. Estas células foram responsáveis por cerca de 80 % do total de células do infiltrado, constituindo-se de 60 % de CD4, 30 % CD8 e 10 % de

CD20. Concluíram que o acúmulo local de linfócitos sugere a presença de uma variedade de fatores de crescimento nas hiperplasias benignas de próstata.

Chaves, Ramalho e Sant'Ana Filho (2002) estudaram a composição do infiltrado linfocitário em 30 casos de carcinoma espinocelular de boca. Concluíram que a avaliação destas células não deve ser apenas quantitativa, pois a função e regulação destas células são mais importantes que o seu número.

O' Valle et al. (1994) estudaram 30 biópsias de papila gengival retiradas de pacientes com hiperplasia associada ao uso de ciclosporina A. A proporção de células CD4/CD8 foi mais alta no grupo que apresentou maior crescimento gengival em relação ao grupo controle de pacientes saudáveis, enquanto o número de linfócitos B encontrado foi invariavelmente pequeno. O número de linfócitos aumentou proporcionalmente em relação ao crescimento da lesão e pode estar exercendo ação fibrinogênica direta, potencializando o efeito da ciclosporina.

Tang et al. (1995) realizaram análise imunohistoquímica das células linfóides na hiperplasia da amígdala palatina humana e observaram pequenos linfócitos infiltrando o epitélio reticular, principalmente células B densamente distribuídas na metade superior (porção luminal) da mucosa, e linfócitos T esparsamente distribuídos, com predomínio de células CD4. A camada paraceratótica, superficial, continha infiltrado inflamatório escasso enquanto no epitélio escamoso não reticular da superfície bucal da amígdala os linfócitos mostraram uma distribuição esparsa, com a presença de numerosas células T, e poucas células B.

Kawashima et al. (1996) realizaram análise imunohistoquímica de células linfóides em lesões periapicais induzidas em molares de ratos, através da exposição pulpar, e observaram que o número de células T aumentou significativamente entre 14 e 28 dias da indução da



lesão, enquanto plasmócitos aumentaram entre 28 e 56 dias o que significa que estes predominam com o aumento do tempo de duração das lesões. A relação CD4/ CD8, que é usada como indicador do estado imunoregulatório, aumentou entre 14 e 28 dias e diminuiu gradativamente até que aos 56 dias os CD8 representavam 64 % dos linfócitos T. Concluíram que há mudanças na composição das células inflamatórias em relação ao tempo de evolução da lesão.

## PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo são mapear a distribuição das células CD 20, CD 8 e CD 4 positivas, quantificar a população de linfócitos presentes nas hiperplasias inflamatórias (utilizando – se a razão células positivas/ linfócitos totais), e verificar a sua relação com a infecção por *Candida sp.*

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. OBTENÇÃO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi obtida a partir de lesões com diagnóstico de hiperplasia inflamatória do arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os critérios de inclusão no presente estudo foram: diagnóstico histopatológico de hiperplasia inflamatória, peça removida por biópsia total (biópsia excisional) realizada entre 2000 e 2002, ficha de biópsia completamente preenchida, lesão maior que 5 mm e menor que 11 mm no seu maior diâmetro em blocos que permitam a realização de 5 ou mais cortes e epitélio de revestimento da lesão íntegro (sem ulceração), nos cortes em estudo.

Os critérios utilizados para diagnóstico histopatológico de hiperplasia inflamatória foram:

- ✓ Hiperplasia epitelial e conjuntiva.
- ✓ Presença de infiltrado inflamatório.

Foram avaliados morfologicamente todos os 144 casos com diagnóstico de hiperplasia inflamatória, registrados no Laboratório de Patologia Bucal da UFRGS entre os meses de agosto do ano 2000 e março do ano de 2002. Destes, 86 satisfaziam aos critérios de inclusão do presente estudo.

### 2. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

Foram realizados 5 cortes histológicos de cada caso estudado, sendo o primeiro corte submetido à técnica de coloração da hematoxilina e eosina (HE) para avaliação microscópica da lesão (conforme descrito no anexo 1).

O segundo corte foi submetido à técnica de coloração do PAS (Ácido periódico de Schiff, conforme anexo 2) para detecção de *Candida sp*, e divisão em 2 grupos: com infecção por *Candida sp* e controle. O critério de positividade para infecção por *Candida sp* foi morfologia de hifa e parede celular corada de rosa

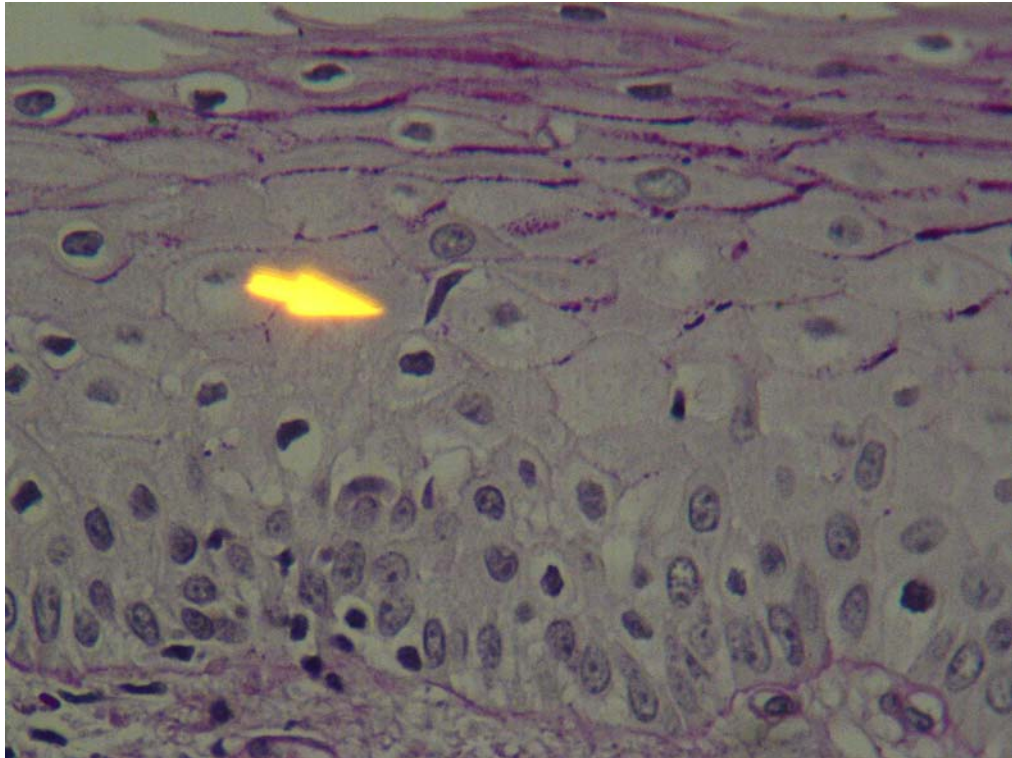


Figura 01 – Fotomicrografia mostrando a hifa de *Candida sp*. penetrando o epitélio de uma lesão de hiperplasia inflamatória. (coloração pelo PAS, magnificação de 400x).

Os casos selecionados foram então sorteados, cortados em micrótomo (espessura de 3 um), montados em lâminas histológicas silanizadas (S3003, Dako®, Dinamarca) e submetidos à técnica imunohistoquímica da estreptoavidina-biotina (anexo 3), utilizando – se os marcadores anti CD20 (clone L26, Dako®, Dinamarca), anti CD8 (clone C8/ 144-B,

Dako®, Dinamarca) e anti CD4 (clone 1F6 Novocasta Laboratories Ltda®, Newscatle, UK) para identificação e quantificação dos linfócitos B, linfócitos T citotóxicos e auxiliares, respectivamente. O controle positivo e negativo dos anticorpos foi realizado em apêndices humanos do material de arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da UFRGS..

### 3. ANÁLISE QUALITATIVA

As células marcadas, com coloração acastanhada foram avaliadas pelo autor, calibrado pelo seu orientador em 10 campos escolhidos aleatoriamente (concordância de 90 %), num microscópio óptico marca ZEISS® com aumento de 100 vezes obedecendo aos seguintes critérios:

- ✓ Distribuição, conforme as células se apresentem de forma focal (células concentradas em uma ou mais regiões da lesão) ou difusa (células distribuídas por toda extensão da lesão).
- ✓ Localização anatômica predominante das células positivamente marcadas quando estiverem infiltrando o epitélio, na camada sub-epitelial ou profundamente no tecido conjuntivo. A distribuição e localização anatômica das células positivamente marcadas foi relacionada à localização das hifas de *Candida sp* .no grupo com infecção, para avaliação da possível relação entre estas e o fungo.

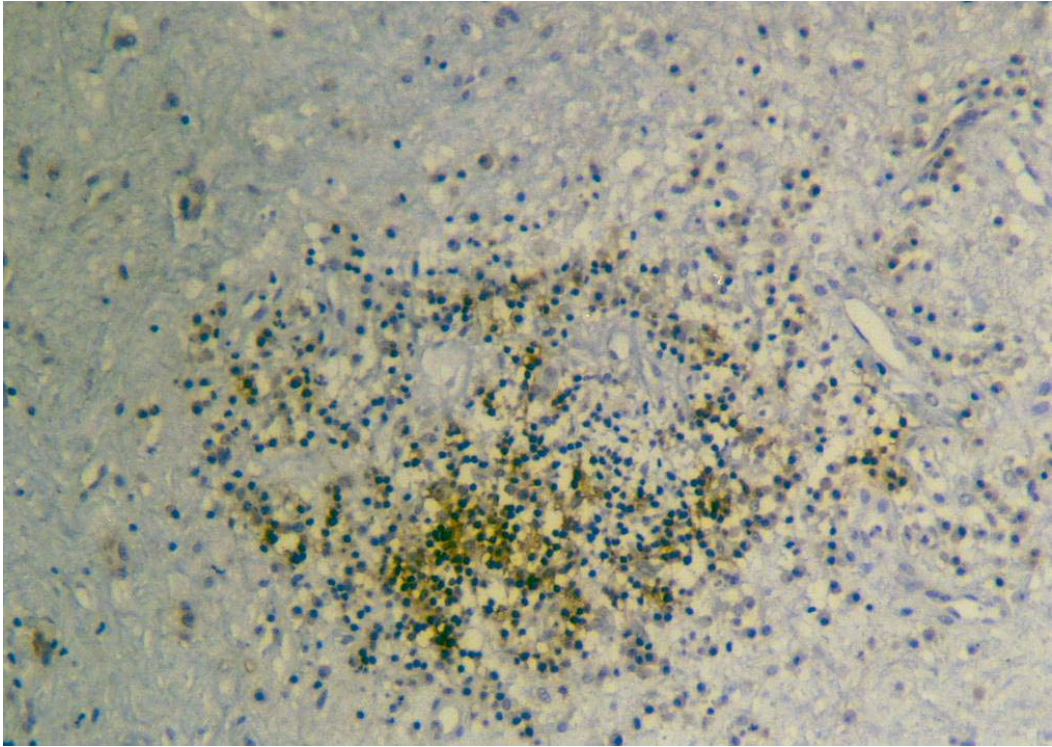


Figura 02 – Fotomicrografia mostrando infiltrado com distribuição focal (marcação com anticorpo anti – CD 20; magnificação de 100x)

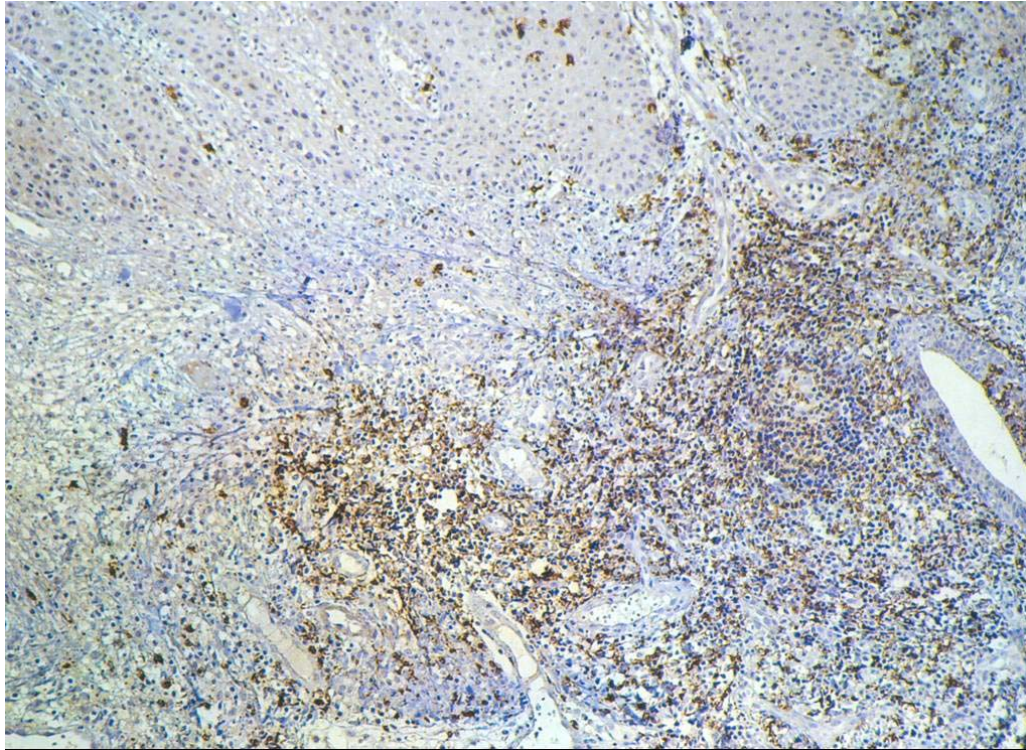


Figura 03 - Fotomicrografia mostrando infiltrado com distribuição difusa (marcação com anticorpo anti – CD 20; magnificação de 100x)

#### 4. ANÁLISE QUANTITATIVA

Para a contagem das células marcadas positivamente e do total de linfócitos capturou – se 3 campos microscópicos em aumento de 400 vezes. O 1º campo foi obtido sobre a área de maior concentração do infiltrado inflamatório (WILLIAMS et al. 1997), procurando – se envolver o maior número de células positivamente marcadas, e os outros 2 campos selecionados da esquerda para a direita a partir do 1º campo, finalizando 3 campos microscópicos contíguos e não superpostos (SANT’ANA FILHO 1995; PHILIPPI 2001).

A captura das imagens foi realizada através de um microscópio de luz transmitida marca ZEISS®, acoplado a uma câmera de vídeo colorida marca JVC modelo TK-C 620, com as

seguintes especificações: sistema de sinal NTSC standard, tamanho da imagem 1/3' polegadas, resolução 479 linhas horizontais na TV, 380000 pixels, 771 (H) por 490 (V), sensor de imagem CCD que digitalizou as imagens para o programa de Sistema de Processamento e Análise de Imagens – IMAGETOOL®, instalado em um computador ATLON XP®. Os campos foram capturados numa resolução de 360x480 pixels, de forma que a imagem obtida na tela fosse fiel à imagem vista no microscópio.

Para que uma célula fosse considerada positiva para marcação com anticorpo anti - CD seria necessário que a sua membrana citoplasmática mostrasse marcação completa de coloração acastanhada (HANH, 1989), presença de núcleo (KATOU et al. 1999) e morfologia de linfócito.

Foram excluídas da contagem as células que mostravam sobreposição ou que não estavam totalmente dentro do campo microscópico capturado. As células consideradas positivas foram assinaladas pelo examinador clicando com o mouse sobre a célula marcada pelo anticorpo, utilizando-se a ferramenta contador manual com a totalização realizada pelo próprio programa do computador (IMAGETOOL – Windows XP, Microsoft Corp®, USA).



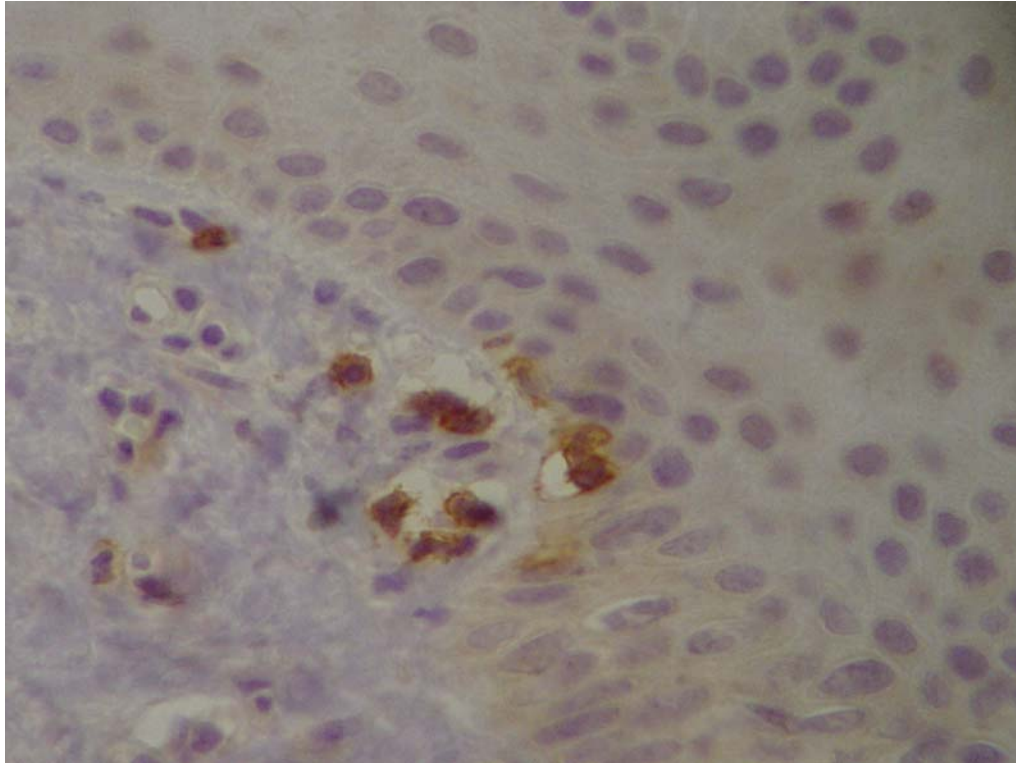


Figura 04 - Fotomicrografia mostrando os critérios de positividade: marcação completa da membrana celular, presença de núcleo e morfologia de linfócito. (marcação com anticorpo anti – CD 8; magnificação de 400x)

As lâminas preparadas para contagem foram cegadas no laboratório colocando – se uma tarja e um código sobre o número da lâmina. Foi realizada a calibragem entre o examinador e seu orientador tendo sido obtida uma concordância de 90 %. Os campos contados ficaram gravados na memória do computador e a cada 10 campos estudados 1 foi recontado e submetido à análise estatística pelo teste “t” de Student, com 5 % de significância. Em não havendo diferença estatisticamente significativa considerou - se o examinador calibrado.

Os resultados foram expressos como uma razão entre o total de células positivamente marcadas e o total de linfócitos contados nos 3 campos capturados, separados nos grupos

controle e com infecção por *Candida sp* e submetidos ao teste “t” de Student, com 5 % de significância, tendo sido analisados no programa Excel do Windows XP (Microsoft Corp®, USA). Foi realizada dupla conferência do banco de dados e da análise estatística para maior confiabilidade dos resultados.

Realizou – se um estudo piloto com 6 casos de cada grupo com o objetivo de se definir estatisticamente o tamanho da amostra.

O presente estudo foi submetido à apreciação dos comitês de pesquisa e ética da Faculdade de Odontologia da UFRGS, tendo sido aprovado em ambos os casos.

## RESULTADOS

### 1. DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

Os 86 casos que satisfizeram aos critérios de inclusão do presente estudo foram submetidos à técnica de coloração do PAS, obtendo – se 67 casos com infecção pela *Candida sp.* e 19 casos sem infecção. Utilizou – se os 19 casos sem infecção como grupo controle enquanto outros 22 casos foram randomizados entre os 67 que apresentaram infecção para avaliação quantitativa, pois um estudo piloto, realizado em 6 casos de cada grupo, mostrou que 17 casos seriam suficientes para caracterizar a amostra.

### 2. ANÁLISE QUALITATIVA

Após a marcação imunohistoquímica dos casos selecionados pela técnica da estreptoavidina – biotina com os 3 anticorpos propostos (anexo 3), avaliou – se a distribuição e localização preferencial das células marcadas positivamente. Observou – se na marcação com anticorpo anti – CD 20 que as células apresentaram uma distribuição preferencialmente difusa e localização anatômica profunda no tecido conjuntivo para ambos os grupos (anexo 4).

No caso do anticorpo anti – CD 8 a distribuição preferencial das células positivamente marcadas foi a forma focal e a localização anatômica principal a camada subepitelial.

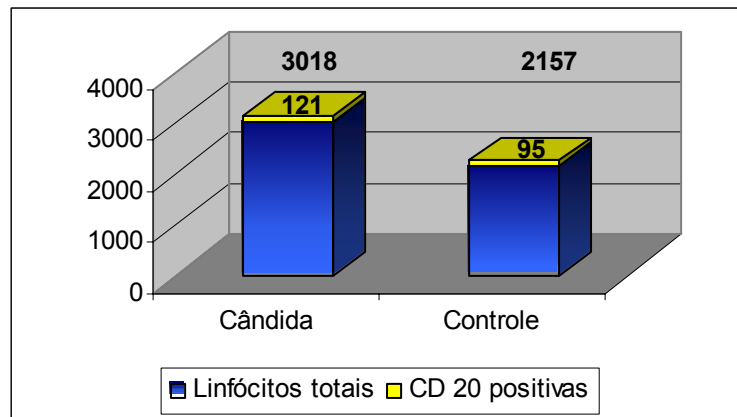
Entretanto, o grupo com infecção mostrou que em, 7 dos 22 casos, as células CD 8 positivas penetravam o epitélio, enquanto no grupo controle isto não aconteceu em nenhum caso. É importante ressaltar que as áreas onde as células positivamente marcadas penetraram o epitélio coincidiram com áreas de infecção pela *Candida sp.* (anexo 4).

A marcação com anticorpo anti – CD 4 revelou distribuição preferencial focal, localizada na camada subepitelial tanto para o grupo controle quanto para o grupo com infecção. Em nenhum caso as células marcadas penetraram o epitélio (anexo 4).

### 3. ANÁLISE QUANTITATIVA

Os resultados serão expressos através de contagens das células positivas e dos linfócitos totais, médias e desvios – padrão por lesão examinada, detalhadas em gráficos e tabelas. As contagem dos 3 campos por lesão estão ilustradas no anexo 5.

Gráfico 01. Comparação da contagem de células CD 20 positivas e dos linfócitos totais entre os grupos com e sem infecção.



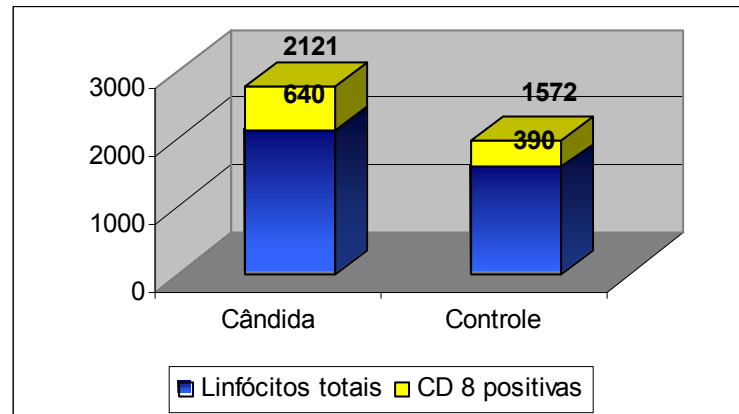
A análise estatística dos dados não mostrou diferenças significantes na contagem de células CD 20 positivas ( $p= 0,7082$ ), nos linfócitos totais ( $p= 0,2774$ ) nem na razão CD 20 positivas/ linfócitos totais entre os grupos controle e com infecção por *Candida sp.* A reprodutibilidade do examinador foi considerada satisfatória ( $p= 0,8451$ ).

Grupo	Células CD 20 positivas	Linfócitos totais	Razão CD 20 positivas / linfócitos totais
Cândida	5,5 / 4,67	137,18 / 71,04	0,0335 / 0,0189
Controle	5 / 3,61	113,52 / 65,57	0,0386 / 0,0293
p	0,7082	0,2774	0,5127

Tabela 01. Comparação das médias / desvios padrão entre os grupos com infecção e controle para marcação com anti – CD 20. Análise estatística pelo teste “t” com 5 % de significância.

Laboratório de Patologia Bucal da UFRGS,  
Porto Alegre 2003

Gráfico 02. Comparação da contagem de células CD 8 positivas e dos linfócitos totais entre os grupos com e sem infecção.



A análise estatística dos dados não mostrou diferenças significantes no número de linfócitos totais ( $p= 0,2928$ ). Entretanto, houve mais células CD 8 positivas e a razão células CD 8 positivas/ linfócitos totais foi mais alta no grupo com infecção por *Candida sp.* Estas diferenças foram estatisticamente significantes ( $p= 0,016$  e  $p= 732 \times 10^{-20}$  para células CD 8

positivas e para razão células CD 8 positivas/ linfócitos totais, respectivamente). A

Grupo	Células CD 8 positivas	Linfócitos totais	Razão CD 8 positivas / linfócitos totais
Cândida	29,09 / 12,66	96,40 / 43,16	0,3034 / 0,0085
Controle	20,52 / 9,07	82,73 / 38,91	0,2514 / 0,01
p	0,0016*	0,2928	$732 \times 10^{-20}$ *

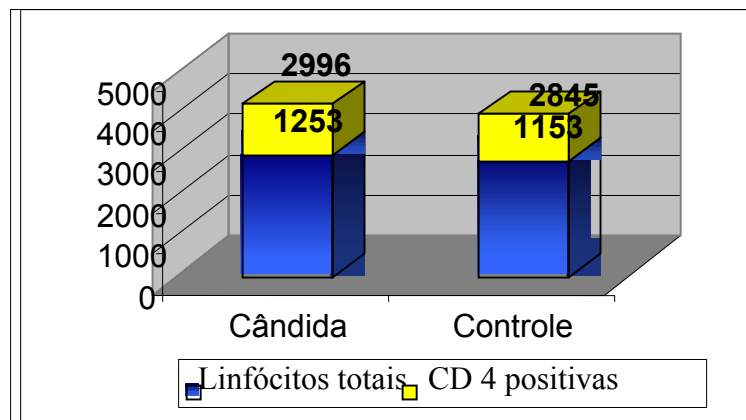
reprodutibilidade do examinador foi considerada satisfatória (  $p= 0,6859$ ).

Tabela 02. Comparação das médias / desvios padrão entre os grupos com infecção e controle para marcação com anti – CD 8. Análise estatística pelo teste “t” com 5 % de significância.

Laboratório de Patologia Bucal da UFRGS,  
Porto Alegre 2003

\* Diferenças estatisticamente significantes

Gráfico 03. Comparação da contagem de células CD 4 positivas e dos linfócitos totais entre os grupos com e sem infecção.



A comparação dos dados mostrou mais células CD 4 positivas por caso (0,2503) e mais linfócitos totais no grupo controle ( $p= 0,086$ ), enquanto a razão células CD 4 positivas/ Linfócitos totais mais alta no grupo com infecção por *Candida sp.* que no grupo controle ( $p= 0,3644$ ). Entretanto nenhuma destas diferenças foi estatisticamente significativa. A calibragem intra – examinador foi considerada satisfatória, com  $p = 0,4918$ .

Tabela 03. Comparação das médias / desvios padrão entre os grupos com infecção e controle para marcação com anti – CD 4. Análise estatística pelo teste “t” com 5 % de significância.

Grupo	Células CD 4 positivas	Linfócitos totais	Razão CD 4 positivas / linfócitos totais
Cândida	56,95 / 9,41	136,18 / 22,46	0,4176 / 0,0077
Controle	60,48 / 10,13	142,46 / 24,89	0,4168 / 0,0065
p	0,2503	0,08432	0,3644

Laboratório de Patologia Bucal da UFRGS,  
Porto Alegre 2003

## DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho observamos que 19 dos 86 casos submetidos à técnica de coloração do PAS revelaram – se negativos quanto à pesquisa para *Candida sp.* Isto equivale a aproximadamente 22,09 % dos espécimes examinados sem evidência do fungo, enquanto 77,91 % apresentaram infecção pela *Candida sp.* Reichart, Althoff (1982) afirmaram que a infecção por *Candida albicans*, é um dos fatores etiológicos da Hiperplasia inflamatória, o que poderia explicar a elevada prevalência de casos com infecção no presente estudo. Axelsen (1973), conclui que a grande maioria dos pacientes que usam prótese total apresenta também infecção pela *Candida albicans*. Na opinião do autor o trauma além de ser a causa da Hiperplasia inflamatória favorece a sobreposição de outros agentes infecciosos como a *Candida sp.*

A proporção de casos com infecção por *Candida sp* vistos no presente estudo (77,91 %) é superior à obtida por Budtz – Jorgensen (1970), com 64,06 % dos pacientes com hiperplasia por prótese total infectados por *Candida sp.*, e inferior à obtida por Barbachan, Domingues, Rados (1996), que identificaram o fungo em 85 % dos casos de Hiperplasias inflamatórias estudadas. As diferenças observadas, por serem pequenas, podem ser em virtude da desigualdade das amostras (116 casos no 1º estudo citado, 20 casos no 2º e 86 casos no presente estudo).

Apesar de Budtz – Jorgensen, Bertram (1970); Fotos, Vincent, Hellstein, (1992); Rindum, Stenderup, Holmstrup (1994) e Cannon et al. (1995), afirmarem que o isolamento de qualquer espécie de Cândida através de raspagem da mucosa bucal sem evidência clínica



de lesão não deve ser considerado como infecção, o critério de infecção utilizado no presente estudo foi a observação de hifas invadindo o tecido epitelial em exames histopatológicos, que na opinião do autor é sinal de infecção, concordando com os critérios de Heimdahl, Nord (1990); Nagai, Takeshita, Saku (1992); Cannon et al. (1995).

Não foi realizada a quantificação das hifas de *Candida sp.* no presente estudo, uma vez que Budtz – Jorgensen (1970) concluiu que existe uma relação estatisticamente significativa entre a presença de hifas de *Candida sp.* e a presença de linfócitos em hiperplasias inflamatórias biopsiadas, mas a quantidade de hifas não influencia o número de linfócitos presentes. Seguindo a mesma idéia, Katou et al. (1999), estudando linfócitos em enxertos de pele realizados na mucosa bucal de 20 pacientes submetidos à cirurgia radical para remoção de tumores intra - bucais, afirmaram que o aumento no número de hifas não influencia no aumento do número de linfócitos presentes.

Adotou – se, no presente estudo um critério de positividade que possibilitasse ao examinador ter menor possibilidade de erro ao interpretar os resultados. Como os 3 anticorpos utilizados são marcadores de membrana, esta estrutura celular deveria mostrar uma marcação completa de coloração acastanhada. A presença de núcleo foi considerada para se evitar que um fundo mais intenso (background) fosse interpretado como marcação positiva. A análise morfológica foi levada em conta uma vez que o anticorpo anti CD 4 possui reação cruzada com monócitos sanguíneos e o anticorpo anti CD 8 possui reação cruzada com célula exterminadora natural.

Em relação às células CD 20 positivas, observou – se, na maioria dos casos, distribuição difusa e localização profunda no tecido conjuntivo (anexo 4). Nos poucos casos em que a distribuição das células CD 20 positivas foi focal, estas células se localizaram na camada

subepitelial. Em nenhum caso constatou – se a presença de células CD 20 positivas penetrando o epitélio no presente estudo. Não se observou, portanto, diferença na distribuição e localização das células CD 20 positivas entre os grupos estudados.

A análise quantitativa mostrou uma contagem mais alta de células positivas no grupo com infecção por *Candida sp.* do que no grupo controle (gráfico e tabela 01), enquanto a razão células CD 20 positivas/ linfócitos totais foi mais alta no grupo controle do que no grupo com infecção por *Candida sp.* apesar de não ter sido encontrada diferença estatisticamente significativa em nenhuma das avaliações. Estes resultados mostram que não há relação entre a resposta imune humoral e a infecção por *Candida sp.*

Eversole et al. (1997), discordando dos resultados da localização das células CD 20 positivas descreveram nos casos de Candidíase, células positivamente marcadas penetrando o epitélio próximas às hifas de *Candida sp.* Entretanto, utilizaram critério de positividade na marcação imunohistoquímica diferente do utilizado no presente estudo tornando inviável a comparação dos seus resultados.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com Katou et al. (1999) e Williams et al. (1997) ao afirmarem que a infecção por *Candida sp.* não tem qualquer efeito na distribuição e na localização das células CD 20 positivas. Em relação à análise quantitativa, Williams et al. (1997) concluiu que os linfócitos T representam o principal tipo celular presente nas Candidíases hiperplásicas, e os linfócitos B são encontrados em número reduzido, enquanto Katou et al. (1997), não notaram diferença na contagem de linfócitos B em biópsias de enxertos intra – bucais com e sem infecção por *Candida sp.*. O' Valle et al. (1994) afirmam que o número de linfócitos B encontrados em Hiperplasias medicamentosas é invariavelmente pequeno, e que o número destas células não aumenta com o tamanho da lesão. Donde se conclui que a infecção por *Candida sp.* não ativa a resposta imune humoral.

Sabe - se que as células CD 20 positivas são linfócitos B, que possuem a função de se diferenciar em plasmócitos e produzir imunoglobulinas que irão se ligar aos antígenos, sendo estas células as responsáveis pela resposta imune humoral (SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000; SOL et al., 1998). Considerando – se os resultados observados no presente estudo pode – se sugerir que não seja necessária a utilização do braço humoral da resposta imune na presença de infecção por *Candida sp.* em lesões de Hiperplasia inflamatória. Tal fato não seria exceção, uma vez que a literatura cita várias situações em que os linfócitos B não são empregados, como nas hiperplasias gengivais (O' VALLE, 1994) e quando se compara lesões periapicais crônicas supuradas e não supuradas (PHILLIPI, 2001). Na opinião do autor e de acordo com Hahn (1989), Heimdahl, Nord (1990), Cannon et al. (1995) e Kawashima et al. (1996), apenas a resposta imune celular pode ser suficiente para combater a maioria das infecções, ficando a resposta imune humoral, através da produção de anticorpos, reservada para os casos onde o antígeno permanece após sofrer a ação da resposta imune celular.

Analisando as células CD 8 positivas, pode – se verificar que sua localização principal foi subepitelial e sua distribuição foi focal em ambos os grupos (anexo 4). Entretanto, em 7 casos do grupo com infecção por *Candida sp.*, observou – se células positivamente marcadas no interior do epitélio, havendo uma relação de coincidência entre a localização das hifas e o local onde as células CD 8 positivas penetravam o tecido epitelial. Estes resultados mostram uma relação de proximidade espacial entre as hifas de *Candida sp.* e as células CD 8 positivas.

A análise quantitativa mostrou mais células CD 8 positivas e razão células CD 8 positivas/ linfócitos totais mais alta no grupo com infecção do que no grupo controle e estas diferenças foram estatisticamente significantes (gráfico e tabela 02).

Katou et al. (1999), obtiveram resultados diferentes dos observados no presente estudo, pois para estes pesquisadores a infecção por *Candida sp.* determina diferenças na distribuição das células CD 8 positivas. Williams et al. (1997), por outro lado, afirmaram que a distribuição das células T independente da presença de hifas de *Candida sp.*, o que está de acordo com o obtido no presente estudo. Na opinião do autor do presente trabalho a divergência de resultados com o trabalho de Katou et al. (1999) está na diferença de critérios de infiltrado focal e difuso utilizados nos respectivos trabalhos.

Os resultados da análise quantitativa do presente estudo estão de acordo com a pesquisa de Katou et al. (1997) que relatam um aumento nas células CD 8 positivas na presença de infecção por *Candida sp.* em enxertos intra – bucais. Pode – se também fazer uma associação com os estudos de Budtz - Jorgensen (1970), que observou um aumento dos linfócitos em estomatites protéticas na presença de infecção por *Candida sp.*, e com o estudo de Williams et al. (1997) que obtiveram predomínio de linfócitos T na maioria dos casos de candidíase hiperplásica. Os resultados obtidos no presente estudo permitem sugerir que o aumento nos linfócitos T se dá às custas das células CD 8 positivas.

Este resultado discorda do obtido por Barbachan, Domingues, Rados (1996), ao afirmarem que a presença de hifas de *Cândida* em hiperplasias inflamatórias não influencia a intensidade das células inflamatórias observada no tecido conjuntivo subjacente. Entretanto estes autores utilizaram metodologia diferente do presente estudo, sem marcação imunohistoquímica, o que pode explicar a diferença nos resultados.

As células CD 8 positivas exercem funções regulatórias na resposta imune. Consistem de subpopulação de linfócitos T que expressam os mesmos grupos de proteínas e função, conhecidos como citotóxicos, que lisam células estranhas ao sistema imune, através da

aplicação de enzimas sobre a célula alvo ou estimulando a sua apoptose (LUKIC et al., 1990).

Roit, Brustoff, Male (1999) e Siqueira Jr., Dantas (2000) afirmam que os linfócitos T citotóxicos atuam basicamente contra células infectadas por parasitas intracelulares ( vírus e bactérias ) e contra células tumorais. Para diversos autores, a explicação para a relação de proximidade entre as células CD 8 positivas e as hifas de *Candida sp.*, é que estas células possuem tropismo por lesões supuradas, como demonstrou Phillipi (2001) em lesões periapicais. Embora não fosse objetivo do presente estudo avaliar supuração, não se pode deixar de registrar a presença de microabscessos intra – epiteliais nas proximidades das hifas de *Candida sp.*, fato este já relatado por Eversole et al. (1997), ao descrever a histopatologia da Candidíase. E para confirmar os achados microscópicos do presente estudo, Badauy, Barbachan, Rados (2002) ao estudarem a histopatologia da hiperplasia inflamatória descrevem em alguns casos o predomínio de polimorfonucleares neutrófilos entre as células inflamatórias, formando abscessos intra – epiteliais.

Entretanto, a relação de proximidade anatômica entre as hifas de *Candida sp.* e as células CD 8 positivas, além de diferenças tão grandes nas contagens entre os grupos do presente estudo nos permitem sugerir que as células CD 8 positivas auxiliam na defesa contra infecção por *Candida sp.*

A análise das células CD 4 positivas mostrou localização subepitelial e distribuição preferencialmente focal para ambos os grupos (anexo 4). Em nenhum caso se observou células CD 4 positivas no interior do epitélio e a semelhança das localizações e distribuições das células marcadas nos grupos estudados sugere não haver uma taxa destas células na presença de hifas de *Candida sp.*

A análise quantitativa mostrou uma média de células marcadas mais alta no grupo controle do que no grupo com infecção, e uma razão células CD 4 positivas/ linfócitos totais mais alta no grupo com infecção do que no grupo controle mas estas diferenças não foram estatisticamente significantes (gráfico e tabela 03). Ou seja, a infecção por *Candida sp.* não mobiliza as células CD 4 positivas.

Budtz - Jorgensen,1970; e Eversole et al.1997 obtiveram distribuição semelhante das células CD 4 positivas às observadas no presente estudo. Williams et al. 1997, embora afirmem que os linfócitos T, na Candidíase, assumam uma distribuição focal e difusa em igual número de casos, concordam em sua essência com a afirmação do presente estudo, que a distribuição das células CD 4 positivas independe da infecção por *Candida sp.*

Sabe – se que células CD 4 positivas são linfócitos T auxiliares ou indutores, que reconhecem os antígenos, normalmente processados por macrófagos ou pelas células apresentadoras de antígeno. Constituem – se de 2 subpopulações celulares que expressam o mesmo grupo de diferenciação. Uma subpopulação seleciona clones de linfócitos B e produz linfocinas que vão estimular a produção de anticorpos enquanto a outra subpopulação aumenta a atividade das células da resposta imune inata (macrófagos e neutrófilos), otimizando seu poder de fagocitose (SIQUEIRA JR, DANTAS 2000; MARTON, KISS 1993).

É opinião do autor do presente trabalho, que a defesa do organismo na Candidíase é representada pelos macrófagos, neutrófilos e pelos linfócitos t citotóxicos, sendo o papel dos linfócitos T auxiliares apenas produzir linfocinas que aumentam o potencial defensivo das células citadas, o que está de acordo com Roitt, Brustoff, Male (1990); Heimdahl, Nord (1990) e Cannon et al. (1995).

Para confirmar a opinião do autor, a disfunção da subpopulação de linfócitos T auxiliares que produz linfocinas, as quais aumentam o poder de fagocitose dos macrófagos, (como ocorre em pacientes imunocomprometidos) tem como consequência a candidíase crônica mucocutânea, enquanto indivíduos que apresentam falhas nos fagócitos têm tendência a infecção generalizada (CANNON et al. 1995).

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo pode – se concluir que:

- Não existe envolvimento do braço humoral da resposta imune na infecção por *Candida sp.*
- A resposta imune celular participa da defesa contra infecção por *Candida sp.* através das células CD 8 positivas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AXELSEN, N.N. Quantitative Immuno-electrophoretic Methods as Tools for a Polyvalent Approach to Standardization in the Immunochemistry of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 7, no. 6, p. 949-960, Jun. 1973.
- BADAUY, C.M.; BARBACHAN, J.J.; RADOS, P.V. Avaliação das Características Microscópicas Presentes nas Hiperplasias Inflamatórias. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**. Porto Alegre, v. 43, n. 2, p. 48-52, Dez. 2002.
- BARBACHAN, J.J.; DOMINGUES, M.G.; RADOS, P.V. Study of Presence of *Candida* in Inflammatory Hyperplasias. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 75, no. 5, p. 1100, May, 1996.
- BARBACHAN, J.J. et al. Estudo Clínico de Estomatite Protética; Avaliação Preliminar. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**. Porto Alegre, v. 36, n. 1, p. 27-31, Ago. 1995.
- BASSI, A.P.F.; VIEIRA, E.H.; GABRIELLI, M.A.C. Hiperplasia Fibrosa Inflamatória. **Rev. Gaúcha Odontol.**, Porto Alegre, v. 46, n. 4, p. 209-211, out./dez. 1998.
- BERGENDAL, T.; HOLMBERG, K. Studies of *Candida* Serology in Denture Stomatitis Patients. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 90, no. 4, p. 315-322, Aug. 1982.
- BERGENDAL, T.; ISACSSON, G. A Combined Mycological and Histological Study of Denture Stomatitis. **Acta Odont. Scand.**, Turku, v. 41, no. 1, p. 33-44, 1983.
- BOGLIOLO, L. **Patologia**. 5.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 1994. 1343 p.
- BOHNE, W. Light and Ultrastructural Studies of Human Chronic Periapical Lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 19, no. 5, p. 215-220, May 1990.
- BUDTZ-JORGENSEN, E. Denture stomatitis 3. Histopathology of Trauma and *Candida* Induced Inflammatory Lesions of the Palatal Mucosa. **Acta Odontol. Scand.**, Turku, v. 28, no. 5, p. 551-579, Sept./ Oct. 1970.
- BUDTZ-JORGENSEN, E.; BERTRAM, U. Denture Stomatitis 1. The Etiology in Relation to Trauma and Infection. **Acta Odontol. Scand.**, Turku, v. 28, no. 1, p. 71-92, Jan./ Feb. 1970.
- BUDTZ-JORGENSEN, E.; THEILADE, E.; THEILADE, J. Quantitative Relationship Between Yeasts and Bacteria in Denture Induced Stomatitis, **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 91, no. 2, p. 134-142, Apr. 1983.
- CANNON, R.D et al. Oral *Candida*: Clearance, Colonization, or Candidiasis? **J. Dent. Res.**, Washington, v. 74, no. 5, p. 152-161, 1995.

CHAVES, A.L.; RAMALHO, L.; SANT'ANA FILHO, M. Aaliação das Células do Infiltrado Inflamatório Peritumoral dos Carcinomas Espinocelulares de Boca. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**. Porto Alegre, v. 43, n. 2, p. 60- 64 Dez. 2002.

COELHO, C.M.; ZUCOLOTO, S. Hiperplasia Fibro Epitelial da Cavidade Oral. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo v. 52, n. 5, p. 383-387, set./out. 1998.

COELHO, C.M.; ZUCOLOTO, S. Proliferative Ativity of Denture - Induced Fibrous Inflammatory Hyperplasia Analyzed by Proliferating Cell Nuclear Antigen Labeling index. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v. 12, no. 1, p. 73-77, Jan./Fev. 1999.

COELHO, C.M.; ZUCOLOTO, S. LOPES, R.A. Denture - Induced Fibrous Inflammatory Hyperplasia: a Retrospective Study in a School of Dentistry. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v. 13, no. 2, p. 148-151, Mar./Apr. 2000.

COUTINHO, T.C.L.; SANTOS, M.E.O. Hiperplasia Fibrosa Inflamatória. **Rev. Gaúcha Odontol.**, Porto Alegre, v. 46, n. 1, p. 27-29, jan./mar. 1998.

COTRAN, R.S. et al. **Patologia Estrutural e Funcional**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 1994. 1277 p.

CUTRIGHT, D.E. The Histopatologic Findings in 583 Cases of Epulis Fissuratum. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 37, no. 3, p. 401-411, Mar. 1974.

CUTRIGHT, D.E. Morphogenesis of Inflammatory Papillary Hyperpasia. **J. Prosth. Dent.**, St Louis, v. 33, no. 4, p. 380- 385, Jan./ Jun. 1975

DRUMMOND, J.R.; NEWTON, J.P.; YEMM, R. **Dental Care of the Elderly**. St Louis: Mosby, 1995. 224 p.

EVERSOLE, L.R. et al. Oral Keratinocyte Immune Responses in HIV - Associates Candidiasis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 84, no. 4, p. 373 – 380, Oct. 1997.

FELTRIN, P.P. Estomatite Protética: Estudo da Superfície Interna da Prótese Total em Microscopia Eletrônica de Varredura e da Mucosa de Suporte Através de Exame Citológico, Histopatológico e Imunohistoquímico. **Rev. ABO Nac.**, Rio de Janeiro, v. 1, n.1, p. 31-38, jul./set. 1993.

FOTOS, P.G. et al. Oral Candidosis. Clinical, Historical and Therapeutic Features of 100 Cases., **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis v. 74, no. 1, p. 41 – 49, July, 1992.

GIUNTA, J.L. Gingival Fibrous Nodule. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., Oral Radio. Endod.**, St Louis, v. 88, no. 4, p. 451-454, Oct. 1999.

HAHN, C.L. A Study of T and B Cells in Pulpal Pathosis. **J. Endod.** Baltimore, v. 15, no. 1, p. 20-26, Jan. 1989.

HEIMDAHL, A.; NORD, C.E. Oral Yeast Infection in Immunocompromised and Seriously Diseased Patients. **Acta Odontol. Scand.**, Turku, v. 48, no. 1, p. 77- 84, Feb. 1990.

JOHANNESSEN, A.C. et al. In Situ Characterization of the Inflammatory Cells Infiltrates of Hyperplastic Denture Stomatitis. **Acta Odontol. Scand.**, Turku, v. 44, no. 3, p. 187-192, June 1986.

KATOU et al. Unique Inflammatory Features Noted in Intraorally Transferred Skin Flaps: Correlation with *Candida albicans* Infection. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radio. Endod.**, St. Louis v. 87, no. 6, p. 676- 684, June 1999.

KIGNEL, S. et al. Hiperplasia Fibrosa Inflamatória. **Rev. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 40-44, mar./abr. 1999.

KOTIAINEN, S.; RANTA, H.; LAUTENSCHLAGER, I. Cells Infiltrating Human Periapical Inflammatory Lesions. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 15, no. 10, p. 544-546, Nov. 1986.

LUCAS, R.B. **Pathology of Tumours of the Oral Tissues**. 3rd ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 1976. 426 p.

LUKIC, A. et al. Quantitative Analysis of the Immunocompetent Cells in Periapical Granuloma: Correlation with the Histological Characteristics of the Lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v. 16, no. 3, p. 119-122, Mar. 1990.

MAIESE, R. et al. The Cell Surface Antigen and DNA Content Distribution of Lymphnodes with Reactive Hyperplasia. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v. 8, no. 5, p.536- 543, 1995.

MARTON, I.J.; KISS, C. Characterization of Inflammatory Cell Infiltrate in Dental Periapical Lesions. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 26, no. 2, p. 131- 136, Mar. 1993.

MATTOZZI de FLORES, M. Hiperplasia Papilomatosa Inflamatória: Aspectos Clínicos, Histopatológicos y Terapêuticos. **Acta Odontol. Venez.**, Caracas, v. 36, n. 2, p. 34-41, 1998.

NAGAI, Y.; TAKESHITA, N.; SAKU, T. Histopathologic and Ultrastructural Studies of Oral Mucosa with *Candida* Infection. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 21, no. 4, p.171 – 174, Apr. 1992

NEVILLE, B.W. et al. **Oral and Maxillofacial Pathology**. Philadelphia: Saunders, 1995. 711 p.

O' VALLE, F. et al. Immunohistochemical Study of 30 Cases of Cyclosporin A Induced Gingival Overgrowth. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 65, no. 7, p. 724- 730, July 1994.

PHILIPPI, C.K. **Estudo da Distribuição e Quantificação dos Linfócitos CD8 e CD20 nas Lesões Inflamatórias Periapicais Crônicas**. 2001. 66 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PINTO, L.P.P. et al. **Patologia Básica. Sinopse**. Natal: Editora UFRN, 1997. 184 p.

PINTO, T.A.S. et al. Estudo da Prevalência de Arteriosclerose em Biópsias de Hiperplasia Inflamatória da Mucosa Bucal. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 37, n. 2, p. 11-14, dez. 1996.

PRIDDY, R.W. Inflammatory Hyperplasias of the Oral Mucosa. **J. Can. Dent. Assoc.**, Ottawa, v. 58, no. 4, p. 311-321, Apr. 1992.

REGEZI, J.A.; SCIUBBA, J.J. **Patologia Bucal: Correlações Clínicopatológicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 310 p.

REICHART, P.A.; ALTHOFF, J. Granular Type of Denture Stomatitis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St Louis, v. 54, no.1, p. 66-72, July 1982.

REICHART, P.A. et al. Candida-Associated Palatal Papillary Hyperplasia in HIV Infection. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 23, no. 9, p. 403-405, Oct. 1994.

RINDUM, J.; STENDERUP, A.; HOLMSTRUP, P. Identification of *Candida albicans* Types Related to Healthy and Pathological Oral Mucosa. **J. Oral. Pathol. Med.** Copenhagen, v. 23, no. 9, p.406- 412, Oct. 1994.

ROITT, I.V.; BRUSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1999. 423 p.

SANT'ANA FILHO, M. **Avaliação Quantitativa das Células de Langerhans no Papiloma, Displasia Epitelial e Carcinoma Espinocelular**. 1995. 47 f. Tese (Doutorado em Estomatologia) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SHAFER, W.G.; HINE, M.K.; LEVY, B.M. **Tratado de Patologia Bucal**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985, 837p.

SIQUEIRA JR., DANTAS, C.J.S. **Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 238 p.

SOL, M.A. et al. Characterization of Lymphocyte Subpopulations in Periapical Lesions by Flow Cytometry. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 13, no. 4, p.253- 258, Aug. 1998.

SPOUGE, J.D. **Oral Pathology**. St Louis: Mosby, 1973. 487 p.

TANG, X. et al. Reticular Crypt Epithelium and Intra Epithelial Lymphoid Cells in the Hyperplastic Human Palatine Tonsil: an Immunohistochemical Analysis. **Pathol. Int.**, Carlton South, v. 45, no. 1, p. 34-44, Jan. 1995.

THEYER, G. et al. Phenotypic Characterization of Infiltrating Leukocytes in Benign Prostatic Hyperplasia. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 66, no. 1, p. 96-107, Jan. 1992.

TIECKE, R.W. **Oral Pathology**. New York: Mc Graw Hill, 1965. 873 p.

TYLDESLEY, W.R. Oral Medicine for the Dental Practitioner. Inflammatory Overgrowths and Neoplasms. **Brit. Dent. J.**, London, v. 136, no. 3, p. 111-116, Feb. 1974.

WALBER, L.F.; RADOS, PV. Estudo Comparativo do Tratamento da Estomatite Protética pelo Reembasamento ou Substituição das Próteses Totais. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 40, n.2, p. 17-23, Jan. 2000.

WILLIAMS, D. W. et al. Characterization of the Inflammatory Cell Infiltrate in Chronic Hyperplastic Candidosis of the Oral Mucosa. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 26, no. 2, p. 83-89, Feb 1997.

ZANETTI, R.V. et al. Estudo de 60 pacientes Portadores de Prótese Removível: Avaliação Clínica das Lesões nas Áreas de Suporte da Mucosa Bucal. **RPG**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 175-184, jul./set. 1996.

## **ANEXO 1**

### **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®

## **ANEXO 2**

### **Técnica de coloração pelo PAS**

Os cortes foram submetidos à seguinte seqüência de coloração:

- Xilol: 10 minutos
- Xilol: 10 minutos
- Álcool absoluto: 5 minutos
- Álcool absoluto: 5 minutos
- Água destilada: 1 minuto
- Solução de Ácido Periódico: 5 minutos
- Água destilada: 1 minuto
- Reagente de Schiff: 15 minutos
- Água corrente: 10 minutos
- Hematoxilina de Harris: 2,5 minutos
- Água destilada: 1 minuto
- Álcool absoluto: 1 minuto
- Álcool absoluto: 1 minuto
- Álcool absoluto: 1 minuto
- Xilol: 10 minutos
- Xilol: 10 minutos
- Montagem em Entellan®

### ANEXO 3

#### 1- Técnica de Imunohistoquímica

A desparafinação e hidratação dos cortes foi realizada na seguinte seqüência:

- Estufa a 58° C por 2 horas.
- Xilol: 10 minutos
- Xilol: 10 minutos
- Álcool absoluto: 5 minutos
- Álcool absoluto: 5 minutos
- Água destilada: 1 minuto

A recuperação antigênica foi feita com solução tampão de EDTA pH 8,0, em forno de microondas de 750 watts para os anticorpos anti CD - 8 e anti – CD 20 e com a substância de alto pH da DAKO® para o anti – CD 4. As lâminas foram colocadas em um frasco de Coplin imersas em solução tampão, em banho maria e submetidas a 3 ciclos de 5 minutos. O primeiro ciclo em potência máxima, com intervalo de 1 minuto entre os ciclos, e os demais ciclos e, potência 9 e 8, monitorando –se a temperatura para que não se elevasse acima de 94° C. Após o último ciclo as lâminas permaneceram 20 minutos dentro do forno desligado e 20 minutos fora até atingirem a temperatura ambiente.

A seguir as lâminas foram retiradas da solução recuperadora e submetidas a dois banhos de solução tampão PBS (Laboratório Laborclin – 1 frasco de PBS diluído em 1 litro de água destilada).

O bloqueio da Peroxidase Endógena foi feito com solução de metanol e peridrol (100 ml de metanol e 3 ml de peridrol), preparado na hora de usar. As lâminas permaneceram 2 períodos de 15 minutos nesta solução em câmara escura, após o que receberam 2 banhos



com o tampão PBS. Nas lâminas submetidas ao anticorpo anti – CD 4, esta etapa foi realizada antes da recuperação antigênica e apenas em um ciclo de 15 minutos.

Aplicação do soro fetal bovino (BFS DAKO®) sobre as lâminas e colocação da câmara úmida por 15 minutos na estufa a 40° C.

A seguir as lâminas foram removidas do banho com PBS, colocadas em câmara úmida e o anticorpo primário diluído foi aplicado sobre cada corte. Os anticorpos primários utilizados foram:

- CD4: clone 1F6, Novocasta Laboratories Ltda, Newcastle- UK, código NCL-L-CD4-1F6®. Diluição: 1:25
- CD8: clone C8/ 144-B, Dako- AS, Dinamarca, código M7103®. Diluição 1:25.
- CD20: clone L26, Dako- AS, Dinamarca, código M0755®. Diluição 1:30.
- Diluente de anticorpo: DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components – DAKO Corporations, USA (Código: S3022).

A câmara úmida foi colocada na estufa a 37<sup>0</sup>C por 1 hora.

Após o tempo de incubação do anticorpo primário, as lâminas receberam mais 2 banhos com a solução tampão PBS.

As lâminas foram então retiradas do banho com PBS, colocadas na câmara úmida e o anticorpo secundário diluído aplicado sobre cada corte. O anticorpo secundário utilizado faz parte do Kit Strept AB Complex/HRP – Due, Mouse, Rabbit – DAKO®, USA (Código: K0492). No preparo do anticorpo secundário utilizou - se 2000 microlitros de PBS para 20 microlitros de anticorpo secundário (utilizando - se o reagente C do Kit Biotinylated Goat Anti –Mouse/ Rabbit IG).

A câmara úmida foi novamente colocada na estufa a 37°C por 30 minutos.

Seguiram - se 2 banhos com a solução tampão PBS.

As lâminas foram novamente colocadas na câmara úmida e o complexo Streptoavidina-biotina (Estrepto ABC) aplicado sobre cada corte. A solução foi preparada 15 minutos antes do uso e era composta de 2000 microlitros de PBS, 20 microlitros do Reagente A e 20 microlitros do Reagente B.

- Reagente A: Streptoavidin- DAKO, Dinamarca; código K0492.
- Reagente B: Biotinylated Peroxidase- DAKO®, Dinamarca; código: 0492.

As lâminas na câmara úmida foram levadas a uma temperatura de 37°C por 30 minutos, após o que receberam mais 2 banhos com a solução tampão PBS.

Após remover o excesso de PBS das lâminas realizou-se a revelação com a solução de cromógeno (DAB), aplicada sobre os cortes por 1 minuto.

- DAB (Diaminobenzodine): Liquid DabLarge Volume Substrate- Cromogen System – DAKO® (Código: K3466)
- Foram utilizados 20 microlitros de Dab para cada ml de substrato tamponado (Buffered Substrate: Imidazole – HCL buffer, pH 7,5)

Em seguida os cortes foram lavados em água destilada, contra-corados com eosina de Harris por 30 segundos, e lavados novamente em água destilada. Seguiu-se a desidratação, diafanização e montagem em Entellan® obedecendo a seguinte ordem:

- Álcool absoluto: 1 minuto
- Álcool absoluto: 1 minuto
- Álcool absoluto: 1 minuto
- Xilol: 10 minutos
- Xilol: 10 minutos
- Montagem em Entellan®

**ANEXO 4**

## 1. Análise qualitativa do anticorpo anti – CD 20

Lâmina	Grupo	Distribuição das células CD 20 positivas	Localização das células CD 20 positivas
15659/00	Cândida	Difusa	Profunda no conjuntivo
15674/00	Cândida	Focal	Subepitelial
15675/00	Cândida	Difusa	Profunda no conjuntivo
16016/01	Cândida	Difusa	Profunda no conjuntivo
16234/00	Cândida	Difusa	Profunda no conjuntivo
16243/00	Cândida	Focal	Subepitelial
16305/01	Cândida	Difusa	Subepitelial
16311/01	Cândida	Difusa	Profunda no conjuntivo
16359/01	Cândida	Difusa	Subepitelial
16363/01	Cândida	Difusa	Subepitelial
16444/01	Cândida	Difusa	Profunda no conjuntivo
16491/01	Cândida	Difusa	Profunda no conjuntivo
16515/01	Cândida	Difusa	Profunda no conjuntivo
16578/01	Cândida	Difusa	Subepitelial
16865/02	Cândida	Difusa	Profunda no conjuntivo
16870/02	Cândida	Difusa	Profunda no conjuntivo
16949/02	Cândida	Focal	Subepitelial
16972/02	Cândida	Difusa	Profunda no conjuntivo
16976/02	Cândida	Difusa	Profunda no conjuntivo
17013/02	Cândida	Difusa	Subepitelial
17024/02	Cândida	Focal	Subepitelial
17533/02	Cândida	Difusa	Profunda no conjuntivo

Lâmina	Grupo	Distribuição das células CD 20 positivas	Localização das células CD 20 positivas
15820/00	Controle	Difusa	Profunda no conjuntivo
16223/00	Controle	Difusa	Subepitelial
16249/01	Controle	Difusa	Profunda no conjuntivo
16360/01	Controle	Difusa	Subepitelial
16435/01	Controle	Focal	Subepitelial
16441/01	Controle	Difusa	Profunda no conjuntivo
16451/01	Controle	Difusa	Subepitelial
16491/01	Controle	Difusa	Profunda no conjuntivo
16617/01	Controle	Difusa	Profunda no conjuntivo
16698/01	Controle	Difusa	Profunda no conjuntivo
16772/01	Controle	Difusa	Profunda no conjuntivo
16865/01	Controle	Difusa	Profunda no conjuntivo
16870/01	Controle	Focal	Subepitelial
16872/01	Controle	Difusa	Profunda no conjuntivo
16884/01	Controle	Difusa	Profunda no conjuntivo
16933/01	Controle	Difusa	Profunda no conjuntivo
16985/01	Controle	Focal	Subepitelial
17001/02	Controle	Difusa	Profunda no conjuntivo
17011/02	Controle	Difusa	Subepitelial

## 2. Análise qualitativa do anticorpo anti – CD 8

Lâmina	Grupo	Distribuição das células CD 8 positivas	Localização das células CD 8 positivas
15659/00	Cândida	Focal	Penetrando o epitélio
15674/00	Cândida	Focal	Subepitelial
15675/00	Cândida	Focal	Subepitelial
16016/01	Cândida	Focal	Subepitelial
16234/00	Cândida	Focal	Subepitelial
16243/00	Cândida	Focal	Subepitelial
16305/01	Cândida	Focal	Subepitelial
16311/01	Cândida	Focal	Penetrando o epitélio
16359/01	Cândida	Focal	Subepitelial
16363/01	Cândida	Focal	Subepitelial
16444/01	Cândida	Focal	Penetrando o epitélio
16491/01	Cândida	Focal	Subepitelial
16515/01	Cândida	Focal	Subepitelial
16578/01	Cândida	Focal	Subepitelial
16865/02	Cândida	Focal	Penetrando o epitélio
16870/02	Cândida	Focal	Subepitelial
16949/02	Cândida	Focal	Subepitelial
16972/02	Cândida	Focal	Penetrando o epitélio
16976/02	Cândida	Focal	Penetrando o epitélio
17013/02	Cândida	Focal	Subepitelial
17024/02	Cândida	Focal	Subepitelial
17533/02	Cândida	Focal	Penetrando o epitélio

Lâmina	Grupo	Distribuição das células CD 8 positivas	Localização das células CD 8 positivas
15820/00	Controle	Focal	Subepitelial
16223/00	Controle	Focal	Subepitelial
16249/01	Controle	Focal	Subepitelial
16360/01	Controle	Focal	Subepitelial
16435/01	Controle	Focal	Subepitelial
16441/01	Controle	Focal	Subepitelial
16451/01	Controle	Focal	Subepitelial
16491/01	Controle	Focal	Subepitelial
16617/01	Controle	Focal	Subepitelial
16698/01	Controle	Focal	Subepitelial
16772/01	Controle	Focal	Subepitelial
16865/01	Controle	Focal	Subepitelial
16870/01	Controle	Focal	Subepitelial
16872/01	Controle	Focal	Subepitelial
16884/01	Controle	Focal	Subepitelial
16933/01	Controle	Focal	Subepitelial
16985/01	Controle	Focal	Subepitelial
17001/02	Controle	Focal	Subepitelial
17011/02	Controle	Focal	Subepitelial

## 2. Marcação com anticorpo anti – CD 4

Lâmina	Grupo	Distribuição das células CD 4 positivas	Localização das células CD 4 positivas
15659/00	Cândida	Focal	Subepitelial
15674/00	Cândida	Focal	Subepitelial
15675/00	Cândida	Focal	Subepitelial
16016/01	Cândida	Focal	Subepitelial
16234/00	Cândida	Difusa	Subepitelial
16243/00	Cândida	Focal	Subepitelial
16305/01	Cândida	Focal	Subepitelial
16311/01	Cândida	Focal	Subepitelial
16359/01	Cândida	Focal	Subepitelial
16363/01	Cândida	Focal	Subepitelial
16444/01	Cândida	Focal	Subepitelial
16491/01	Cândida	Difusa	Subepitelial
16515/01	Cândida	Focal	Subepitelial
16578/01	Cândida	Focal	Subepitelial
16865/02	Cândida	Focal	Subepitelial
16870/02	Cândida	Difusa	Subepitelial
16949/02	Cândida	Focal	Subepitelial
16972/02	Cândida	Difusa	Subepitelial
16976/02	Cândida	Focal	Subepitelial
17013/02	Cândida	Focal	Subepitelial
17024/02	Cândida	Focal	Subepitelial
17533/02	Cândida	Focal	Subepitelial

Lâmina	Grupo	Distribuição das células CD 4 positivas	Localização das células CD 4 positivas
15820/00	Controle	Focal	Subepitelial
16223/00	Controle	Difusa	Subepitelial
16249/01	Controle	Focal	Subepitelial
16360/01	Controle	Focal	Subepitelial
16435/01	Controle	Focal	Profunda no conjuntivo
16441/01	Controle	Focal	Subepitelial
16451/01	Controle	Focal	Subepitelial
16491/01	Controle	Focal	Subepitelial
16617/01	Controle	Focal	Subepitelial
16698/01	Controle	Focal	Subepitelial
16772/01	Controle	Focal	Subepitelial
16865/01	Controle	Focal	Subepitelial
16870/01	Controle	Focal	Subepitelial
16872/01	Controle	Focal	Subepitelial
16884/01	Controle	Focal	Subepitelial
16933/01	Controle	Difusa	Subepitelial
16985/01	Controle	Focal	Subepitelial
17001/02	Controle	Focal	Subepitelial
17011/02	Controle	Difusa	Subepitelial



## ANEXO 5

### 1. Análise quantitativa da marcação com anticorpo anti – CD 20

Lâmina	Grupo	Células CD 20 positivas	Linfócitos totais	<i>Razão CD 20/ Linfócitos totais</i>
15659/00	Cândida	15	235	<i>0,0638</i>
15674/00	Cândida	4	128	<i>0,0312</i>
15675/00	Cândida	6	179	<i>0,0355</i>
16016/01	Cândida	5	156	<i>0,0320</i>
16234/00	Cândida	5	161	<i>0,0310</i>
16243/00	Cândida	6	173	<i>0,0346</i>
16305/01	Cândida	0	51	<i>0</i>
16311/01	Cândida	1	74	<i>0,0135</i>
16359/01	Cândida	6	144	<i>0,0416</i>
16363/01	Cândida	1	60	<i>0,0166</i>
16444/01	Cândida	17	253	<i>0,0671</i>
16491/01	Cândida	5	138	<i>0,0362</i>
16515/01	Cândida	0	17	<i>0</i>
16578/01	Cândida	5	92	<i>0,0543</i>
16865/02	Cândida	5	149	<i>0,0335</i>
16870/02	Cândida	6	165	<i>0,0363</i>
16949/02	Cândida	1	23	<i>0,0434</i>
16972/02	Cândida	8	248	<i>0,0322</i>
16976/02	Cândida	9	181	<i>0,0497</i>
17013/02	Cândida	13	233	<i>0,0557</i>
17024/02	Cândida	0	57	<i>0</i>
17533/02	Cândida	3	101	<i>0,0297</i>
<i>TOTAL</i>		<i>121</i>	<i>3018</i>	

Lâmina	Grupo	Células CD 20 positivas	Linfócitos totais	Razão CD 20/ Linfócitos totais
15820/00	Controle	5	136	0,0367
16223/00	Controle	7	182	0,0384
16249/01	Controle	1	20	0,05
16360/01	Controle	0	21	0
16435/01	Controle	5	129	0,0387
16441/01	Controle	6	154	0,0389
16451/01	Controle	7	158	0,0443
16491/01	Controle	0	18	0
16617/01	Controle	11	103	0,1067
16698/01	Controle	7	178	0,0383
16772/01	Controle	8	209	0,0382
16865/01	Controle	13	196	0,0663
16870/01	Controle	0	44	0
16872/01	Controle	0	15	0
16884/01	Controle	4	103	0,0388
16933/01	Controle	5	155	0,0322
16985/01	Controle	6	150	0,04
17001/02	Controle	5	133	0,0375
17011/02	Controle	5	53	0,0943
<i>TOTAL</i>		95	2157	

## 2. Análise quantitativa da marcação com anticorpo anti – CD 8

Lâmina	Grupo	Células CD 8 positivas	Linfócitos totais	<i>Razão CD 8/ Linfócitos totais</i>
15659/00	Cândida	41	135	<i>0,3037</i>
15674/00	Cândida	25	82	<i>0,3048</i>
15675/00	Cândida	29	95	<i>0,3052</i>
16016/01	Cândida	32	106	<i>0,3018</i>
16234/00	Cândida	28	92	<i>0,3043</i>
16243/00	Cândida	31	102	<i>0,3039</i>
16305/01	Cândida	60	200	<i>0,30</i>
16311/01	Cândida	17	52	<i>0,3269</i>
16359/01	Cândida	18	59	<i>0,3050</i>
16363/01	Cândida	10	32	<i>0,3125</i>
16444/01	Cândida	58	193	<i>0,3005</i>
16491/01	Cândida	29	96	<i>0,3020</i>
16515/01	Cândida	18	58	<i>0,3103</i>
16578/01	Cândida	43	153	<i>0,2810</i>
16865/02	Cândida	30	99	<i>0,3030</i>
16870/02	Cândida	27	89	<i>0,3033</i>
16949/02	Cândida	31	105	<i>0,2952</i>
16972/02	Cândida	31	102	<i>0,3039</i>
16976/02	Cândida	20	66	<i>0,3030</i>
17013/02	Cândida	29	97	<i>0,2989</i>
17024/02	Cândida	21	67	<i>0,3134</i>
17533/02	Cândida	12	41	<i>0,2926</i>
<i>TOTAL</i>		<i>640</i>	<i>2121</i>	

Lâmina	Grupo	Células CD 8 positivas	Linfócitos totais	<i>Razão CD 8/ Linfócitos totais</i>
15820/00	Controle	21	83	<i>0,2530</i>
16223/00	Controle	20	80	<i>0,25</i>
16249/01	Controle	19	78	<i>0,2435</i>
16360/01	Controle	12	48	<i>0,25</i>
16435/01	Controle	22	87	<i>0,2528</i>
16441/01	Controle	18	72	<i>0,25</i>
16451/01	Controle	20	83	<i>0.2409</i>
16491/01	Controle	16	61	<i>0,2622</i>
16617/01	Controle	36	158	<i>0,2278</i>
16698/01	Controle	21	83	<i>0,2530</i>
16772/01	Controle	18	72	<i>0,25</i>
16865/01	Controle	49	201	<i>0,2437</i>
16870/01	Controle	13	50	<i>0,26</i>
16872/01	Controle	7	25	<i>0,28</i>
16884/01	Controle	23	91	<i>0,2527</i>
16933/01	Controle	22	88	<i>0,25</i>
16985/01	Controle	21	84	<i>0,25</i>
17001/02	Controle	20	79	<i>0,2531</i>
17011/02	Controle	12	49	<i>0,2448</i>
<i>TOTAL</i>		<i>390</i>	<i>1572</i>	

## 3. Análise quantitativa da marcação com anticorpo anti – CD 4

Lâmina	Grupo	Células CD 4 positivas	Linfócitos totais	<i>Razão CD 4/ Linfócitos totais</i>
15659/00	Cândida	70	167	<i>0,4161</i>
15674/00	Cândida	64	153	<i>0,4183</i>
15675/00	Cândida	44	106	<i>0,4150</i>
16016/01	Cândida	61	140	<i>0,4357</i>
16234/00	Cândida	49	117	<i>0,4188</i>
16243/00	Cândida	64	151	<i>0,4238</i>
16305/01	Cândida	59	146	<i>0,4041</i>
16311/01	Cândida	29	69	<i>0,4102</i>
16359/01	Cândida	55	128	<i>0,4296</i>
16363/01	Cândida	62	153	<i>0,4052</i>
16444/01	Cândida	52	126	<i>0,4126</i>
16491/01	Cândida	60	144	<i>0,4166</i>
16515/01	Cândida	58	136	<i>0,4264</i>
16578/01	Cândida	65	155	<i>0,4193</i>
16865/02	Cândida	73	175	<i>0,4171</i>
16870/02	Cândida	57	140	<i>0,4071</i>
16949/02	Cândida	57	135	<i>0,4222</i>
16972/02	Cândida	50	120	<i>0,4166</i>
16976/02	Cândida	60	143	<i>0,4195</i>
17013/02	Cândida	47	114	<i>0,4122</i>
17024/02	Cândida	56	135	<i>0,4148</i>
17533/02	Cândida	61	143	<i>0,4265</i>
<i>TOTAL</i>		<i>1253</i>	<i>2996</i>	

Lâmina	Grupo	Células CD 4 positivas	Linfócitos totais	<i>Razão CD 4/ Linfócitos totais</i>
15820/00	Controle	67	164	<i>0,4085</i>
16223/00	Controle	68	163	<i>0,4171</i>
16249/01	Controle	78	186	<i>0,4193</i>
16360/01	Controle	65	156	<i>0,4166</i>
16435/01	Controle	54	129	<i>0,4186</i>
16441/01	Controle	42	107	<i>0,4112</i>
16451/01	Controle	61	146	<i>0,4178</i>
16491/01	Controle	58	140	<i>0,4142</i>
16617/01	Controle	84	204	<i>0,4117</i>
16698/01	Controle	63	153	<i>0,4117</i>
16772/01	Controle	67	161	<i>0,4161</i>
16865/01	Controle	52	126	<i>0,4126</i>
16870/01	Controle	40	96	<i>0,4166</i>
16872/01	Controle	59	142	<i>0,4154</i>
16884/01	Controle	70	170	<i>0,4117</i>
16933/01	Controle	61	143	<i>0,4265</i>
16985/01	Controle	66	158	<i>0,4177</i>
17001/02	Controle	72	174	<i>0,4137</i>
17011/02	Controle	54	127	<i>0,4251</i>
<i>TOTAL</i>		<i>1153</i>	<i>2845</i>	