

Células mastocitárias estão presentes no líquen plano oral

Mast cells are present in oral

Ludmila de Faro Valverde¹, Paloma Perez Castro¹, Larissa Silva Souza¹, Tássia Amaral Gomes¹, Caroline Luquini Santos¹, Francisco de Assis Caldas Pereira¹, Andreia Cristina Leal Figueiredo², Jean Nunes dos Santos³

¹ Estudantes de graduação, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia; ² PhD, Professora de Odontologia Coletiva da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia; ³ PhD, Chefe do Laboratório de Patologia Cirúrgica Oral. Professor associado da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia.

RESUMO

O líquen plano (LPO) é uma doença inflamatória crônica que acomete pele e mucosa e atinge em média 1 a 2% da população, sendo mais comum em mulheres de meia idade. Apesar da etiologia desconhecida, muitos achados sugerem que essa doença é mediada por reações imunológicas. O presente estudo consistiu em uma análise da distribuição das células mastocitárias, através do azul de toluidina. A população mastocitária foi contada por dois observadores, na área correspondente à inflamação liquenoide e na área imediatamente após, e comparada com a de um fragmento de mucosa bucal normal. Os resultados mostraram um número médio maior de células mastocitárias nas áreas correspondentes à inflamação liquenoide, em comparação com o da mucosa oral normal. Isto foi comprovado estatisticamente através do teste de Kruskal-Wallis, no qual houve diferença significativa ($p < 0,005$) entre as médias de mastócitos encontradas. Do estudo, concluiu-se que existe uma importante interação entre a população de células mastocitárias e os linfócitos presentes na lesão, os quais exercem um papel marcante na patogênese e cronicidade do líquen plano oral.

Palavras-chave: Líquen Plano Bucal. Mastócitos.

Abstract:

Lichen planus is a chronic inflammatory disease affecting skin and mucosae. It may reach 1-2% of the population, being more common in middle-aged women. Despite the unknown etiology, many findings suggest that this disease is mediated by immunological reactions. The aim of this was to analyse the distribution of mast cells by toluidine blue. The mast cell population was counted by two observers in the area corresponding to the lichenoid inflammation, and the area immediately after, and compared to normal oral mucosa. The results showed a larger average number of mast cells in areas corresponding to the lichenoid inflammation compared to normal oral mucosa. This was confirmed statistically by the Kruskal-Wallis, as there was significant difference ($p < 0,005$) between the mast cell mean found. In conclusion, there is an important interaction between the population of mast cells and lymphocytes present in the lesion, which exerts a pivotal role in the pathogenesis and chronicity of oral lichen planus.

Keywords: Lichen Planus, Oral. Mast cells.

INTRODUÇÃO

O líquen plano é uma doença inflamatória crônica que acomete pele e mucosa^{1,2,3,4}. Atinge, em média, 1 a 2% da população, sendo mais comum em mulheres de meia idade^{2,3,5,6,7}. Nos últimos anos, o LPO foi classificado pela OMS como uma condição pré-maligna, sendo, portanto, necessário o acompanhamento dos pacientes a longo prazo^{2,4,8,9}. Clinicamente, apresenta-se sob dois tipos: reticular e erosivo. A forma reticular é a mais frequente, porém assintomática, caracterizando-se por finas linhas brancas entrelaçadas em forma de rede (estrias de Wickham) distribuídas bilateralmente na mucosa jugal posterior^{6,7,10}. A forma erosiva é sintomática e, portanto, mais expressiva, manifestando-se bilateralmente como áreas atróficas e ulceradas, frequentemente cercadas por finas estrias que se irradiam para a periferia.^{6,10,11}

Recebido em 05 de julho de 2010; revisado em 16 de fevereiro de 2011. Correspondência / Correspondence: Jean Nunes dos Santos. Av. Araújo Pinho, 62, Canela, CEP: 40110 -150. Salvador - Bahia - Brasil. Tel./Fax. 55 71 3283- 9019/3283- 8962. E-mail: jeanunes@ufba.br

Histologicamente, as lesões consistem em um revestimento epitelial que apresenta degeneração liquefativa da camada basal e intenso infiltrado inflamatório disposto em faixa subepitelial, composto predominantemente por linfócitos T^{2,10,11}. Também podem ser observadas outras características como hiperqueratose, corpos de Civatte e separação entre epitélio e lâmina própria^{2,10}. As cristas epiteliais podem estar ausentes, hiperplásicas ou, mais comumente, em forma de "dentes de serra".^{2,3,10,11}

Apesar da etiologia desconhecida, muitos achados sugerem que o LPO é mediado por reações imunológicas que têm como alvo os queratinócitos da camada basal, ou ainda a degranulação de mastócitos e a ativação de metaloproteinases da matriz. Esses mecanismos associados levariam ao acúmulo de linfócitos T na lâmina própria superficial, provocando rompimento da membrana basal e migração de linfócitos T para o interior do epitélio.^{2,11,12}

Os mastócitos são células altamente granuladas, conhecidas por seu relevante papel nos processos

inflamatórios e por sua capacidade de responder a estímulos imunológicos. A ativação das células mastocitárias com consequente liberação de moléculas pró-inflamatórias, imunorregulatórias e angiogênicas desencadeia eventos como mitogênese, degradação de matriz extracelular, angiogênese, elevação da permeabilidade microvascular e recrutamento de outras células inflamatórias.³

Tendo em vista ser frequente o aumento do número de mastócitos em lesões de LPO^{3,5,13,14}, o objetivo do presente estudo é analisar a distribuição de células mastocitárias em lesões de LPO, bem como sua relação funcional com o infiltrado inflamatório presente na lesão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Um total de 22 casos com diagnóstico histopatológico de LPO, referentes ao período de 2002 a 2008, foram selecionados dos arquivos do laboratório de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia.

Dados referentes a cada caso, como sexo, idade e localização da lesão, foram obtidos a partir da avaliação das fichas de biópsia de cada paciente. Posteriormente, secções de 5- μ m foram coradas em hematoxilina e eosina (H/E). As lâminas confeccionadas foram submetidas a uma revisão histopatológica por um patologista experiente, a fim de confirmar o diagnóstico de LPO, com base nas características descritas por Sousa e Rosa², Sousa et al.⁹, Brant, Vasconcelos e Rodrigues¹¹, Sugerman et al.¹² e Cortés-Ramirez et al.¹⁷: degeneração por liquefação da camada basal do epitélio, acompanhada por um intenso infiltrado linfocitário disposto em faixa, presença de corpos de Civatte, cristas interpapilares ausentes, hiperplásicas ou, mais frequentemente, em forma de “dente de serra”, variações da espessura da camada espinhosa e graus variáveis de orto ou paraqueratose.

Dos 22 casos iniciais, 4 foram descartados após a revisão pelo patologista e 3 por não conter material suficiente para um novo corte. Os 15 casos restantes foram submetidos a um novo corte de 5 μ m e corados com o azul de toluidina. Essa coloração, através da metacromasia, possibilitou a visualização e a quantificação dos mastócitos situados nas áreas de inflamação das referidas lâminas. Uma amostra de tecido normal foi usada como controle.

A contagem das células mastocitárias foi realizada por dois observadores, com o uso de microscópio binocular no aumento fiel de 400x. A análise quantitativa dos mastócitos foi feita pela divisão do espécime em 2 áreas: uma na faixa de inflamação liquenoide e outra adjacente a ela, estabelecendo-se um limite de 10 campos microscópicos por área, sendo cada mastócito contado como uma unidade, e o número médio estabelecido.

O número de mastócitos presentes nas lesões de LPO foi submetido ao teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney. A comparação com a mucosa oral saudável foi feita através do teste de Kruskal-Wallis. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

RESULTADOS

De um total de 15 casos de líquen plano oral, 66,7% (n = 10) corresponderam ao sexo feminino e 33,3% (n = 5) ao sexo masculino. A idade variou entre 18 e 73 anos, sendo a média de 41,9 anos. A mucosa jugal correspondeu ao sítio mais acometido pelo LPO, ocorrendo em 73,3% dos casos estudados (Figura 1).

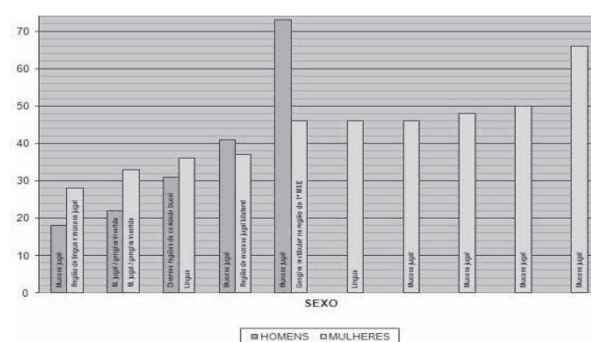


Figura 1 – Idade, sexo e localização da lesão dos pacientes com LPO estudados, Salvador, 2009

Observador	Área inflamada		Área adjacente		Área saudável	
	média	DP	média	DP	Media	DP
A ¹	6,55	8,17	4,01	4,20	1,70	1,49
B ²	6,89	8,26	4,16	4,19	1,50	1,43

Quadro 1 – Distribuição das médias de mastócitos encontradas em áreas com inflamação, adjacentes e saudáveis, Salvador, 2009.

Nota: *Examinador 1 e 2 – 300 observações cada; DP = Desvio Padrão

Na área da inflamação liquenoide, a maioria dos mastócitos apresentava-se em degranulação e com uma coloração menos intensa, quando comparados aos da área adjacente, onde os mastócitos estavam mais visíveis, mais corados, com os grânulos condensados em seu interior e de tamanho aumentado.

A média de mastócitos correspondente à área inflamada, para o observador A¹, foi de 6,55, enquanto que, para o observador B², foi de 6,89. Na área imediatamente adjacente, a média de mastócitos para o observador A¹ foi de 4,01 e, para o observador B², foi de 4,16 (Quadro 1). De acordo com o teste de Mann-

Whitney, o número de células mastocitárias encontrado nas áreas com inflamação foi superior ao encontrado em áreas adjacentes, tanto para o observador A ($p = 0,015$) quanto para o observador B ($p = 0,018$), verificando-se, portanto, diferença estatisticamente significativa entre as duas áreas (Quadro 1)

O teste de Kruskal-Wallis comprovou que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,005$) entre as médias de mastócitos encontradas na área de inflamação liquenoide, área adjacente correspondente e o fragmento de mucosa saudável. Verificou-se um número reduzido de mastócitos na mucosa saudável quando comparado com o das outras duas áreas inicialmente descritas. Para o observador A¹, a média de mastócitos na mucosa saudável foi de 1,7, e, para o observador B², foi de 1,5.

DISCUSSÃO

Os mastócitos são células imunes multifuncionais e secretoras que participam na regulação de respostas imunológicas através da liberação de mediadores químicos a partir de um estímulo apropriado¹⁴. Dessa forma, o número de mastócitos encontra-se frequentemente aumentado em lesões de curso inflamatório, tais como LPO, gengivite, inflamação periapical.^{13, 15, 16}

O presente estudo mostrou um aumento significativo no número de mastócitos no LPO quando comparado ao da mucosa oral saudável. Além disso, as células mastocitárias no LPO encontraram-se aumentadas e degranuladas nas áreas de inflamação, em detrimento da área imediatamente adjacente. Estudos recentes comprovam o número aumentado de mastócitos na zona reticular da lâmina própria, assim como uma degranulação acentuada dessas células em lesões como o LPO e outras reações liquenoides^{1, 4, 17}. O grau de degranulação, nessas lesões, pode ser utilizado como um artifício na determinação do diagnóstico diferencial, já que, apesar de apresentarem características clínicas e histopatológicas semelhantes, o LPO e as reações liquenoides necessitam de tratamentos diferenciados¹⁷. Provavelmente, o número elevado de mastócitos na área inflamada pode ser explicado devido à concentração de linfócitos T nessa região e a relação de “feedback” positivo mantida pela liberação de mediadores químicos secretados tanto pelos mastócitos quanto pelos linfócitos T.^{3, 5, 15}

Em especial, na área imediatamente próxima da inflamação liquenoide, os mastócitos observados no presente estudo distribuíram-se preferencialmente na proximidade da membrana basal do leito microvascular. O mecanismo exato pelo qual as células mastocitárias ou seus precursores são recrutados para esses locais não é completamente entendido¹. Essa localização dos mastócitos resulta numa interação com a laminina presente na membrana basal dos vasos através da integrina α -6/ β 1, que serve como um receptor

específico dessa proteína^{13,16}. A proximidade das células mastocitárias com a laminina na membrana basal pode facilitar a síntese de mediadores químicos que atuam no recrutamento de linfócitos e conduzem ao desenvolvimento da lesão.¹³

Existe uma crescente comprovação de que as células T e os mastócitos interagem de uma forma bidirecional na patogênese do LPO^{3, 5, 12, 14}. A partir da diversidade de fatores produzidos pelos mastócitos, alguns estudos vêm tentando relacioná-los à patogênese dessa doença^{12, 14, 15}. As células mastocitárias apresentam maior degranulação no LPO, quando comparadas com a mucosa saudável. Nesse processo de degranulação, há liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas^{12, 14}. Dentre eles, podem ser citados: TNF- α (Fator de Necrose Tumoral), interleucinas, proteínas inflamatórias de mastócitos e RANTES (Regulador da Ativação Normal da Expressão e Secreção de Células T). Além destes, as células mastocitárias também podem produzir e liberar proteases, como quimases e triptases, e fatores angiogênicos, como o Fator de Crescimento Endotelial e Vascular (VEGF).^{3, 15, 16}

O VEGF tem um papel fundamental na regulação fisiológica e patológica da angiogênese, demonstrando exercer, *in vitro*, uma atividade na migração e (ou) proliferação de células endoteliais¹⁸. *In vivo*, tem a função de regular a permeabilidade vascular, importante para dar início ao processo angiogênico. A angiogênese tem um papel-chave na patogênese de doenças inflamatórias crônicas, como o LPO. Além do surgimento de novos vasos, que permitem uma maior oxigenação, um notável aumento no sistema de “feedback” e na circulação de células envolvidas em processos inflamatórios pode ser observado durante a angiogênese¹⁸. Fibroblastos, macrófagos e mastócitos são células inflamatórias que circundam os vasos sanguíneos recém-formados e contribuem para a indução da angiogênese por secretar citocinas e enzimas proteolíticas que mobilizam outros fatores angiogênicos para a matriz extracelular.¹⁹

Dentre as citocinas derivadas de mastócitos, o fator de necrose tumoral (TNF- α) pode influenciar a aderência de células T ao endotélio microvascular, através do aumento na expressão de moléculas de adesão^{1, 12, 15}. Essa superexpressão favorece a adesão dos linfócitos T na parede vascular e prepara o endotélio para a saída dos linfócitos da circulação dos tecidos, mantendo a migração dos leucócitos e promovendo a cronicidade da inflamação^{1, 3, 7, 15, 16}. Em adição, o TNF- α estimula linfócitos T a secretarem metaloproteinases da matriz (MMP), como a collagenase. Elas, juntamente com proteases derivadas de mastócitos, desempenham um papel na quebra de proteínas estruturais da membrana basal, o que facilita a migração de células T da microvasculatura à lâmina própria e ao epitélio^{2, 3, 12, 15, 16}. Em baixas concentrações, o TNF- α pode promover

o crescimento dos ceratinócitos, enquanto que, em altas concentrações, é citotóxico, devido ao estímulo apoptótico.^{7,16}

As citocinas e as quimiocinas derivadas de células T parecem ter um efeito na ativação de mastócitos e na liberação de seus mediadores. O TNF- α induz linfócitos T lesionais a secretarem RANTES, que parece ser o ativador mais potente de mastócitos, causando degranulação e liberação de histamina^{4,14,16}. No LPO, RANTES e seu receptor CCR1 são expressos tanto por células T quanto por mastócitos. Essa quimiocina é conhecida por ter um papel crítico no recrutamento seletivo e na migração de diversas células inflamatórias, incluindo linfócitos T e mastócitos. Dessa forma, o RANTES secretado dos linfócitos T e o CCR1 podem estar envolvidos no acúmulo de células mastocitárias no LPO, atraindo-as para o sítio de desenvolvimento da lesão. A expressão de RANTES pode prolongar a sobrevivência de células inflamatórias no LPO e promover a cronicidade dessa doença.^{12,14}

Acredita-se que mecanismos específicos e não-específicos estejam envolvidos na patogênese do LPO. Além dos supracitados, considerados não-específicos, ocorre também a apresentação de antígenos por queratinócitos da camada basal e morte deles por linfócitos T citotóxicos, considerados específicos.^{2,12}

A complicação mais importante relacionada ao LPO é o seu potencial de transformação maligna, razão pela qual essa doença tem sido considerada uma condição pré-maligna. Entretanto, essa taxa de transformação observada na literatura, normalmente, não excede 1%^{7,8,10}. O mecanismo pelo qual a transformação ocorre ainda não foi elucidado. Estudos sugerem que a inflamação crônica presente no líquen plano oral pode ser a causa principal de alteração maligna²⁰, uma vez que as células inflamatórias e as citocinas por elas produzidas podem ser capazes de afetar a sobrevivência das células, seu crescimento, sua proliferação e diferenciação^{2,9,20}. Além de influenciar os processos de migração celular, as citocinas influenciam também os processos de invasão celular, o que, conseqüentemente, contribui para iniciação, promoção e progressão do câncer.^{2,9,19,20}

Um risco significativo de transformação maligna de LPO para carcinoma de células escamosas tem sido descrito por alguns autores¹⁰, principalmente nas apresentações clínicas atípicas, como o tipo erosivo^{2,7,10}. O presente estudo não foi capaz de identificar as apresentações clínicas do LPO, tendo em vista a ausência de dados nas fichas de biópsia.

A literatura ressalta a importância do diagnóstico diferencial entre o LPO e a displasia liquenoide, já que a displasia é mais suscetível à transformação carcinogênica²⁰. A inflamação presente no LPO pode causar alterações celulares similares às vistas na atipia epitelial, presente da displasia liquenoide, sendo mais difícil diferenciar as duas lesões.

Dessa forma, surge uma controvérsia a respeito do potencial de transformação maligna do LPO, já que uma lesão cancerígena diagnosticada como decorrente do líquen plano poderia ser uma evolução de uma displasia não-detectada². Portanto, áreas que levantem suspeitas de atipias epiteliais, como alteração núcleo/citoplasma, hipercromatismo nuclear, ou mitoses atípicas devem ser rebiopsiadas²⁰

CONCLUSÃO

A presença significativa de células mastocitárias na área correspondente à inflamação liquenoide destaca a contribuição dessas células na patogênese do LPO. Provavelmente, a concentração dessas células se deve à presença de linfócitos T no LPO, e, portanto, os mastócitos contribuem para a cronicidade da lesão.

REFERÊNCIAS

1. JUNEJA, M. et al. Histochemical Analysis of pathological alterations in oral lichen planus and oral lichenoid lesions. *J. Oral Sci.*, Tokyo, v. 48, n. 4, p. 185-193, Dec. 2006.
2. SOUSA, F. A. C. G.; ROSA, L. E. B. Oral lichen planus: clinical and histopathological considerations. *R. Bras. Otorrinolaringol.*, São Paulo, v. 74, n. 2, p. 284-292, Mar/Apr. 2008.
3. ZHAO, Z. Z. et al. Mast cell/T cell interactions in oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med.*, Copenhagen, v. 31, n. 4, p. 189-195, Apr. 2002.
4. ISMAIL, S. B.; KUMAR, S. K.; ZAIN, R. B. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J. Oral Sci.*, Tokyo, v. 49, n. 2, p. 89-106, Jun. 2007.
5. JONTELL, M.; HANSSON, H.-A.; NYGREN, H. Mast cells in oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med.*, Copenhagen, v. 15, n. 5, p. 273-275, May. 1986.
6. CARBONE M. et al. Course of oral lichen planus: a retrospective study of 808 northern Italian patients. *Oral Dis.*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 235-243, Apr. 2009.
7. CORTÉS-RAMÍREZ, D.-A. et al. Oral lichenoid disease as a premalignant condition: The controversies and the unknown. *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.*, Valencia, v. 14, n. 3, p. 118-122, Mar. 2009.
8. VAN DER MEIJ, E. H.; MAST, H.; VAN DER WAAL, I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective five-year follow-up study of 192 patients. *Oral Oncol.*, Oxford, v. 43, n. 8, p. 742-748, Sep. 2007.
9. SOUSA, F. A. C. G. et al. Comparative study of cell alterations in oral lichen planus and epidermoid carcinoma of the mouth mucosa. *R. Bras. Otorrinolaringol.*, São Paulo, v. 75, n. 2, p. 245-248, Mar/Apr. 2009.
10. PAKFRETAT, A. et al. Oral lichen planus: a retrospective study of 420 Iranian patients. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.*, Valencia, v. 14, n. 7, p. 315-318, Jul. 2009.
11. BRANT J. M. C.; VASCONCELOS A. C.; RODRIGUES L. V. Role of apoptosis in erosive and reticular oral lichen planus exhibiting variable epithelial thickness. *Braz. Dent. J.*, Ribeirão Preto, v. 19, n. 3, p. 179-185, Jul. 2008.
12. SUGERMAN, P. B. et al. The pathogenesis of Oral Lichen Planus. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, Michigan, v.13, n. 4, p. 350-365, Jul.2002.
13. ZHAO, Z. Z.; SAVAGE N. W.; WALSH L. J. Associations between mast cells and laminin in oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med.*, Copenhagen, v. 27, n. 4, p. 163-167, Apr. 1998.

14. ZHAO, Z. Z. et al. Mast cell degranulation and the role of T cell RANTES in oral lichen planus. **Oral Dis.**, Copenhagen, v. 7, n. 4, p. 246-251, Jul. 2001.
15. MADHURI, A. R.; ALKA, K. D.; RAMAKANT, N. Mast cells are increased in leukoplakia, oral submucous fibrosis, oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, Mumbai, v. 11, n. 1, p. 18-22, Jan/Jun. 2007.
16. WALSH, L. L. J. Mast Cells and Oral Inflammation. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Michigan, v. 14, n. 3, p. 188-198, May. 2003.
17. JAHANSHAH, G.; AMINZADEH, A. A histochemical and immunohistochemical study of mast cells in differentiating oral lichen planus from oral lichenoid reactions. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 41, n. 3, p. 221-227, Mar. 2010.
18. SCARDINA, G.A. et al. Angiogenesis of Oral Lichen Planus: a possible pathogenic mechanism. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.**, Valencia, v.14, n.11, p.558-562, Nov.2009.
19. RIBATTI, D. et al. Mast cells and their secretory granules are angiogenic in the chick embryo chorioallantoic membrane. **Clin. Exp. Allergy.**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 605-608, Apr. 2001.