

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CÍNTIA MAGALHÃES RIBEIRO

**ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE MACRÓFAGOS M2 E CITOCINAS
IL-1 β , IL-6 E TNF- α EM CISTOS PERIODONTAIS APICAIS**

ALFENAS/MG

2017

CÍNTHIA MAGALHÃES RIBEIRO

**ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE MACRÓFAGOS M2 E CITOCINAS
IL-1 β , IL-6 E TNF- α EM CISTOS PERIODONTAIS APICAIS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Orientador: Prof. Dr. Alessandro A. Costa Pereira

Coorientador: Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann

ALFENAS/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Ribeiro, Cíntia Magalhães.

Análise imuno-histoquímica de macrófagos M2 e citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α em cistos periodontais apicais. / Cíntia Magalhães Ribeiro. -- Alfenas/MG, 2017.

70 f.

Orientador: Alessandro A. Costa Pereira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) -
Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Cisto Radicular. 2. Inflamação. 3. Citocinas. 4. Macrófagos.
I. Pereira, Alessandro A. Costa. II. Título.

CDD-617.6342



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG . CEP 37130-000



CÍNTIA MAGALHÃES RIBEIRO

**“Análise Imuno-Histoquímica de Macrófagos M2 e Citocinas IL-1B, IL-6 e TNF-
em cistos periodontais apicais”**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Odontológicas pela Universidade
Federal de Alfenas. Área de concentração:
Odontologia.

Aprovado em: 22/2/17

Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa. Dra. Vivien Thiemy Sakai
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa. Dra. Soraya de Mattos Camargo
Grossmann
Instituição: PUC-MG

Assinatura:

Dedico este trabalho a Deus, por ter me sustentado e me fortalecido em todos os momentos desta caminhada. Aos meus pais pelo apoio e amor incondicional e por serem o meu amparo e meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela dádiva de realizar este sonho. A Ele agradeço pelas alegrias vividas, direcionamento nos momentos de incertezas e por ser refúgio nos momentos de angústia.

Aos meus pais por serem exemplos de servos fiéis a Deus, que sempre buscam o caminho correto e que nunca mediram esforços para que meus sonhos se realizassem. Ao meu noivo, melhor amigo e companheiro de todas as horas Anderson.

Agradeço ao Professor Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira por sua orientação e por compartilhar seus preciosos conhecimentos.

Ao Professor Dr. João Adolfo Costa Hanemann a quem devo minha gratidão nessa caminhada. Agradeço pela sua disponibilidade, dedicação e empenho para com seus alunos.

À Instituição Unifal-MG juntamente com seus funcionários, professores e equipe.

Ao Professor Dr. Felipe Fornias Sperandio pela sua importante participação no artigo científico e por enriquecer este trabalho desde o período de qualificação.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, na figura de sua pró-reitora, Prof^a. Dr^a. Eva Burguer.

À Faculdade de Odontologia, na figura do seu diretor, Prof. Dr. Edmêr Silvestre Pereira Júnior pela oportunidade oferecida.

Ao Professor Dr. Denismar Alves Nogueira pela preciosa contribuição para a análise estatística deste trabalho.

Aos amigos do Mestrado, pelo companheirismo nas horas felizes e difíceis.

À Professora Dr^a. Marina Lara de Carli pela imensa colaboração em todas as etapas deste trabalho.

À Fapemig, pelo incentivo financeiro depositado neste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho. Obrigada!

RESUMO

O cisto periodontal apical (CPA) forma-se como resultado de uma inflamação crônica induzida por um processo infeccioso bacteriano, com a presença de células inflamatórias e citocinas, as quais estão relacionadas com a formação e crescimento cístico. Os linfócitos são as células predominantes no infiltrado inflamatório de lesões periapicais, e podem se diferenciar em células das respostas imunes Th1 e Th2. Assim como os linfócitos, os macrófagos podem se diferenciar em subtipos celulares. Macrófagos M1 e M2 desempenham um papel importante no direcionamento da resposta imune, devido a sua capacidade de promover a diferenciação de linfócitos em Th1 e Th2 respectivamente. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença da resposta Th1 e macrófagos M1, por meio da expressão de IL-1 β , TNF- α e IL-6, e a resposta Th2, pela presença de macrófagos M2 por meio da expressão de CD163 na cápsula cística de 24 casos de CPAs. A avaliação dos biomarcadores foi realizada através de reações imuno-histoquímicas, dividindo a espessura da cápsula em regiões superficial e profunda. Observou-se uma maior expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e macrófagos M2 na região superficial ($p < 0,001$). Ausência de correlação foi notada entre a intensidade da inflamação e CD163 na região superficial ($p = 0,082$; $r = 0,362$) e profunda ($p = 0,415$; $r = 0,174$). Verificou-se, ainda, correlação positiva entre IL-1 β e IL-6 e a intensidade da inflamação em ambas regiões. A correlação das expressões das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α mostrou-se positiva em ambas regiões. Em relação ao CD163, houve correlação positiva quando correlacionado com o TNF- α ($p = 0,007$; $r = 0,537$) e a IL-6 ($p = 0,018$; $r = 0,478$) na região superficial. Nossos resultados demonstraram a presença da resposta imune Th1 e macrófagos M1 nos CPAs por meio da expressão das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e resposta imune Th2 por meio da presença de macrófagos M2 nestas lesões, sendo estas células associadas às citocinas TNF- α e IL-6.

Palavras-chave: Cisto radicular. Inflamação. Citocinas. Macrófagos.

ABSTRACT

The radicular cyst (RC) results from chronic inflammation induced by a bacterial infectious process and reveals the presence of inflammatory cells and cytokines, which are related to the cystic formation and growth. The lymphocytes are the predominant cells in the inflammatory infiltrate of periapical lesions. These cells can differentiate into cell subtypes and produce two types of cellular immune responses: T-helper type 1 (Th1) and T-helper type 2 (Th2). In the same way as lymphocytes, the macrophages can differentiate into cell subtypes. M1 and M2 macrophages play an important role in the targeting of the immune response, due to their ability to promote the differentiation of lymphocytes towards Th1 and Th2 pathways, respectively. The aim of the present study was to evaluate the presence of Th1 response and macrophages M1, through the expression of IL-1 β , TNF- α and IL-6, and Th2 response and the presence of macrophages M2 through the expression of CD163 in cystic capsule of twenty-four cases of RCs. The biomarkers were evaluated by immunohistochemical reactions, dividing the capsule thickness into superficial and deep regions. A greater expression of the cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α and M2 macrophages in the superficial region ($p < 0.001$) was observed. Absence of correlation was noted among the intensity of inflammation and CD163 in the superficial ($p = 0.082$, $r = 0.362$) and deep region ($p = 0.415$; $r = 0.174$). There was also a positive correlation among IL-1 β and IL-6 and the intensity of inflammation in both regions. The correlation of IL-1 β , IL-6 and TNF- α cytokines expression was positive in both regions. In relation to CD163, there was a positive correlation when correlated with TNF- α ($p = 0.007$, $r = 0.537$) and IL-6 ($p = 0.018$, $r = 0.478$) in the superficial region. Our results demonstrated the presence of the Th1 immune response and M1 macrophages in CPAs through the expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6 cytokines and Th2 immune response through the presence of M2 macrophages in these lesions. In addition, M2 cells were associated with TNF- α and IL-6 cytokines.

Keywords: Radicular cyst. Inflammation. Cytokines. Macrophages.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------|--|-----------|
| Figura 1 - | Ilustração da captura dos campos utilizando o software AxioVision Rel 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha)..... | 31 |
| Figura 2 - | Expressão imuno-histoquímica do anticorpo TNF- α na região superficial da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – anti-TNF- α 400x)..... | 39 |
| Figura 3 - | Expressão imuno-histoquímica do anticorpo TNF- α na região profunda da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – anti-TNF- α 400x)..... | 39 |
| Figura 4 - | Expressão imuno-histoquímica do anticorpo IL-1 β na região superficial da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – anti-IL-1 β 400x)..... | 41 |
| Figura 5 - | Expressão imuno-histoquímica do anticorpo IL-1 β na região profunda da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – anti-IL-1 β 400x)..... | 41 |
| Figura 6 - | Expressão imuno-histoquímica do anticorpo IL-6 na região superficial da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – anti-IL-6 400x)..... | 43 |
| Figura 7 - | Expressão imuno-histoquímica do anticorpo IL-6 na região profunda da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – anti-IL-6 400x)..... | 43 |
| Figura 8 - | Expressão imuno-histoquímica do anticorpo CD163 na região superficial da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – antiCD163 400x)..... | 45 |
| Figura 9 - | Expressão imuno-histoquímica do anticorpo CD163 na região profunda da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – antiCD163 400x)..... | 45 |
| Gráfico 1 - | Comparação entre a expressão do marcador TNF- α e a intensidade da inflamação na região superficial..... | 38 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| Gráfico 2 - | Comparação entre a expressão do marcador TNF- α e a intensidade da inflamação na região profunda..... | 38 |
| Gráfico 3 - | Comparação entre a expressão do marcador IL-1 β e a intensidade da inflamação na região superficial..... | 40 |
| Gráfico 4 - | Comparação entre a expressão do marcador IL-1 β e a intensidade da inflamação na região profunda..... | 40 |
| Gráfico 5 - | Comparação entre a expressão do marcador IL-6 e a intensidade da inflamação na região superficial..... | 42 |
| Gráfico 6 - | Comparação entre a expressão do marcador IL-6 e a intensidade da inflamação na região profunda..... | 42 |
| Gráfico 7 - | Comparação entre a expressão do marcador CD163 e a intensidade da inflamação na região superficial..... | 44 |
| Gráfico 8 - | Comparação entre a expressão do marcador CD163 e a intensidade da inflamação na região profunda..... | 44 |
| Gráfico 9 - | Comparação entre a expressão dos marcadores IL-1 β e CD163 na região superficial..... | 46 |
| Gráfico 10 - | Comparação entre a expressão dos marcadores IL-1 β e CD163 na região profunda..... | 46 |
| Gráfico 11 - | Comparação entre a expressão dos marcadores IL-6 e CD163 na região superficial..... | 47 |
| Gráfico 12 - | Comparação entre a expressão dos marcadores IL-6 e CD163 na região profunda..... | 47 |
| Gráfico 13 - | Comparação entre a expressão dos marcadores TNF- α e CD163 na região superficial..... | 48 |
| Gráfico 14 - | Comparação entre a expressão dos marcadores TNF- α e CD163 na região profunda..... | 48 |
| Gráfico 15 - | Comparação entre a expressão dos marcadores IL-1 β e IL-6 na região superficial..... | 49 |
| Gráfico 16 - | Comparação entre a expressão dos marcadores IL-1 β e IL-6 na região profunda..... | 49 |
| Gráfico 17 - | Comparação entre a expressão dos marcadores IL-1 β e TNF- α na região superficial..... | 50 |

| | |
|---|-----------|
| Gráfico 18 - Comparação entre a expressão dos marcadores IL-1 β e TNF- α na região profunda..... | 50 |
| Gráfico 19 - Comparação entre a expressão dos marcadores TNF- α e IL-6 na região superficial..... | 51 |
| Gráfico 20 - Comparação entre a expressão dos marcadores TNF- α e IL-6 na região profunda..... | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Anti-CD163** - Anticorpo para receptor CD163
- CD163** - Receptor CD163
- CPA** - Cisto Periodontal Apical
- HE** - Hematoxilina e eosina
- IL-1** - Interleucina 1
- IL-1 α** - Interleucina 1 alfa
- IL-1 β** - Interleucina 1 beta
- IL-2** - Interleucina 2
- IL-4** - Interleucina 4
- IL-5** - Interleucina 5
- IL-6** - Interleucina 6
- IL-10** - Interleucina 10
- IL-12** - Interleucina 12
- IL-13** - Interleucina 13
- IFN- γ** - Interferon gama
- LB** - Linfócitos B
- LT** - Linfócitos T
- LTCD4+** - Linfócitos T “auxiliares”
- M1** - Macrófagos com ativação “clássica”
- M2** - Macrófagos com ativação “alternativa”
- NK** - Células “natural killer”
- PBS** - Tampão fosfato-salino
- PMN** - Polimorfonucleares
- Th1** - Subtipo 1 de linfócitos T “auxiliares”
- Th2** - Subtipo 2 de linfócitos T “auxiliares”
- UNIFAL** - Universidade Federal de Alfenas
- μ M** - Micrômetros

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 | Conceito, classificação e terminologia do cisto periodontal apical..... | 15 |
| 2.2 | Etiopatogenia..... | 16 |
| 2.3 | Aspectos clínicos e imagiológicos do cisto periodontal apical..... | 18 |
| 2.4 | Aspectos microscópicos..... | 20 |
| 2.5 | Tratamento..... | 21 |
| 2.6 | Aspectos imunológicos..... | 22 |
| 3 | PROPOSIÇÃO | 29 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 4.1 | Questões éticas..... | 30 |
| 4.2 | Casuística e seleção da amostra..... | 30 |
| 4.3 | Análise microscópica..... | 31 |
| 4.4 | Coloração em hematoxilina e eosina..... | 32 |
| 4.5 | Reação imuno-histoquímica..... | 32 |
| 4.6 | Análise microscópica: lâminas coradas em hematoxilina e eosina..... | 34 |
| 4.7 | Análise microscópica: lâminas submetidas à reação imuno-histoquímica | 34 |
| 4.8 | Análise estatística..... | 35 |
| 5 | RESULTADOS | 36 |
| 6 | DISCUSSÃO | 52 |
| 7 | CONCLUSÃO | 58 |
| | REFERÊNCIAS | 59 |
| | ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA | |
| | EM PESQUISA | 68 |

1 INTRODUÇÃO

Lesões apicais inflamatórias resultam da inter-relação de bactérias presentes no interior dos canais radiculares, com a ação do sistema de defesa do hospedeiro, o qual agirá para eliminar estes agressores. Tais lesões podem ser classificadas como pericementite apical, abscesso dentoalveolar, granuloma apical e cisto periodontal apical de acordo com suas características clínicas e microscópicas (NAIR, 1997; RICUCCI et al., 2006).

Os cistos periodontais apicais são lesões localizadas nos ápices de dentes com polpas necróticas e infectadas, sendo considerados lesões originadas a partir de granulomas apicais (WALKER et al., 2000). Quando os cistos periodontais apicais permanecem após a exodontia do dente envolvido passam a ser denominados cistos residuais (MUGLALI et al., 2008).

O cisto periodontal apical apresenta-se como a lesão cística mais frequente na região dos maxilares, sendo sua maior prevalência entre a 3ª e 4ª décadas de vida (DEL CORSO et al., 2014; SAFI et al., 2008). São lesões assintomáticas e de crescimento lento, descobertas em exames de rotina. Radiograficamente são radiolúcidas, pequenos, entretanto podem atingir tamanhos significativos (AGGARWAL; LOGANI; SHAH, 2008). Possui como características microscópicas a presença de uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso denso revestida por epitélio pavimentoso estratificado e uma cavidade contendo líquido e restos celulares (NEVILLE et al., 2016; RICUCCI et al., 2006).

Os tratamentos disponíveis para o cisto periodontal apical são o tratamento endodôntico convencional ou a remoção cirúrgica da lesão, entretanto não existe um consenso se apenas a terapêutica endodôntica é eficaz (BECCONSALL-RYAN; TONG; LOVE, 2010; SAFI et al., 2008).

O cisto periodontal apical é resultado de uma inflamação crônica induzida por um processo infeccioso bacteriano, onde estão envolvidas células inflamatórias e seus produtos, como as citocinas. Este processo inflamatório está relacionado com a sua formação e crescimento através da ação de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento que são liberados por células presentes na lesão (PRSO et al., 2007; RICUCCI et al., 2006; WALKER et al., 2000).

Os antígenos bacterianos são responsáveis por desencadear respostas imunológicas inespecíficas e específicas. Dentre as células envolvidas nestas respostas, destacam-se polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos (FRAGA et al., 2013; LIAPATAS; NAKOU; RONTOGIANNI, 2003). Inicialmente são produzidas citocinas pró-inflamatórias por estas células na tentativa de conter o agressor. Dentre estas citocinas destacam-se: interleucina 1 beta, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa (SILVA et al., 2005).

A interleucina 1 beta, a interleucina 6 e o fator de necrose tumoral alfa são considerados mediadores pró-inflamatórios sintetizados por macrófagos, dentre outras células, que agem estimulando neutrófilos, linfócitos e macrófagos no foco inflamatório (CARLI et al., 2016) e contribuindo para a remodelação óssea (SILVA et al., 2005).

A resposta imune específica tem como participantes os linfócitos T “auxiliares”. Essas células direcionarão o curso da resposta imunitária pela secreção de citocinas, as quais agem como fatores de crescimento e de diferenciação para os próprios linfócitos T “auxiliares” e para outras células. Os linfócitos T “auxiliares” podem se diferenciar em subtipos celulares, e assim produzir dois tipos de respostas imune celular: Th1 e Th2. A resposta Th1 relaciona-se com a progressão da lesão, enquanto a resposta Th2 tem por objetivo o processo de cura (FRAGA et al., 2013; HENRIQUES et al., 2011; HREN; IHAN, 2009).

Os macrófagos são células pertencentes ao sistema de defesa e agirão como fagócitos na resposta imune inespecífica, ou pela apresentação de antígenos aos linfócitos T na resposta imune específica. A ativação dos macrófagos pode ocorrer no foco inflamatório pela ação de toxinas bacterianas e por citocinas da resposta Th1, sendo estes denominados “macrófagos de ativação clássica” ou macrófagos M1. Outra forma de ativação dos macrófagos, nomeada de “ativação alternativa” ocorre pela ação de citocinas pertencentes à resposta Th2, estes macrófagos são denominados de macrófagos M2 e desempenham papéis importantes no processo de reparo tecidual (CARLI et al., 2016; IVASHKIV, 2013).

Os cistos periodontais apicais são lesões frequentemente encontradas na prática clínica. O entendimento sobre os mecanismos de defesa envolvidos na patogenia desta lesão pode contribuir para a escolha de uma melhor forma de tratamento. Até o presente, não existem na literatura estudos identificando a presença de macrófagos M2 em cistos periodontais.

Deste modo, o presente trabalho objetivou analisar a resposta imune celular Th1 por meio da expressão de interleucina 1 beta, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa, e a resposta imune celular Th2 pela presença de macrófagos M2.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conceito, classificação e terminologia do cisto periodontal apical

As lesões apicais inflamatórias podem ser classificadas em: pericementite apical, abscesso dentoalveolar, granuloma apical e cisto periodontal apical (CPA), (DE DEUS, 1992; NAIR, 1997; SHAFER; HINE; LEVY, 1987), sendo que apenas o CPA apical será abordado nesta revisão de literatura.

Lesões apicais inflamatórias são causadas principalmente pela presença de bactérias no interior dos canais radiculares e na região apical dos dentes, o que desencadeia uma resposta de defesa pelo hospedeiro na tentativa de eliminá-las. Entretanto, os mediadores inflamatórios e as células de defesa não são capazes de penetrar no sistema de canais radiculares e a combinação da persistência do agressor bacteriano com a resposta imune do hospedeiro leva ao desenvolvimento de lesões de patogenia inflamatória (HARGREAVES; COHEN, 2011; LEONARDO; LEAL, 1998; LOVE; FIRTH, 2009; TAKAHASHI, 1998).

As lesões apicais inflamatórias podem ser classificadas por suas características clínicas, imaginológicas e microscópicas, sendo que esta última permite a confirmação do diagnóstico. Dentre este grupo de lesões, destacam-se os granulomas apicais e os cistos periodontais apicais (HUUMONEN; ØRSTAVIK, 2002; LEONARDO; LEAL; SIMÕES FILHO, 2005; LOVE; FIRTH, 2009; NEVILLE et al., 2016).

Os granulomas apicais são constituídos de uma inflamação crônica nos tecidos perirradiculares (MARTIN; SPEIGHT, 2015) e são formados por uma massa localizada de tecido de granulação contendo predominantemente macrófagos, linfócitos, plasmócitos e um fibrosamento periférico (CARRILLO GARCÍA et al., 2007; HARGREAVES; COHEN, 2011; SHAFER; HINE; LEVY, 1987).

Os cistos odontogênicos são cavidades patológicas revestidas por epitélio originado na odontogênese e são classificados em cistos odontogênicos do desenvolvimento e cistos odontogênicos inflamatórios de acordo com sua etiopatogenia (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992; NAIR, 1997).

Os cistos odontogênicos inflamatórios são lesões intraósseas destrutivas relativamente comuns, e dentre esses, destacam-se o CPA e o cisto residual, sendo o CPA o de maior incidência entre os cistos odontogênicos (AVELAR et al., 2009; OCHSENIUS et al., 2007; PROCKT et al., 2008).

O CPA também recebe a denominação de cisto radicular, cisto periapical e cisto perirradicular (SHAFER; HINE; LEVY, 1987; DE DEUS, 1992) e se forma nos ápices de dentes com polpas necróticas e infectadas, sendo considerado uma transformação direta do granuloma apical, embora nem todo granuloma transforma-se em um cisto durante o seu desenvolvimento (NAIR, 1998; NEVILLE et al., 2016; REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008). O CPA que permanece após a exodontia do dente envolvido é denominado de residual (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992; MARTIN; SPEIGHT, 2015) e o que ocorre lateralmente à raiz, de CPA variante lateral (NEVILLE et al., 2016).

2.2 Etiopatogenia

A morte pulpar propicia às bactérias e seus antígenos, antes confinados no interior do sistema de canais radiculares, o acesso ao tecido periapical causando uma agressão e uma resposta imune do hospedeiro, caracterizada pela presença de células inflamatórias e seus produtos (NAIR, 1997; RODINI; LARA, 2001; TAKAHASHI, 1998). Surge assim, no ápice do dente desvitalizado um tecido de granulação com inflamação crônica denominado granuloma apical, que poderá evoluir para um CPA (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992; REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008).

Estabeleceu-se que a transformação cística do granuloma apical, ocorre por estimulação à proliferação dos restos epiteliais de Malassez presentes no ligamento periodontal em resposta à inflamação, a partir do momento em que as bactérias e seus produtos avançam para fora do sistema de canais radiculares e atingem os tecidos periapicais (MARTIN; SPEIGHT, 2015; MEGHJI et al., 1996; NAIR, 1998; NEVILLE et al., 2016). Os restos epiteliais de Malassez são ninhos de células formados após a desintegração da bainha epitelial de Hertwig durante a odontogênese. Estas células permanecem em repouso no ligamento periodontal dos

dentos, entretanto podem se proliferar na presença de estímulos (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007). A formação cística surge como resultado da proliferação epitelial, devido à influência de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento que são liberados por várias células presentes na lesão apical, promovendo uma barreira entre o agressor e o osso adjacente (REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008).

Teorias têm sido propostas na tentativa de explicar a formação do CPA. Segundo alguns autores, a teoria da deficiência nutricional presume que, devido ao crescimento de ilhotas de epitélio, as células epiteliais centrais se distanciam da sua fonte de suprimento nutricional e sofrem degeneração e necrose por liquefação. Então, essas microcavidades coalesceriam para formar uma cavidade cística revestida por epitélio (HARGREAVES; COHEN, 2011; LEONARDO; LEAL, 1998; NAIR, 1997).

Outra explicação para a formação cística é a teoria do abscesso baseada no fato de que, quando um abscesso é formado no tecido conjuntivo ou ocorre segmentos de tecido conjuntivo necrosado, as células epiteliais proliferam e revestem as áreas de abscesso, devido a sua tendência de recobrir a superfície exposta de tecido conjuntivo (HARGREAVES; COHEN, 2011; NAIR; SUNDQVIST; SJÖGREN, 2008).

A teoria da fusão dos cordões epiteliais propõe que os cordões epiteliais em proliferação se unem ao redor de áreas de tecido conjuntivo, formando ilhas de tecido conjuntivo que se degeneram gradualmente devido à falta de suprimento sanguíneo, levando à formação de uma cavidade cística (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007). Entretanto, atualmente não existe nenhuma teoria que comprove a formação dos CPAs (BERNARDI et al., 2015; LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007; NAIR; SUNDQVIST; SJÖGREN, 2008).

Após sua formação, os CPAs apresentam capacidade de se expandir devido à entrada de líquido no interior da cavidade cística. À medida que o epitélio se descama para o interior da cavidade, aumenta o conteúdo proteico, tornando-o hipertônico e ocasionando a atração de líquido para a cavidade na tentativa de equilibrar a pressão osmótica e ocorrendo um crescimento lento do CPA (DE DEUS, 1992; MARTIN; SPEIGHT, 2015). Kubota et al. (2004) observaram que a pressão intracística se relaciona negativamente com o tamanho do cisto, assim, esta pressão pode apresentar um papel importante no crescimento cístico nos estágios iniciais.

2.3 Aspectos clínicos e imaginológicos do cisto periodontal apical

O CPA representa a lesão cística mais comumente encontrada nos maxilares, correspondendo a mais de 50% de todos os cistos odontogênicos (AVELAR et al., 2009; DEL CORSO et al., 2014; TEKKESIN et al., 2012). Entre as lesões periapicais inflamatórias, os CPAs representam entre 23% a 29% das lesões inflamatórias (BECCONSALL-RYAN; TONG; LOVE, 2010; SCHULZ et al., 2009).

O CPA pode localizar-se no ápice de qualquer dente desvitalizado, sendo a maioria encontrada na maxila (REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008; TEKKESIN et al., 2012; TORTORICI et al., 2008), com maior frequência na região anterior, seguida pela região posterior; na mandíbula ocorre mais na região posterior (BECCONSALL-RYAN; TONG; LOVE, 2010; SHARIFIAN; KHALILI, 2012). O fato da região anterior da maxila ser mais frequentemente afetada pode ser explicado por razões estéticas, considerando-se que os pacientes tendem a preservar seus dentes anteriores, mesmo quando o tratamento endodôntico não foi adequado, estando assim, mais sujeitos a desenvolver processos inflamatórios crônicos (OCHSENIUS et al., 2007). Na dentição decídua os CPAs são menos comuns, como observou Tkaczuk et al. (2015) em seu estudo sobre lesões císticas em crianças, onde tais cistos representavam 10% das lesões císticas diagnosticadas.

A prevalência do CPA é maior entre a 3ª e 4ª décadas de vida (ALCANTARA et al., 2013; DEL CORSO et al., 2014; PROCKT et al., 2008; TEKKESIN et al., 2012). Quanto à distribuição entre os gêneros, segundo Prockt et al. (2008) e Ochsenius et al. (2007) o gênero feminino apresentou maior incidência, correspondendo respectivamente 52,3% e 51,8%. Outros trabalhos mostraram o gênero masculino sendo o de maior incidência, correspondendo respectivamente 53,5%, 56,8% e 55,2% (SHARIFIAN; KHALILI, 2012; TEKKESIN et al., 2012; TORTORICI et al., 2008).

Os CPAs são assintomáticos, a menos que exista uma exacerbação inflamatória com agudização e são frequentemente descobertos nos exames radiográficos de rotina. Apresentam crescimento lento causando reabsorção óssea, e apenas quando atingem grandes tamanhos ocasionam expansões de corticais com abaulamento e sensibilidade no local, podendo ocorrer mobilidade e deslocamento dos dentes adjacentes (DE DEUS, 1992; NEVILLE et al., 2016).

O padrão radiográfico do CPA apresenta-se semelhante ao do granuloma apical, sendo difícil a diferenciação entre essas duas lesões. Os CPAs e os granulomas apicais podem apresentar-se como imagens radiolúcidas periapicais comumente pequenas, de formato ovalado ou arredondado, com limites definidos e geralmente circundadas por um halo radiopaco. Observa-se também perda da lâmina dura ao longo da raiz adjacente e reabsorções radiculares podem ser notadas (HUUMONEN; ØRSTAVIK, 2002; REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008). Com o crescimento da lesão, a imagem radiolúcida muitas vezes se torna achatada conforme a lesão se aproxima dos dentes adjacentes. É possível que haja um crescimento significativo e podem ser observadas lesões ocupando todo um quadrante (NEVILLE et al., 2016; REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008).

Ainda que os CPAs atinjam com mais frequência tamanhos maiores do que os granulomas apicais, nem o tamanho nem a forma da lesão podem ser considerados critérios para o diagnóstico definitivo. Novas técnicas imaginológicas como a radiografia digital, a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e a ultrassonografia têm sido empregados na tentativa de aprimorar o diagnóstico diferencial entre essas lesões (AGGARWAL; LOGANI; SHAH, 2008; HUUMONEN; ØRSTAVIK, 2002).

O estudo desenvolvido por Aggarwal, Logani e Shah (2008) mostrou 12 casos de lesões periapicais diagnosticados pelo uso da tomografia computadorizada e do ultrassom. Tais métodos imaginológicos foram utilizados no pré cirúrgico em associação com as informações clínicas para a diferenciação entre cistos e granulomas. Obteve-se como resultado diagnósticos imaginológicos coincidentes com os diagnósticos microscópicos das lesões perirradiculares, sugerindo assim que estes seriam métodos valiosos, adicionais e não invasivos de diferenciação destas lesões apicais.

Uma condição necessária para o diagnóstico do cisto periodontal apical e do granuloma é a ausência de vitalidade pulpar do dente envolvido (MARTIN; SPEIGHT, 2015; NEVILLE et al., 2016; REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008). O diagnóstico é feito da combinação dos dados clínicos, radiográficos e da análise microscópica da lesão, sendo esta a mais importante para o estabelecimento do diagnóstico (NAIR, 2004).

2.4 Aspectos microscópicos

Quanto às características microscópicas, o CPA caracteriza-se por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso denso revestida por epitélio e com uma cavidade contendo líquido e restos celulares (NEVILLE et al, 2016; RICUCCI et al., 2006). Os CPAs podem ser classificados como cistos verdadeiros, os quais possuem cavidade cística fechada completamente revestida por epitélio, e “cistos em bolsa” ou “cistos em baía” nos quais as cavidades são revestidas por epitélio e são abertas para os canais radiculares (LOVE; FIRTH, 2009; NAIR, 1998; NAIR; SUNDQVIST; SJÖGREN, 2008).

Os CPAs possuem revestimento de epitélio pavimentoso, estratificado, não queratinizado e de espessura variável, e podem apresentar exocitose e espongiose (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992; REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008). Algumas vezes, células mucosas dispersas ou epitélio colunar pseudoestratificado ciliado podem ser observados (RICUCCI et al., 2006). A cápsula cística é constituída em tecido conjuntivo fibroso denso, com infiltrado inflamatório crônico com padrão difuso ou focal em intensidades variadas, contendo linfócitos, neutrófilos, plasmócitos e macrófagos. A presença de pequenos vasos sanguíneos também é observada na cápsula cística, assim como calcificações distróficas, cristais de colesterol e células gigantes multinucleadas. Na cavidade cística são observados restos necróticos, fluidos e hemácias (CARRILLO GARCÍA et al., 2007; NAIR, 1998; NEVILLE et al., 2016; SCHULZ et al., 2009).

Cury et al. (1998) classificaram os CPAs em dois tipos: hiperplásicos e atróficos. Segundo os autores, o subtipo atrófico possui epitélio pavimentoso estratificado com uma espessura fina e regular, composta de duas a dez camadas de células epiteliais, com um moderado infiltrado inflamatório crônico na cápsula cística. O subtipo hiperplásico corresponde aos cistos com revestimento de epitélio pavimentoso estratificado, irregular e ondulado, de espessura aumentada, associado a um intenso infiltrado inflamatório crônico. Esta relação entre a espessura do revestimento epitelial e do infiltrado inflamatório presente na cápsula cística também foi observada no estudo de Alcantara et al. (2013) onde a maioria das lesões avaliadas apresentava epitélio atrófico e moderado infiltrado inflamatório crônico na cápsula cística. Assim, para Lin et al. (2009), a proliferação de células epiteliais no epitélio de

revestimento cístico parece estar relacionada com a intensidade do infiltrado inflamatório.

2.5 Tratamento

As formas de tratamento existentes para o CPA são a terapêutica endodôntica e a terapêutica cirúrgica, as quais visam a remoção dos micro-organismos agressores (LEONARDO; LEAL; SIMÕES FILHO, 2005; NEVILLE et al., 2016). Existem controvérsias se os CPAs podem ou não regredir após terapia endodôntica não cirúrgica, devido ao fato dos CPAs não poderem ser diagnosticados clinicamente, tendo o seu diagnóstico estabelecido apenas após biópsia ou extração dos dentes com a lesão (LIN; HUANG, ROSENBERG, 2007; LIN et al., 2009; HARGREAVES, COHEN, 2011; NAIR, 1998).

O processo de cura de lesões periapicais apenas com o tratamento endodôntico e sem cirurgia, seguiria os mesmos princípios de cura de qualquer tecido conjuntivo de outra parte do corpo. Após a remoção dos agressores por métodos químicos e mecânicos e a selagem do canal, todos os componentes celulares participantes do processo inflamatório seriam eliminados. Assim, durante o processo de cura, a maioria das células inflamatórias, das células endoteliais e dos fibroblastos não seriam mais necessárias e seriam eliminadas por apoptose ou morte programada, a qual seria ativada por sinais extrínsecos (via receptores) ou intrínsecos (via mitocondrial). A redução das células epiteliais de revestimento também ocorreria devido à redução de mediadores pró-inflamatórios e fatores de crescimento, desta forma, as células epiteliais diferenciadas sofreriam morte programada, assim como acontece com as células epiteliais de revestimento da mucosa oral. Devido a essas mudanças a reabsorção óssea também seria cessada (HARGREAVES; COHEN, 2011; LIN; HUANG, ROSENBERG, 2007; LIN et al., 2009).

Loyola et al. (2005) analisaram a presença de apoptose no epitélio de CPAs. Foram estudados cistos com epitélios atróficos e hiperplásicos onde foi possível observar uma maior frequência de apoptose em CPAs com epitélio atrófico. Sugerindo assim que a apoptose desempenha uma função de controle das populações celulares dos CPAs.

Este processo de regressão cística apresenta maior aceitação quando se trata de “cistos em bolsa”. Em relação aos “cistos verdadeiros”, um menor potencial de cura após o tratamento endodôntico não cirúrgico é sugerido devido a dinâmica tecidual deste cisto apresentar-se autossustentável, fazendo com que a lesão não dependa da presença ou ausência de infecção intracanal (NAIR, 1998; NAIR, 2004). Assim, se o epitélio cístico do “cisto em bolsa” pode regredir por apoptose após o tratamento endodôntico não cirúrgico, o epitélio do cisto verdadeiro também é capaz de regredir após a mesma terapêutica, pois qualquer doença causada por infecção deve ser capaz de cicatrizar, se os irritantes causadores forem removidos (HARGREAVES, COHEN, 2011; LIN et al., 2009). Contudo “cistos verdadeiros” e “cistos em bolsa” não podem ser considerados lesões distintas, visto que ambos são formados pela proliferação epitelial em lesões apicais em resposta a infecção (RICUCCI et al., 2006).

São fatores causadores da persistência de periapicopatias inflamatórias: persistência de infecção intracanal, infecção extracanal, cristais de colesterol, corpos estranhos como guta percha, selantes endodônticos ou amálgama na região periapical (NAIR, 2006), sendo CPAs “verdadeiros” ou “em bolsa” (LIN et al., 2009). Como os agressores presentes no “cisto verdadeiro” não podem ser eliminados através do tratamento endodôntico não cirúrgico, tal lesão deve ser removida cirurgicamente (NAIR, 2006). Um estudo microscópico de lesões periapicais persistentes observou que granulomas e cistos correspondiam à maioria das lesões e que em 28% das lesões foram encontrados a presença de materiais endodônticos, mostrando a importância de um preparo endodôntico adequado (LOVE; FIRTH, 2009).

2.6 Aspectos imunológicos

Uma grande variedade de antígenos bacterianos pode estimular a resposta imune do hospedeiro, que pode ser inespecífica, que ocorre logo após a exposição a um micro-organismo infeccioso e específica que se desenvolve em sequência sendo mais eficiente na eliminação de infecções (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). A maioria das células envolvidas neste processo são oriundas do sistema de defesa imune, entre elas polimorfonucleares (PMN), linfócitos e macrófagos (JURISIC et al., 2008; NAIR, 2004; SCHULZ et al.,

2009). Em uma fase inicial estas células podem eliminar o agressor através de fagocitose (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010) e da produção de mediadores pró-inflamatórios numa tentativa de barrar a infecção (CAVALLA et al., 2014; RODINI; LARA, 2001). A combinação de antígenos bacterianos e a resposta do hospedeiro originará lesões reativas como abscessos dento alveolares, granulomas e CPAs com a concomitante reabsorção óssea na região apical do dente afetado (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2011; LIAPATAS; NAKOU; RONTOGIANNI, 2003).

Quando o agente agressor alcança a região apical, o organismo tenta eliminá-lo através de respostas imunes inespecíficas, pela ação de fagócitos como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células “natural killer” (NK). A inflamação provoca o recrutamento dos PMNs da circulação sanguínea para o tecido onde realizaram a fagocitose dos micro-organismos. Além das respostas imunes inespecíficas, existe o desenvolvimento de respostas imunológicas específicas capazes de reagir a um grande número de substâncias microbianas e distinguir micro-organismos, proporcionando uma atuação mais eficaz contra micro-organismos que a resposta imune inespecífica não foi capaz de eliminar. Esse tipo de resposta é denominado de resposta imune específica, onde estão presentes células apresentadoras de antígenos e linfócitos os quais vão agir na ativação de células, produção de citocinas e anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012; NAIR, 2004). Deste modo respostas imune inespecíficas e específicas atuam em cooperação para intensificar os mecanismos protetores capazes de combater com maior eficácia micro-organismos patogênicos (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012).

Os linfócitos T “auxiliares” (LTCD4+) são células do sistema imune específico e desempenham papéis centrais na função do sistema imunológico como: auxiliar as células B na produção de anticorpos, regulação da função de macrófagos, organização e regulação das respostas contra uma grande variedade de micro-organismos patogênicos, controlando a auto-imunidade e ajustando a magnitude e persistência de respostas imunes (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). O LTCD4+ pode se diferenciar em outros tipos de células T efetoras após sua ativação inicial pelo antígeno. Deste modo podem produzir dois tipos de respostas imunes: a resposta pelo subtipo 1 de linfócitos T “auxiliares” (Th1) e a resposta pelo subtipo 2 de linfócitos T “auxiliares” (Th2) (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). A resposta Th1 tem sua ativação pela interleucina 12 (IL-12), interferon gama (IFN- γ) e sua resposta mediada através da ação da interleucina 2 (IL-2), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IFN-

γ . A resposta imune Th2 é ativada pela interleucina 4 (IL-4) e tem sua resposta mediada pela ação da IL-4, interleucina 5 (IL-5), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13) (PARSLOW et al., 2004; ZHU; YAMANE; PAUL, 2010).

A presença do subtipo Th1 de resposta imune celular acredita-se estar relacionada com a reabsorção óssea e a progressão de lesões, enquanto a resposta pelo subtipo 2 de linfócitos T “auxiliares” (Th2) estaria relacionada com o processo de cura e na restrição da resposta imune (COLIC et al., 2010; CAVALLA et al., 2014; NAIR, 2004). A IL-12 relaciona-se com a diferenciação de LTCD4+ em células Th1 e age com o IFN- γ inibindo a diferenciação de tais células para o subtipo Th2. O TNF- α ativa leucócitos e linfócitos T (LT) e linfócitos B (LB) e contribui na ativação de macrófagos, assim como o IFN- γ (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2011).

Colic et al. (2006) observaram o predomínio da resposta imune Th1 em lesões apicais baseados na produção *ex vivo* de IFN- γ e IL-4 por monócitos. Outro estudo utilizando da citometria de fluxo para a análise das respostas imunes mostrou uma produção maior de IL-4 em CPAs quando comparadas com os granulomas apicais, demonstrando assim o predomínio da resposta Th2 nestas lesões císticas (HREN; IHAN, 2009).

Outra célula importante no combate às infecções bacterianas é o macrófago, que age na defesa, além de se relacionar com o desenvolvimento, manutenção e resolução da resposta inflamatória (BRACKS et al., 2014; DEY; ALLEN; HANKEY-GIBLIN, 2015; VARIN; GORDON, 2009). Os macrófagos assumem o papel de fagócitos, matando e fagocitando bactérias, produzindo mediadores pró-inflamatórios como IL-1 (interleucina 1), IL-6 (interleucina 6) e TNF- α e ativando as respostas imunes inespecífica e específica, nas quais tem como função a apresentação de antígenos para LTCD4+, contribuindo para resposta imune específica (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012; METZGER, 2000; RODINI; LARA, 2001). Os macrófagos são encontrados em maiores quantidades em áreas de inflamação crônica (METZGER, 2000; RODINI; LARA, 2001) e podem ser classificados como macrófagos com ativação “clássica” (M1) e macrófagos com ativação “alternativa” (M2).

Os macrófagos são atraídos para o local da infecção pelas endotoxinas e DNA bacteriano, sendo ativados para o fenótipo M1 por estes e por mediadores produzidos na resposta Th1 como o IFN- γ (MANTOVANI et al., 2004; CAVALLA et al., 2014; METZGER, 2000). Os macrófagos M1 ativados têm seu potencial microbicida

aumentado e produzirão mediadores pró-inflamatórios como as IL-1, IL-6 e o TNF- α (DEY; ALLEN; HANKEY-GIBLIN, 2015; RODINI; LARA, 2001), contudo aumenta-se concomitantemente o risco de danos teciduais (IVASHKIV, 2013; MURRAY; WYNN, 2011). Este tipo de ativação de macrófagos é conhecido como “clássica” (MANTOVANI et al., 2004; NAIR, 2004).

A ativação dos macrófagos também pode ocorrer por um modo “alternativo”. A ativação para o subtipo M2 se deve à ação de citocinas da resposta Th2 como a IL-4 e a interleucina 13 (IL-13) (IVASHKIV, 2013; MANTOVANI et al., 2004). Estes macrófagos M2 agirão restringindo e resolvendo a inflamação após infecções, eliminando detritos, inibindo a produção de mediadores pró-inflamatórios, promovendo angiogênese e reparo tecidual (DEY; ALLEN; HANKEY-GIBLIN, 2015; IVASHKIV, 2013; JETTEN et al. 2014; MANTOVANI et al., 2004). Entre suas funções destacam-se a estimulação da produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, produção de fatores de crescimento, os quais vão estimular células epiteliais e fibroblastos, aumento da expressão de inibidores de enzimas de degradação extracelular e estimulação da síntese de colágeno pelos fibroblastos (MURRAY; WYNN, 2011; VARIN; GORDON, 2009). Assim o reconhecimento da polarização de macrófagos em M1 e M2 tem um papel importante na inflamação crônica, tendo influência no seu curso (CARLI et al., 2016). A regularização desta polarização poderia ser usada em abordagens terapêuticas destas inflamações (DEY; ALLEN; HANKEY-GIBLIN, 2015; METZGER, 2000).

Macrófagos expressam variados receptores, entre os quais encontram-se o receptor CD163. O CD163 é uma glicoproteína transmembrana pertencente à família de receptores de captura ricos em cisteína. Sua expressão ocorre exclusivamente em monócitos e macrófagos, sendo que as citocinas IL-6 e IL-10 são capazes de induzir sua expressão, enquanto que sua inibição pode ser induzida pelo IFN- γ e TNF- α (FABRIEK; DIJKSTRA; VAN DEN BERG, 2005; MØLLER, 2012). Elevados níveis de CD163 são expressados por macrófagos teciduais e em sua maioria em macrófagos M2, o que pode apresentar importante relação com o processo de cura, estimulação da angiogênese e remoção de resíduos (FABRIEK; DIJKSTRA; VAN DEN BERG, 2005; MOESTRUP; MØLLER, 2004; MØLLER, 2012). Esse receptor está presente em monócitos e em macrófagos localizados no baço, linfonodos, timo, rins, fígado, cérebro (FABRIEK; DIJKSTRA; VAN DEN BERG, 2005). Níveis elevados de CD163

também são observados em processos patológicos como: bacteremias e doenças hepáticas sendo esses níveis relacionados com prognósticos desfavoráveis (MØLLER, 2012).

As citocinas podem ser classificadas como um grupo diversificado de glicoproteínas e peptídeos de sinalização intracelular e que podem alterar o comportamento ou as propriedades da própria célula ou de outras células (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; PARSLOW et al., 2004). Dentre as diversas citocinas serão escolhidas como objeto de estudo nesta revisão de literatura as citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α .

As citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α desempenham um importante papel no curso da defesa em infecções, sendo a IL-1 uma das principais citocinas relacionadas com a inflamação periapical. Dentre as células capazes de produzi-la, destacam-se osteoclastos, células epiteliais, macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012). A IL-1 tem como ações a indução do aumento da adesão de leucócitos às paredes endoteliais, a produção de enzimas proteolíticas por osteoclastos, aumentando a reabsorção óssea e a colagenase, a estimulação de linfócitos T e B a produzir receptores de IL-2 e IFN- γ e expressão de imunoglobulinas respectivamente. Com relação a macrófagos e monócitos a IL-1 tem função na atração e ativação dessas células para o estado citotóxico (PARSLOW et al., 2004). A IL-1 é encontrada em duas isoformas distintas: IL-1 α (interleucina 1 alfa), IL-1 β (interleucina 1 beta), sendo a IL-1 β a forma predominantemente encontrada nas lesões periapicais inflamatórias (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2011).

A IL-6 tem como fonte os macrófagos, sendo produzida também por LB, PMNs, células endoteliais, fibroblastos e LT da resposta Th2. Age aumentando a ação citotóxica de neutrófilos, estimula a diferenciação de LB e aumenta a reabsorção óssea. É importante na resposta imune sendo considerada ao mesmo tempo uma citocina pró e anti-inflamatória (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012; AZUMA, et al., 2014; BRACKS et al., 2014; GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2011).

O TNF- α é encontrado em focos inflamatórios, sendo macrófagos e os linfócitos Th1 células capazes de produzi-lo (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). Entre as funções do TNF- α está a ativação de macrófagos, LT e LB (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2011; PRSO et al., 2007), assim como o aumento da colagenase e reabsorção óssea pelos osteoclastos

e a indução a produção de prostaglandinas, IL-1 e IL-6 em monócitos e macrófagos (PARSLOW et al., 2004).

O crescimento cístico anteriormente explicado pela teoria da pressão osmótica (NAIR, 1997), mostra-se atualmente mais complexo, sendo necessário a consideração de aspectos celulares e moleculares, assim como dos processos bioquímicos envolvidos na reabsorção óssea (BERNARDI et al. 2015; HARGREAVES; COHEN, 2011; MEGHJI et al.,1996).

Bando et al. (1993) verificaram, por meio de análises imuno-histoquímicas de amostras de CPAs, que houve forte marcação positiva para IL-1 β e IL-6 no epitélio de revestimento cístico. Vasos sanguíneos próximos ao epitélio foram marcados para IL-1 β , enquanto a marcação para IL-6 foi distribuída em células endoteliais por todo o cisto. Apenas 16% dos CPAs avaliados mostraram marcação positiva para TNF- α , sendo estas restritas aos macrófagos. Esses achados, segundo os autores, proporcionam mecanismo para o crescimento contínuo e atividade osteoclástica da lesão. A inibição da síntese ou atividade das citocinas poderia, portanto, ser de benefício terapêutico e evitar a necessidade de cirurgia.

Lin et al. (1996) observaram a expressão de receptores de fator de crescimento epitelial em CPAs, demonstrando que a expressão de tais receptores apresentava correlação positiva com a intensidade do infiltrado inflamatório, sugerindo que tais citocinas possuíam papel na estimulação da proliferação epitelial (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007; MEGHJI et al.,1996) e na atividade de remodelação óssea no CPA, visto que IL-1, IL-6 e TNF- α são potentes moduladores do remodelamento ósseo. Deste modo, o remodelamento ósseo se faz presente pela destruição óssea local para que ocorra o crescimento dos CPAs (BERNARDI et al., 2015; GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2011; JAKOVLJEVIC et al., 2015).

Prso et al. (2007) avaliaram a presença de TNF- α e IL-6 em lesões periapicais com sintomatologia dolorosa leve ou ausente, lesões com sintomatologia moderada a intensa e com grupo controle constituído de tecido apical não inflamado. Concluíram que os níveis de TNF- α e IL-6 foram maiores em lesões com sintomatologia moderada a intensa, assim estas lesões representariam o estado ativo das lesões periapicais.

Outro estudo comparou a presença IL-1 β , TNF- α e IL-6 em granulomas apicais e CPAs baseando-se na sintomatologia dolorosa relacionada a tais lesões. Observaram que níveis elevados de IL-1 β e IL-6 foram encontrados em lesões apicais sintomáticas e que CPAs apresentavam níveis maiores de IL-1 β , TNF- α e IL-6 quando

comparados com os granulomas apicais. Assim, lesões sintomáticas representariam um estágio imunológico ativo da doença e que a relação positiva dessas citocinas poderia ocasionar reabsorções extensas na região óssea apical (JAKOVLJEVIC et al., 2015).

A expressão de citocinas relacionadas com a resposta Th1 também foi observada em lesões apicais persistentes após o tratamento endodôntico. Através de reação em cadeia da polimerase, foram observados níveis elevados de TNF- α e IFN- γ quando comparados com o grupo controle constituído de dentes vitais tratados endodonticamente por indicação protética, sugerindo que estas citocinas estabelecem um perfil pró-inflamatório para tais lesões e que podem estar envolvidas na manutenção da resposta imune (HENRIQUES et al., 2011).

Os níveis de IL-6 foram mais altos em cultura de fibroblastos de CPAs quando comparados ao tecido de mucosa gengival saudável, assim fibroblastos presentes na cápsula de CPAs poderiam conduzir uma maior síntese de IL-6 ao longo do tempo em inflamações crônicas e também desempenhar um papel importante no processo de expansão cística (KUSUMI et al., 2004).

O líquido cístico de CPAs e de cistos residuais também foram estudados por meio de análises genéticas e observaram que os CPA possuíam concentrações mais altas de IL-1 α e TNF- α que os cistos residuais e que as concentrações entre os dois cistos apresentam uma correlação positiva. Assim a presença das citocinas no fluido cístico pode ser explicada pela inflamação local e processos imunológicos que ocorrem na cápsula fibrosa dos cistos. Deste modo inflamações mais intensas e a consequente maior concentração destas citocinas nos CPAs proporcionaria a estas lesões um maior potencial de crescimento (MUGLALI et al., 2008).

Os cistos periodontais apicais são lesões frequentemente encontradas na prática clínica odontológica e não há estudos na literatura, até o momento, identificando a presença de macrófagos M2 em cistos periodontais apicais e sua correlação com a resposta imune celular Th2. Deste modo, justifica-se o presente trabalho que analisará a resposta imune celular Th1 através da expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α e a resposta imune celular Th2 através da presença de macrófagos M2. O entendimento sobre os mecanismos de defesa envolvidos na patogenia do CPA pode contribuir para a escolha de uma melhor forma de tratamento e ainda abrir novos caminhos para o descobrimento de novas terapêuticas.

3 PROPOSIÇÃO

Constitui-se proposição do presente estudo analisar as respostas imunes Th1 e Th2 nos cistos periodontais apicais diagnosticados no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Unifal-MG no período de 2000 a 2010, com base, respectivamente, na expressão imuno-histoquímica das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α e dos macrófagos M2 pela expressão de CD163, com relação ao seu papel na patogenia destes cistos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Capítulo referente a metodologia do trabalho.

4.1 Questões éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) (parecer nº 1.291.161) (ANEXO A).

4.2 Casuística e seleção da amostra

As amostras deste estudo foram obtidas dos Arquivos do Laboratório de Anatomopatologia Bucal da UNIFAL-MG e incluíram os casos com diagnóstico definitivo de cisto periodontal apical originados da Clínica de Estomatologia da UNIFAL-MG no período de 2000 a 2010 e que preencheram os seguintes critérios de diagnóstico: lesão cística localizada na região apical de dentes desvitalizados e contendo cavidade revestida por epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado, com cápsula constituída de tecido conjuntivo fibroso denso com presença de infiltrado inflamatório mononuclear. Os dados clínicos dos pacientes e das lesões foram obtidos das fichas de pedido de exame anatomopatológico que foram enviadas juntamente com o material biopsiado ao laboratório.

Foram usados como critérios de inclusão: amostras de lesões com histórico de tratamento endodôntico prévio obtidas por biopsia excisional, removidas pelo mesmo cirurgião-dentista e que possuíam material suficiente para diagnóstico e análise microscópica. Os casos excluídos do estudo foram os obtidos por biopsias incisionais e/ou com material insuficiente ou inadequado para as análises propostas; ou que foram removidos por outro cirurgião. Foram selecionados por meio desses critérios 24 casos de CPA.

4.3 Análise microscópica

A análise microscópica foi realizada separadamente por dois examinadores (o pesquisador responsável pelo trabalho e o professor patologista responsável pelo laboratório), sem o conhecimento prévio dos dados clínicos dos pacientes, utilizando-se um microscópio óptico binocular (AxioLab A1 Plus- Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Para a captura dos campos foi utilizado o software AxioVision Rel 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) (FIGURA 1).

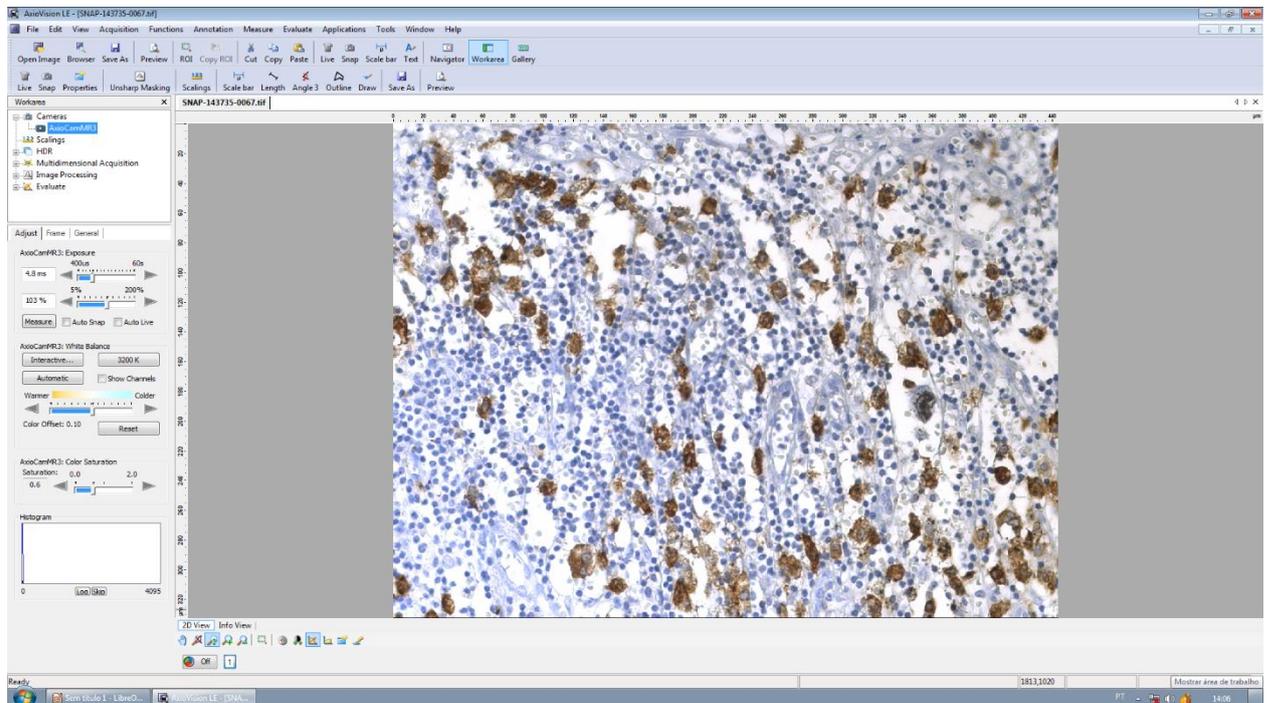


Figura 1 - Ilustração da captura dos campos utilizando o software AxioVision Rel 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Fonte: Do autor.

4.4 Coloração em hematoxilina e eosina

Foram confeccionados cortes microscópicos de 5 micrômetros (μm) de espessura obtidos a partir das amostras biopsiadas e incluídas em blocos de parafina e arquivadas no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da UNIFAL-MG. Estes cortes foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina (HE), seguindo-se os procedimentos histotécnicos de rotina do referido laboratório, e montados em lâminas de vidro.

4.5 Reação imuno-histoquímica

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas manualmente conforme descrito por Norton, Jordan e Yeomans (1994), seguindo o protocolo do laboratório de patologia do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - SP).

Foram utilizados para as reações imuno-histoquímicas cortes microscópicos de 3 μm de espessura montados em lâminas de vidro silanizadas. Após a desparafinização e a reidratação, as amostras foram submetidas à reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, as lâminas foram imersas em tampão citrato 0,01 M, pH 6,0 durante 35 minutos, em banho-maria ajustado para 95–98°C e, logo após, mantidas durante 20 minutos à temperatura ambiente, fora do banho-maria, e lavadas em água destilada. Em seguida, o bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar reações inespecíficas. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% e metanol absoluto (v/v) durante 20 minutos, com posterior lavagem em água destilada e tampão fosfato-salino (PBS). A imunodeteção das proteínas de interesse foi realizada utilizando os anticorpos anti-humanos para CD163, IL1- β , IL6 e TNF- α (TABELA 1). A solução contendo cada anticorpo foi adicionada sobre os cortes teciduais, individualmente, e as lâminas foram mantidas em câmara úmida durante 12 a 16 horas, a uma temperatura de 2–8°C. A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS e os cortes histológicos, incubados com o anticorpo secundário

biotinilado anti-IgG (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), seguindo a especificidade adequada aos anticorpos primários, em câmara úmida durante 50 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBS e a detecção foi realizada utilizando o sistema da streptavidina-biotina-peroxidase (Dako Cytomation). Após 30 minutos de incubação em câmara úmida dos cortes com a solução de streptavidina-biotina-peroxidase à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com PBS e a detecção foi completada utilizando-se uma solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahydrocloro) e 0,3% de peróxido de hidrogênio. Posteriormente foi realizada contra-coloração dos cortes histológicos em solução de hematoxilina de Harris, desidratação das mesmas através de imersões em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em meio de montagem permanente. Como controle positivo utilizou-se amostras de tecidos de tonsila e para o controle negativo realizou-se a incubação das amostras de CPA somente com a solução diluente (abolição do anticorpo primário).

Tabela 1 – Anticorpos utilizados.

| Anticorpo | Clone | Diluição | Fornecedor |
|------------------|--------------|-----------------|---|
| IL-1 β | Policlonal | 1:400 | Abcam cat#ab2105, Cambridge, MA, USA |
| IL-6 | Monoclonal | 1:800 | Abcam cat#ab9324, Cambridge, MA, USA |
| TNF- α | Policlonal | 1:3000 | Abcam cat#ab66579, Cambridge, MA, USA |
| CD163 | 10D6 | 1:500 | Vector Labs cat#VP-C374, Burlingame, CA, USA |

Fonte: Do autor.

4.6 Análise microscópica: lâminas coradas em hematoxilina e eosina

As lâminas coradas em HE quanto ao infiltrado inflamatório foram analisadas segundo Tsai et al. (2004) em microscópico de luz com objetiva de 20X. Para esta classificação foi utilizada a seguinte escala:

- 1 - menos de 1/3 do campo composto por células inflamatórias;
- 2 - entre 1/3 e 2/3 do campo composto por células inflamatórias e;
- 3 - acima de 2/3 do campo composto por células inflamatórias.

O valor para cada espécime foi estabelecido pela soma obtida do infiltrado inflamatório de 5 campos consecutivos de áreas com cápsula cística preservada. Considerou-se como inflamação discreta, valores entre 1 a 5; inflamação moderada entre 6 a 10 e inflamação intensa entre 11 a 15. Para a captura dos campos foi utilizado o software AxioVision Rel 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Todas as lâminas foram analisadas por dois observadores independentes, citados anteriormente. Os casos discordantes foram revistos em conjunto e os resultados obtidos por consenso.

4.7 Análise microscópica: lâminas submetidas à reação imuno-histoquímica

As lâminas submetidas à reação imuno-histoquímica foram analisadas segundo Bracks et al. (2014) para a contagem de macrófagos marcados com o anticorpo antiCD163. Para isso foi realizada a seleção de 10 campos aleatórios em cada região, capturados com aumento de 400X, em áreas com cápsula cística preservada, utilizando o software AxioVision Rel 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). A cápsula foi dividida em região superficial e profunda. A contagem dos macrófagos foi classificada, por campo, em:

- 0 - ausência de macrófagos;
- 1 - leve, de 1 a 5 macrófagos,
- 2 - moderada, de 6 a 10 macrófagos e;
- 3 - intenso, mais de 10 macrófagos.

Para cada caso incluído no estudo foi obtida a soma dos campos na região superficial e na região profunda. Os casos discordantes foram revistos em conjunto e os resultados obtidos por consenso.

As lâminas submetidas à reação imuno-histoquímica com os anticorpos anti-IL-1 β , anti-IL-6 e anti-TNF- α para a análise das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α respectivamente, foram analisadas segundo Sá et al. (2016). Para isto foi realizada a seleção de 10 campos aleatórios da cápsula cística, a qual foi dividida em regiões superficial e profunda, capturados com aumento de 400X, em áreas que apresentavam a cápsula cística preservada, utilizando o software AxioVision Rel 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Para esta classificação foi utilizada a seguinte escala:

0 ou nenhuma marcação - <10% de células marcadas;

1 ou fraco - 11% a 25%;

2 ou moderado - 26% a 75% e;

3 ou forte - >76%.

Para cada caso incluído no estudo foi obtida a soma dos campos na região superficial e na região profunda. Todas as lâminas foram analisadas por dois observadores independentes, citados anteriormente. Os casos discordantes revistos em conjunto e os resultados obtidos por consenso.

4.8 Análise estatística

Os registros das informações microscópicas das lesões foram armazenados em um banco de dados, elaborado em planilha eletrônica do Microsoft Excel. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico para microcomputador SPSS *for Windows*, versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

As estatísticas descritivas foram obtidas para as variáveis de interesse. As variáveis foram testadas com Teste de Wilcoxon Emparelhado para as comparações intragrupos, e o coeficiente de correlação de Spearman para as correlações entre os grupos a 5% de significância ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

A análise dos aspectos microscópicos nas lâminas coradas pela HE revelou que a inflamação presente na cápsula cística foi classificada como discreta em 3 casos (12,5%), moderada em 9 casos (37,5%) e intensa em 12 casos (50%).

As expressões imuno-histoquímicas dos marcadores TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CD163 estão descritas na Tabela 2. Em relação ao TNF- α os valores médios na região superficial foi de 10,3 e 3,9 na região profunda. Observou-se uma variação de 0 a 24 na região superficial e de 0 a 14 na região profunda, sendo estes valores estatisticamente significativos. Valores semelhantes foram encontrados em relação a IL-1 β , onde houve uma variação de 0 a 25 na região superficial e de 0 a 17 na região profunda, com valores médios de marcação de 12,7 e de 6,1, respectivamente nas regiões superficial e profunda, sendo estes valores estatisticamente significativos. Dentre as citocinas, a IL-6 foi a que apresentou um valor médio de marcação mais elevado, cujo os valores foram de 15 na região superficial e 8,2 na região profunda e estes valores foram estatisticamente significativos.

Com relação a contagem de macrófagos os valores médios de marcação do CD163 para região superficial foi de 25,2, com uma variação de 6 a 30, e de 18 na região profunda, com uma variação de 5 a 28, valores estes estatisticamente significativos.

Tabela 2 - Distribuição das marcações dos anticorpos TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CD163 nas diferentes regiões.

| Variável | Categoria / Medidas | Regiões | | p |
|--------------------------------|---------------------|-------------|----------|------------------|
| | | Superficial | Profunda | |
| TNF-α | n | 24 | 24 | <0,001 |
| | Variação (mín-máx) | 0 – 24 | 0 – 14 | |
| | Mediana | 8,5 | 2,5 | |
| | Média | 10,3 | 3,9 | |
| | Desvio Padrão | 7,8 | 4,1 | |
| IL-1β | n | 24 | 24 | <0,001 |
| | Variação (mín-máx) | 0 – 25 | 0 – 17 | |
| | Mediana | 12,5 | 4,5 | |
| | Média | 12,7 | 6,1 | |
| | Desvio Padrão | 7,2 | 5,8 | |
| IL-6 | n | 24 | 24 | <0,001 |
| | Variação (mín-máx) | 0 – 26 | 0 – 16 | |
| | Mediana | 15 | 10 | |
| | Média | 15 | 8,2 | |
| | Desvio Padrão | 7,1 | 5,9 | |
| CD163 | n | 24 | 24 | <0,001 |
| | Variação (mín-máx) | 6 – 30 | 5 – 28 | |
| | Mediana | 29,5 | 18,5 | |
| | Média | 25,2 | 18 | |
| | Desvio Padrão | 6,7 | 6,4 | |

Fonte: Do autor.

Analisando-se a expressão do marcador TNF- α nas regiões superficiais e profundas das cápsulas císticas, verificou-se que na região superficial a maioria dos casos apresentava escores abaixo de 10 e, nas profundas, os valores dos escores foram menores que 5. Quando se correlacionou a expressão do marcador TNF- α na região superficial com a intensidade da inflamação, obteve-se uma tendência de correlação entre as variáveis ($r = 0,397$ e $p = 0,054$) (GRÁFICO 1). Na região profunda, houve uma correlação positiva entre as variáveis ($r = 0,656$) estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (GRÁFICO 2). As Figuras 2 e 3 ilustram os padrões de marcação do TNF- α nas diferentes regiões.

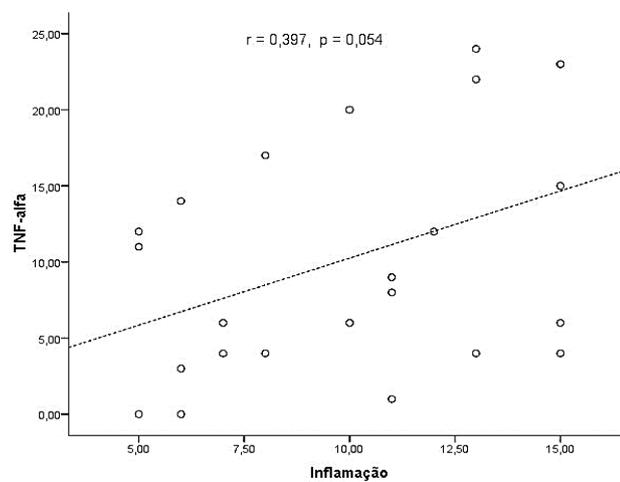


Gráfico 1 - Comparação entre a expressão do marcador TNF- α e a intensidade da inflamação na região superficial.

Fonte: Do autor.

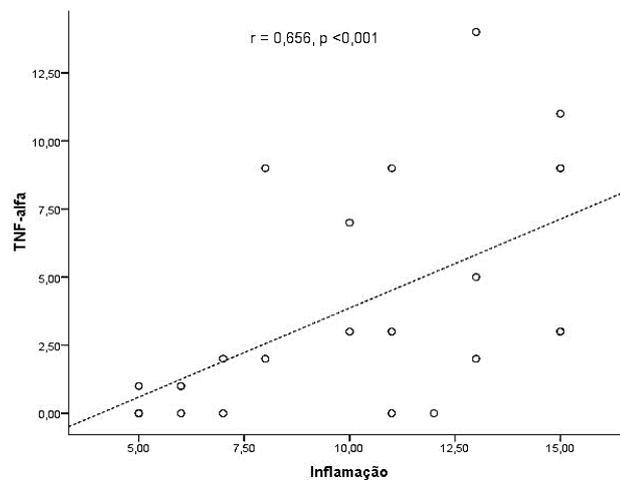


Gráfico 2 - Comparação entre a expressão do marcador TNF- α e a intensidade da inflamação na região profunda.

Fonte: Do autor.

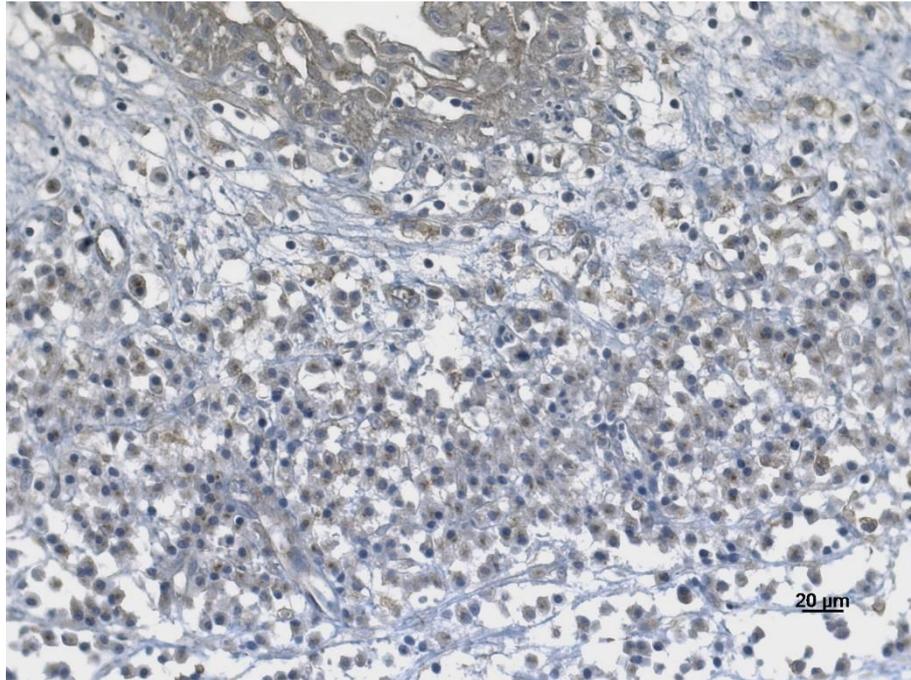


Figura 2 - Expressão imuno-histoquímica do anticorpo TNF- α na região superficial da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – anti-TNF- α 400x).
Fonte: Do autor.

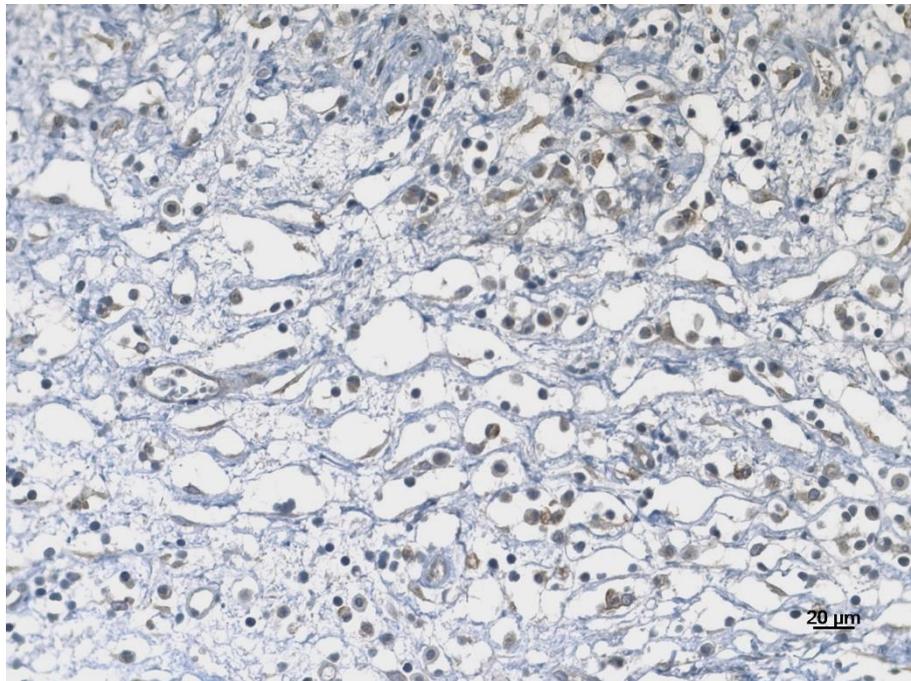


Figura 3 - Expressão imuno-histoquímica do anticorpo TNF- α na região profunda da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – anti-TNF- α 400x).
Fonte: Do autor.

Quando se comparou a expressão do marcador IL-1 β nas cápsulas dos CPAs, a maioria dos casos apresentou escores acima de 10 na região superficial enquanto que, na região profunda, houve um predomínio de casos com escores menores que 10. Correlacionando-se a intensidade de marcação deste anticorpo com a inflamação, em ambas as regiões encontrou-se uma correlação positiva, estatisticamente significativa, entre as variáveis. Os valores foram de $r = 0,708$ ($p < 0,001$) na região superficial (GRÁFICO 3) e de $r = 0,698$ ($p < 0,001$) na profunda (GRÁFICO 4). Nas Figuras 4 e 5 estão ilustrados os diferentes padrões de marcação da IL-1 β .

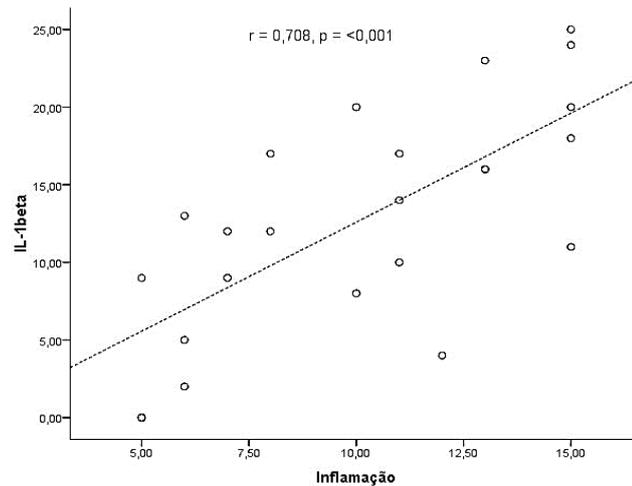


Gráfico 3 - Comparação entre a expressão do marcador IL-1 β e a intensidade da inflamação na região superficial.

Fonte: Do autor.

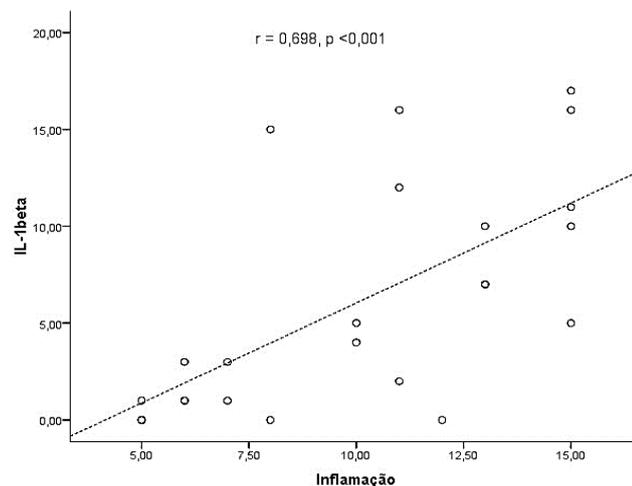


Gráfico 4 - Comparação entre a expressão do marcador IL-1 β e a intensidade da inflamação na região profunda.

Fonte: Do autor.

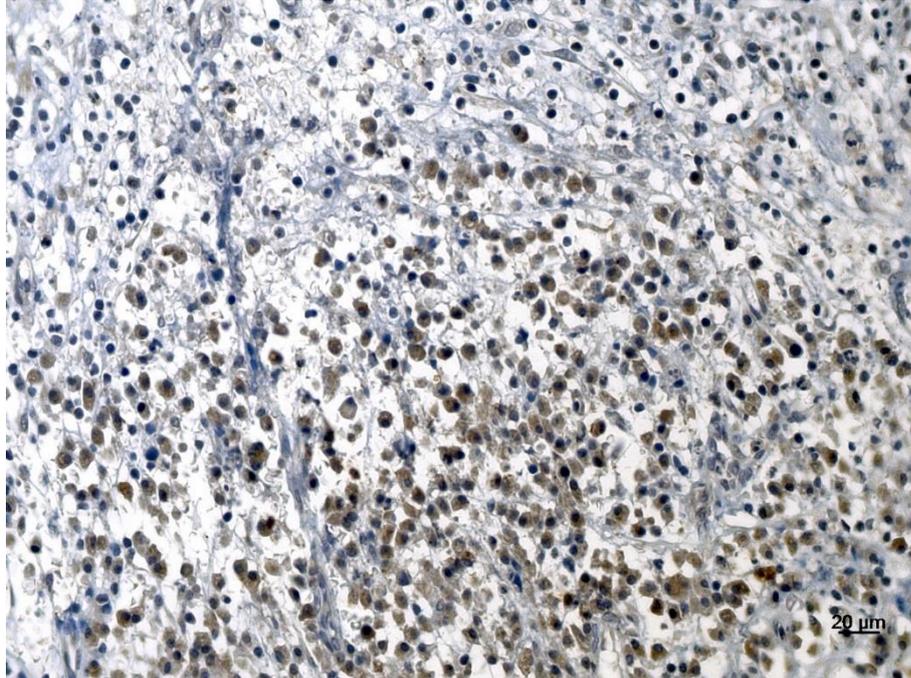


Figura 4 - Expressão imuno-histoquímica do anticorpo IL-1 β na região superficial da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – anti-IL-1 β 400x).
Fonte: Do autor.

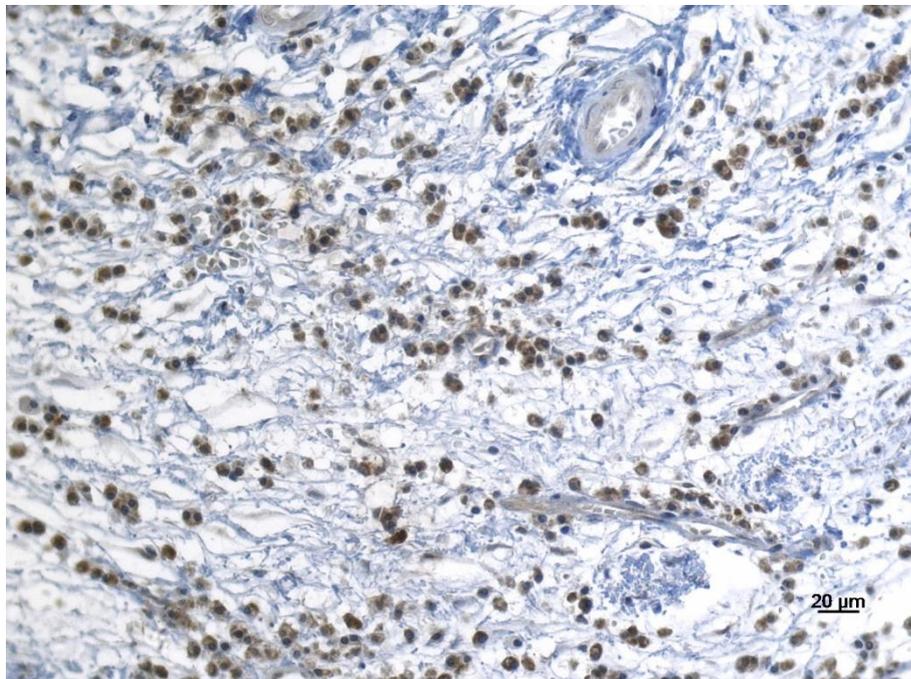


Figura 5 - Expressão imuno-histoquímica do anticorpo IL-1 β na região profunda da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – anti-IL-1 β 400x).
Fonte: Do autor.

Nos Gráficos 5 e 6 e nas Figuras 6 e 7 estão expressos os padrões de marcação da IL-6 nas cápsulas císticas. Na região superficial, houve um predomínio de casos que possuíam escores acima de 10. Por outro lado, na região profunda, na maioria dos casos os escores não ultrapassavam 15. Quando se correlacionou a intensidade de marcação do anticorpo com a inflamação, tanto na região superficial quanto na profunda houve correlação positiva estatisticamente significativa entre as variáveis ($r = 0,582$ e $p = 0,002$, na região superficial; e $r = 0,483$ e $p = 0,016$, na profunda).

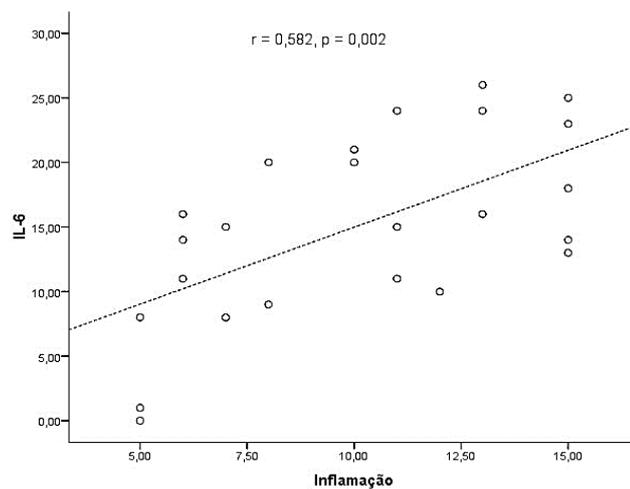


Gráfico 5 - Comparação entre a expressão do marcador IL-6 e a intensidade da inflamação na região superficial.

Fonte: Do autor.

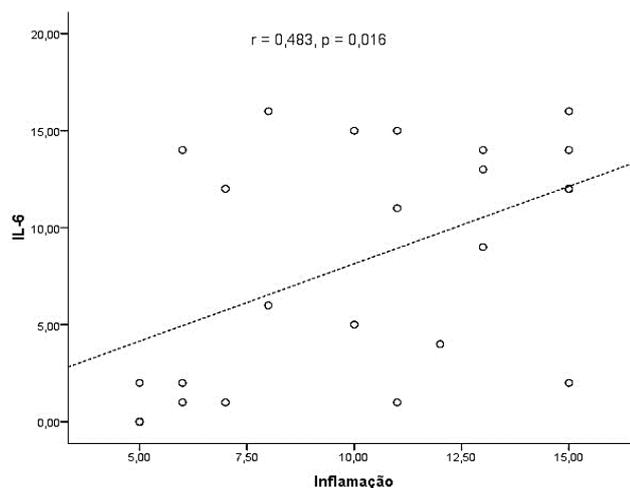


Gráfico 6 - Comparação entre a expressão do marcador IL-6 e a intensidade da inflamação na região profunda.

Fonte: Do autor.

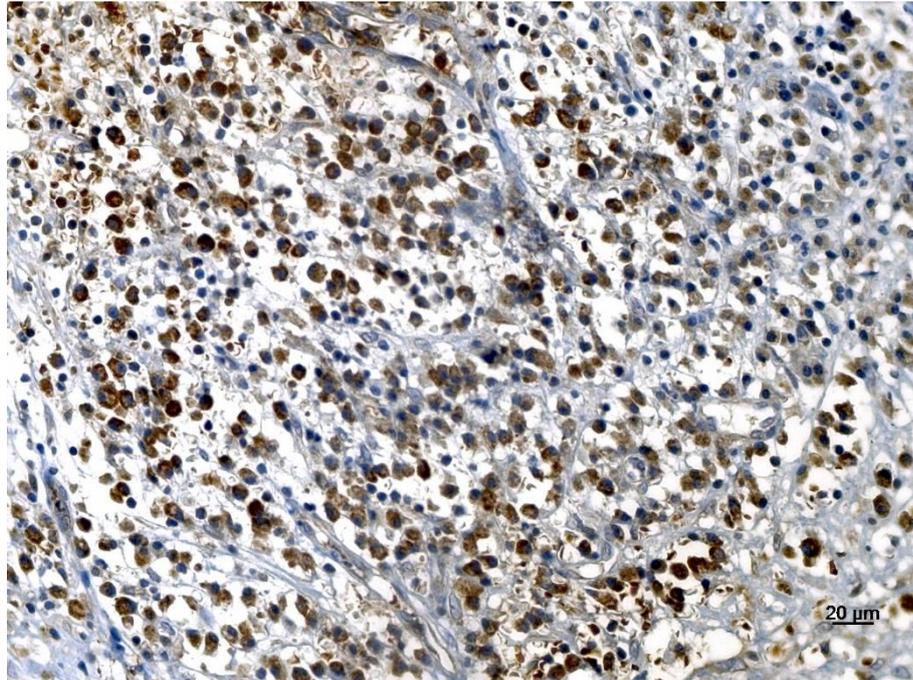


Figura 6 - Expressão imuno-histoquímica do anticorpo IL-6 na região superficial da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – anti-IL-6 400x).
Fonte: Do autor.

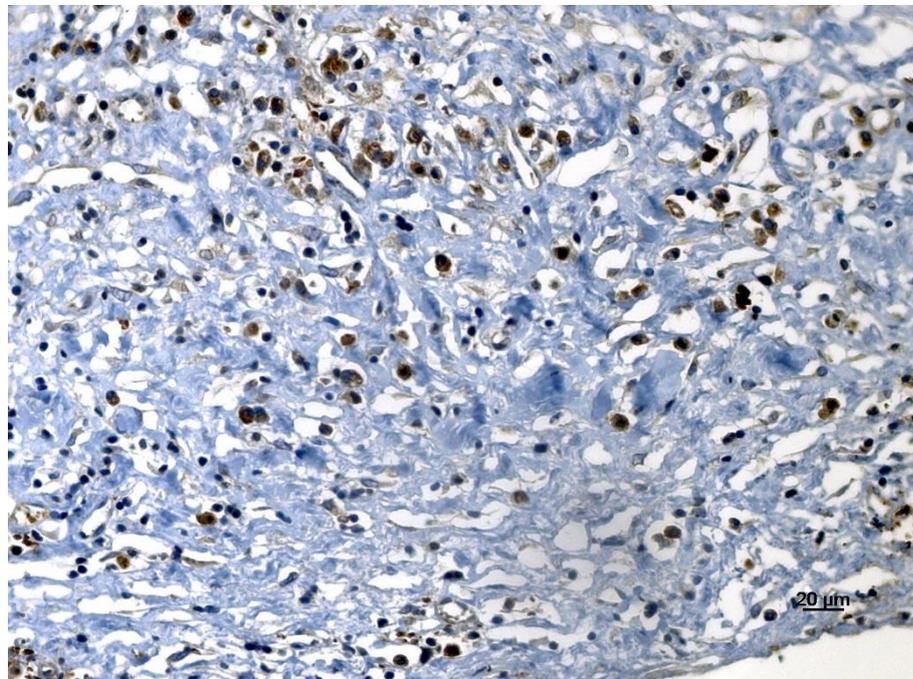


Figura 7 - Expressão imuno-histoquímica do anticorpo IL-6 na região profunda da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – anti-IL-6 400x).
Fonte: Do autor.

Em relação à marcação do CD163, não houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão deste anticorpo e a inflamação presentes nas regiões superficial e profunda das cápsulas dos CPAs estudados. Os valores de r foram de 0,362 ($p = 0,082$), na região superficial (GRÁFICO 7), e de 0,174 ($p = 0,415$) na profunda (GRÁFICO 8). Ressalta-se que o CD163 apresentou uma marcação caracterizada por escores elevados, em ambas as regiões, independente da intensidade da inflamação presente. As marcações nas diferentes regiões estão ilustradas nas Figuras 8 e 9.

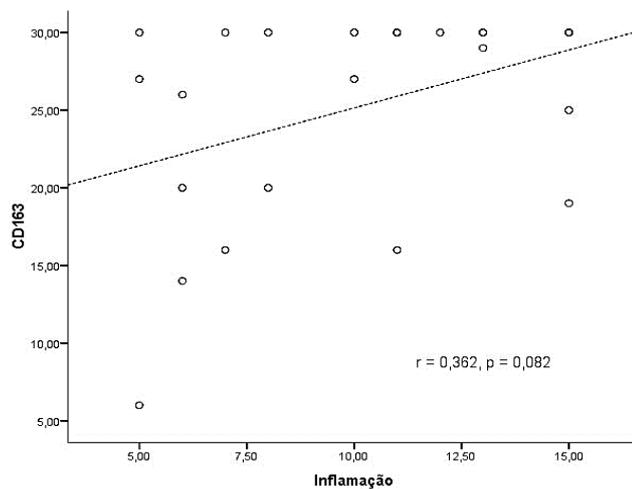


Gráfico 7 - Comparação entre a expressão do marcador CD163 e a intensidade da inflamação na região superficial.

Fonte: Do autor.

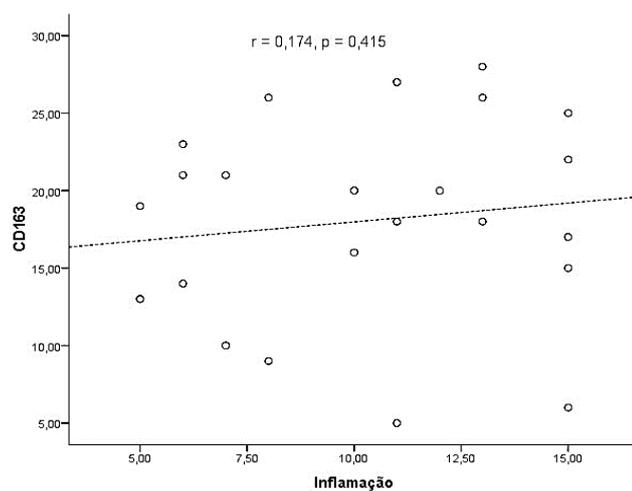


Gráfico 8 - Comparação entre a expressão do marcador CD163 e a intensidade da inflamação na região profunda.

Fonte: Do autor.

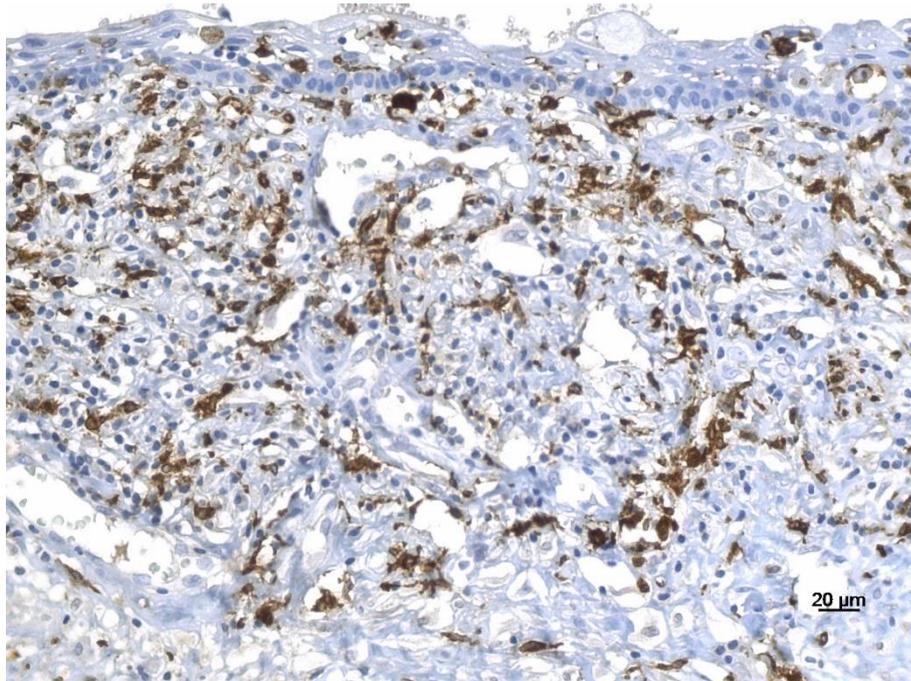


Figura 8 - Expressão imuno-histoquímica do anticorpo CD163 na região superficial da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – antiCD163 400x).

Fonte: Do autor.

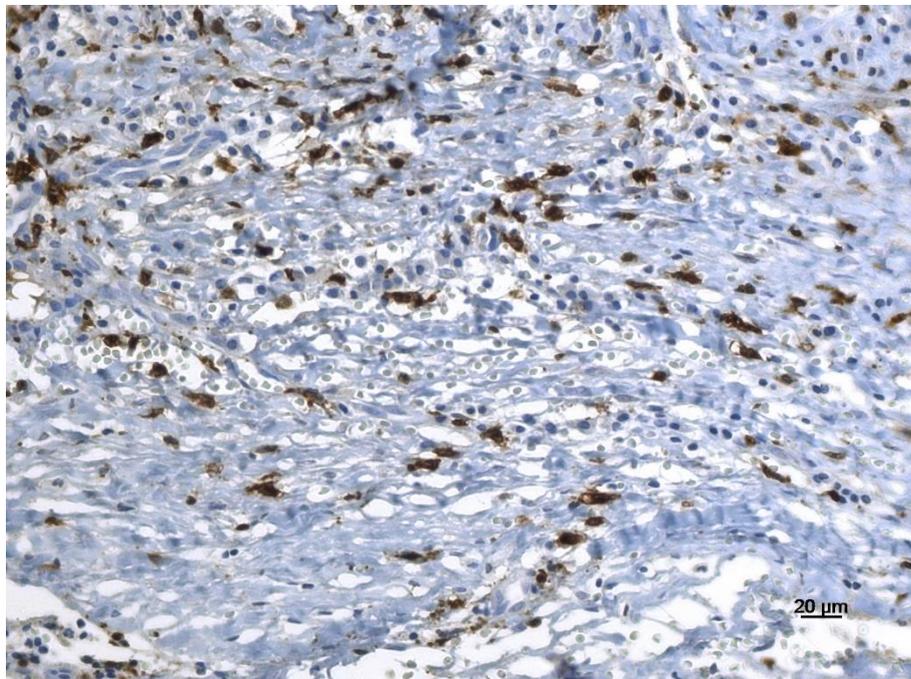


Figura 9 - Expressão imuno-histoquímica do anticorpo CD163 na região profunda da cápsula do cisto periodontal apical (Imuno-histoquímica – anti-CD163 400x).

Fonte: Do autor.

Quando se comparou a expressão do marcador IL-1 β com o marcador CD163 nas regiões superficial e profunda, não houve correlação estatisticamente significativa entre estas variáveis, conforme descrito nos Gráficos 9 e 10. Na região superficial o valor de r foi de 0,248 (p = 0,242) e, na profunda, de 0,311 (p = 0,140). Há que se destacar que na região superficial, um grande número de casos apresentou uma marcação com escores bastante elevados de CD163, independente da intensidade de marcação da IL-1 β .

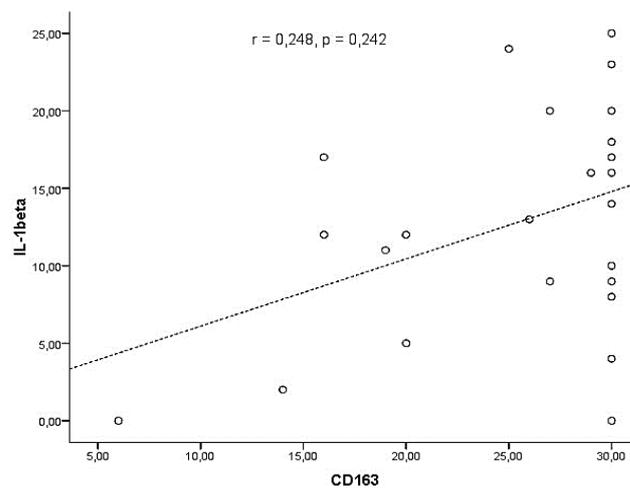


Gráfico 9 - Comparação entre a expressão dos marcadores IL-1 β e CD163 na região superficial.

Fonte: Do autor.

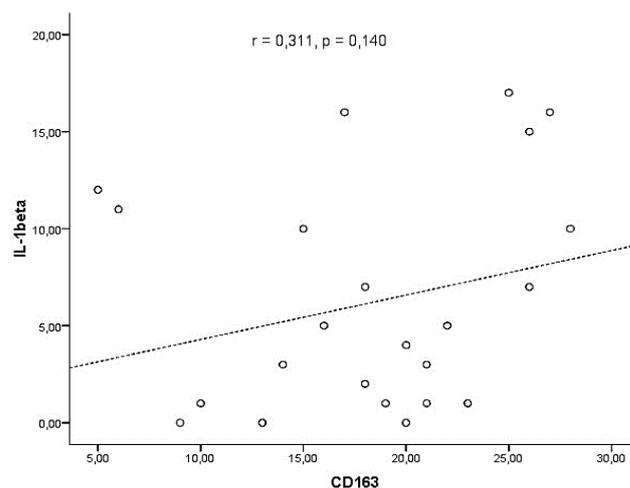


Gráfico 10 - Comparação entre a expressão dos marcadores IL-1 β e CD163 na região profunda.

Fonte: Do autor.

Em relação às marcações dos anticorpos IL-6 e CD163, uma correlação positiva estatisticamente significativa foi observada na região superficial ($r = 0,478$ e $p = 0,018$) (GRÁFICO 11). Na região profunda não houve correlação entre as marcações dos anticorpos ($r = 0,362$ e $p = 0,082$) (GRÁFICO 12).

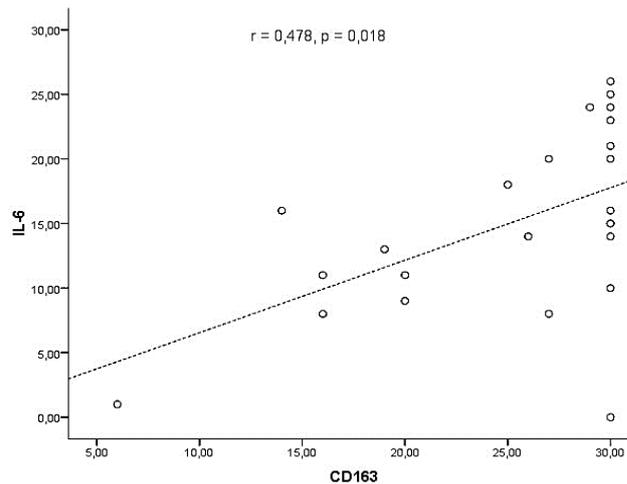


Gráfico 11 - Comparação entre a expressão dos marcadores IL-6 e CD163 na região superficial.

Fonte: Do autor.

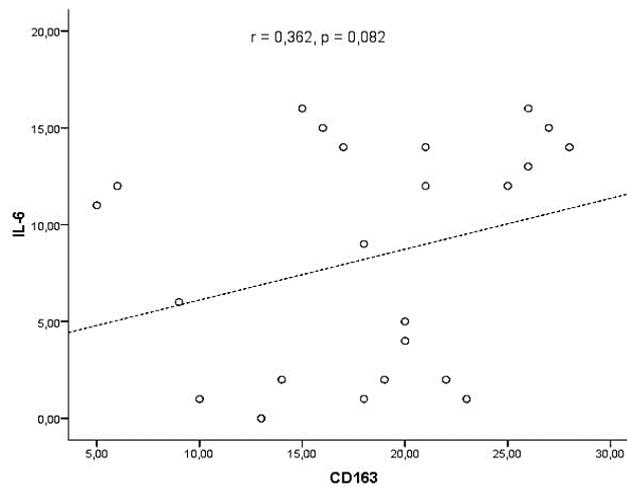


Gráfico 12 - Comparação entre a expressão dos marcadores IL-6 e CD163 na região profunda.

Fonte: Do autor.

Na comparação da expressão do marcador TNF- α com o marcador CD163, correlação positiva estatisticamente significativa também foi observada apenas na região superficial ($r = 0,537$ e $p = 0,007$). Foi possível observar que a maioria dos casos apresentou valores de TNF- α entre 5 e 25 na região superficial (GRÁFICO 13) enquanto que, na região profunda, a maioria dos casos apresentou valores abaixo de 7,5 para o mesmo marcador (GRÁFICO 14).

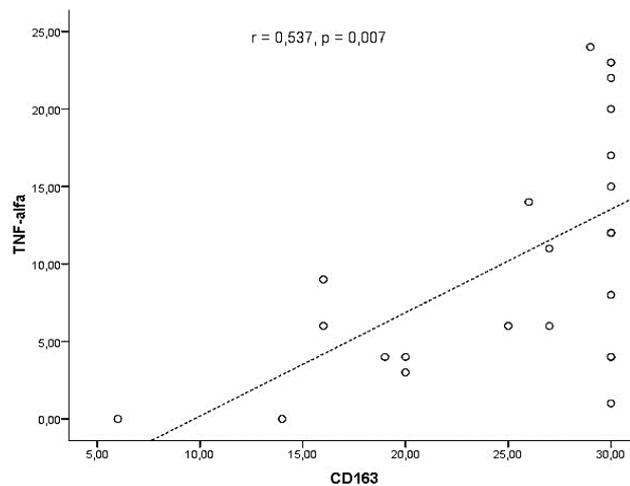


Gráfico 13 - Comparação entre a expressão dos marcadores TNF- α e CD163 na região superficial.

Fonte: Do autor.

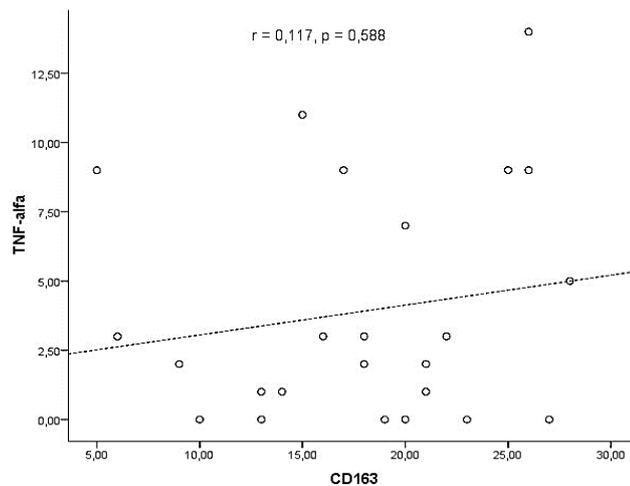


Gráfico 14 - Comparação entre a expressão dos marcadores TNF- α e CD163 na região profunda.

Fonte: Do autor.

Quando se analisou a marcação do anticorpo IL-1 β , observou-se a correlação positiva estatisticamente significativa deste marcador com a marcação do anticorpo IL-6 na região superficial ($r = 0,593$, $p = 0,002$) (GRÁFICO 15) e na região profunda ($r = 0,705$, $p < 0,001$) (GRÁFICO 16).

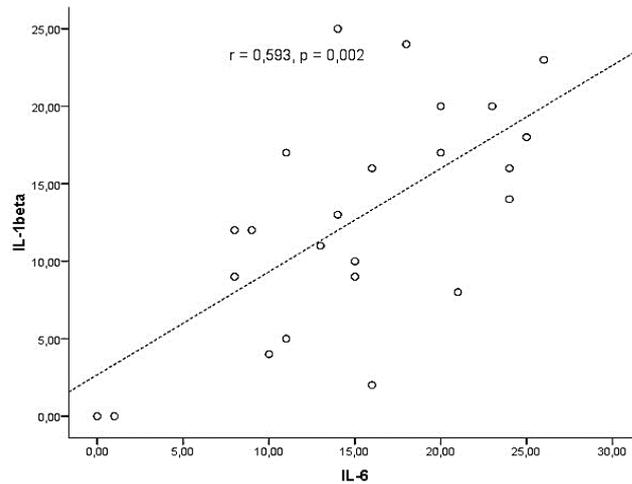


Gráfico 15 - Comparação entre a expressão dos marcadores IL-1 β e IL-6 na região superficial.

Fonte: Do autor.

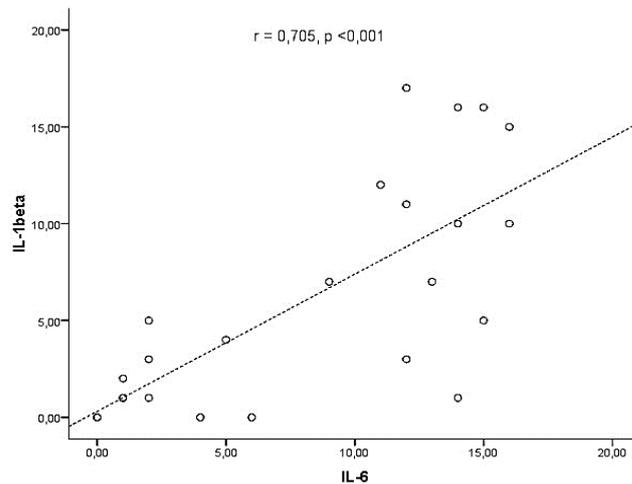


Gráfico 16 - Comparação entre a expressão dos marcadores IL-1 β e IL-6 na região profunda.

Fonte: Do autor.

A marcação do anticorpo IL-1 β , quando comparada com a expressão do marcador TNF- α na região superficial, mostrou uma correlação positiva estatisticamente significativa ($r = 0,506$, $p = 0,012$) (GRÁFICO 17). Esta correlação positiva estatisticamente significativa também foi obtida na região profunda dos CPAs para os mesmos anticorpos ($r = 0,677$, $p < 0,001$) (GRÁFICO 18). Verificou-se ainda que a maioria dos escores obtidos para os anticorpos TNF- α e IL-1 β se encontravam entre 5 e 25 na região superficial e entre 0 e 10 na região profunda.

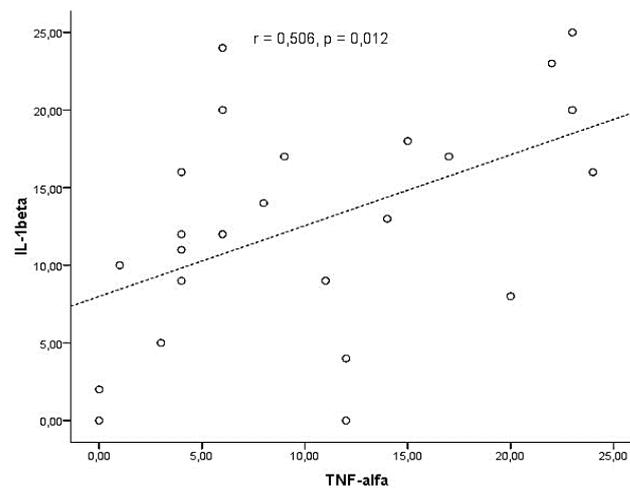


Gráfico 17 - Comparação entre a expressão dos marcadores IL-1 β e TNF- α na região superficial.

Fonte: Do autor.

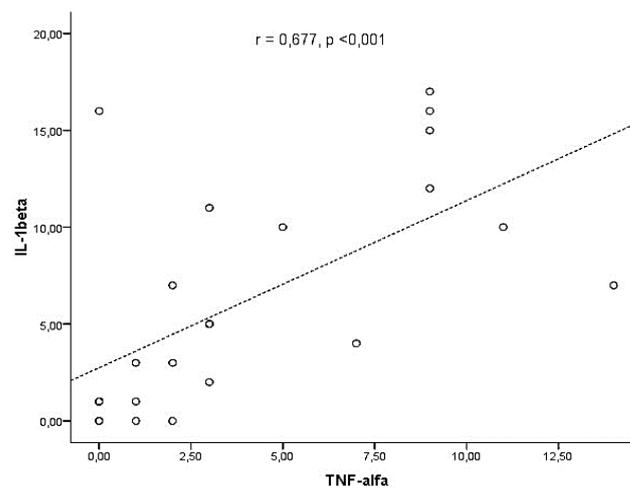


Gráfico 18 - Comparação entre a expressão dos marcadores IL-1 β e TNF- α na região profunda.

Fonte: Do autor.

Correlacionando-se a intensidade de marcação do anticorpo TNF- α com a intensidade de marcação do anticorpo IL-6, obteve-se em ambas as regiões uma correlação positiva, estatisticamente significativa, entre as variáveis. Os valores foram de $r = 0,440$ ($p = 0,032$) na região superficial (GRÁFICO 19) e $r = 0,565$ ($p = 0,004$) na profunda (GRÁFICO 20). Foi possível analisar que a maioria dos casos na região superficial apresentou valores para o marcador IL-6 entre 5 e 25, enquanto a marcação desse mesmo marcador apresentou valores 0 e 15 na região profunda.

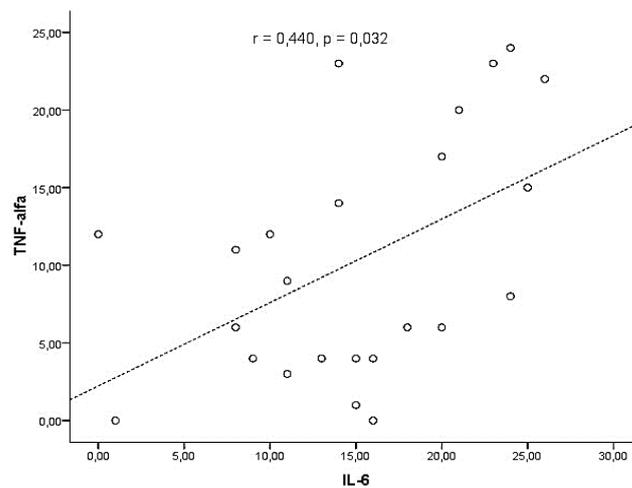


Gráfico 19 - Comparação entre a expressão dos marcadores TNF- α e IL-6 na região superficial.

Fonte: Do autor.

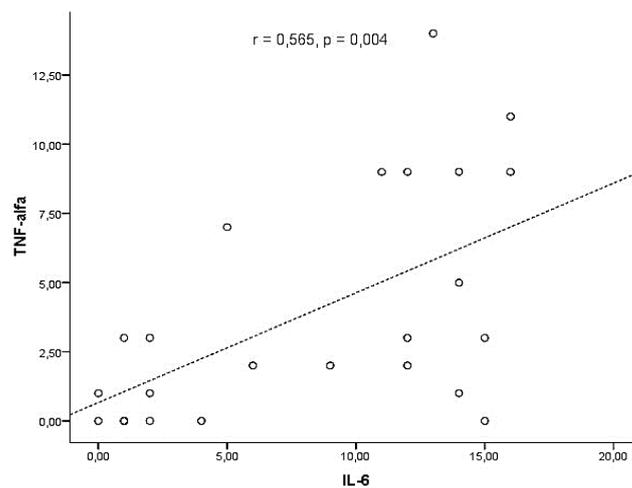


Gráfico 20 - Comparação entre a expressão dos marcadores TNF- α e IL-6 na região profunda.

Fonte: Do autor.

6 DISCUSSÃO

O CPA apresenta-se como uma lesão bastante frequente na prática clínica, sendo considerada uma lesão inflamatória, infecciosa e destrutiva, apresentando-se intraóssea (CAVALLA et al., 2014; NEVILLE et al., 2016). É uma lesão que resulta da ação direta dos micro-organismos e da resposta imunológica do hospedeiro a estímulos antigênicos (CAVALLA et al., 2014; GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2011; LIN et al., 2009). Os CPAs são classificados como cistos odontogênicos inflamatórios que possuem revestimento epitelial e uma cápsula cística com a presença de células de defesa, bem como a produção de mediadores inflamatórios como as citocinas (BERNARDI et al., 2015; WALKER et al., 2000). Contudo pouco ainda se sabe sobre o papel dessas citocinas no processo de desenvolvimento, manutenção e regressão destas lesões (COLIC et al., 2009).

As células inflamatórias presentes na cápsula cística do CPA são em sua maioria macrófagos e linfócitos, caracterizando assim um processo inflamatório crônico (COLIC et al., 2009; LIAPATAS; NAKOU; RONTOGIANNI, 2003). Durante esse processo, estas células produzirão mediadores inflamatórios e citocinas que estão envolvidas na patogênese dos cistos odontogênicos inflamatórios (LIN; HUANG, ROSENBERG, 2007). As citocinas exercem suas funções por meio da ligação específica a receptores celulares, assim, o equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e receptores pode determinar a natureza da resposta celular e, num contexto mais amplo, influenciar na intensidade e duração da resposta inflamatória e na evolução clínica da doença (CAVALLA et al., 2014; GAZIVODA et al., 2009).

Macrófagos são células importantes na resposta de proteção e também no desenvolvimento e perpetuação de reações inflamatórias (BRACKS et al., 2014; MÁRTON; KISS, 2014; RODINI; LARA, 2001). Estas células podem se diferenciar em subtipos celulares de acordo com o balanço de citocinas das respostas Th1 e Th2 secretadas pelas células imunes e inflamatórias (MURAILLE; LEO; MOSSER, 2014), que podem contribuir para a progressão ou cura da lesão (COLIC et al., 2009). Macrófagos M1 apresentam atividade microbicida, fagocitando e produzindo mediadores pró-inflamatórios como as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 e podem promover ou amplificar a polarização de linfócitos TCD4+ para o subtipo Th1, os quais também influenciarão, pela liberação de IFN- γ , na polarização de macrófagos para o

subtipo M1 (CAVALLA et al., 2014; METZGER, 2000). Macrófagos M2 têm sua ativação induzida por citocinas produzidas por linfócitos TCD4⁺ do subtipo Th2 como a IL-4 e IL-13 (DEY; ALLEN; HANKEY-GIBLIN, 2015; IVASHKIV, 2013; MURAILLE; LEO; MOSSER, 2014). Dentre suas funções destacam-se a produção de mediadores anti-inflamatórios e a restauração da homeostase tecidual pela produção de fatores de crescimento que estimulam a proliferação de células epiteliais e fibroblastos e inibem enzimas de degradação de matriz extra-celular (MOSSER, 2003; MURRAY; WYNN, 2011).

Classicamente, macrófagos M1 estão relacionados com a iniciação e sustentação do processo inflamatório, devido ao seu papel na defesa frente ao agente agressor, enquanto macrófagos M2 são relacionados com a resolução do processo inflamatório e reparo tecidual (MURAILLE; LEO; MOSSER, 2014). Macrófagos M1 e M2 desempenham um papel importante no direcionamento da resposta imune, devido a sua capacidade de promover a diferenciação de linfócitos em Th1 e Th2. Deste modo a identificação dos subtipos de macrófagos presentes se faz importante para um melhor entendimento do processo patológico, assim como auxílio para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento (CARLI et al., 2016; DEY; ALLEN; HANKEY-GIBLIN, 2015; MURAILLE; LEO; MOSSER, 2014).

Devido a inexistência de marcadores específicos para macrófagos M1 (HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011), optou-se, neste trabalho, por avaliá-los através da presença das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 por eles produzidas (DEY; ALLEN; HANKEY-GIBLIN, 2015), e, assim analisar a manifestação da resposta imune Th1. Para a observação da manifestação da resposta imune Th2 em CPAs, utilizou-se pela primeira vez como ferramenta de análise a presença de macrófagos M2 através da marcação do anticorpo CD163. Estas células recentemente descobertas, apresentam altos níveis do receptor transmembrana CD163, sendo esse um importante diferenciador entre macrófagos M1 e M2 (FABRIEK; DIJKSTRA; VAN DEN BERG, 2005; HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011; MØLLER, 2012).

Em nosso estudo analisamos a presença de macrófagos M2 através da marcação com o anticorpo CD163 nas regiões superficial e profunda da cápsula cística de CPAs. Observamos diferenças de marcações estatisticamente significativas entre regiões superficial e profunda, com a região superficial apresentando valores superiores. Este fato pode ser explicado devido a maior densidade de infiltrado inflamatório encontrado em região superficial (BRACKS et al., 2014), entretanto é

importante salientar que valores expressivos também foram obtidos na região profunda da cápsula cística, demonstrando a presença marcante dos macrófagos M2 nos CPAs.

Buscando um maior entendimento sobre os macrófagos M2, realizamos a análise da correlação da presença destas células com a presença das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6. Observou-se correlação positiva entre a expressão de macrófagos M2 e de citocinas TNF- α e IL-6 na região superficial da cápsula cística. Macrófagos M2 são comumente caracterizados pela baixa produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6, contudo macrófagos expostos a imuno-complexos e produtos microbianos são considerados exceções devido ao fato destas células preservarem a produção de elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, concomitantemente com níveis elevados de IL-10 e baixos níveis de IL-12. Apesar da elevada produção de citocinas inflamatórias por estas células, elas são capazes de realizar a proteção contra produtos microbianos e ainda promover a diferenciação de linfócitos Th2 e produção humoral de anticorpos (MANTOVANI et al., 2004; MOSSER, 2003).

O papel de macrófagos na fase de remodelamento em feridas de ratos é observado pelo aumento da expressão de CD163, assim como potenciais benefícios como a regulação da proliferação de queratinócitos, mioblastos e fibroblastos são observados através da presença das citocinas IL-6 e TNF- α (NOVAK; KOH, 2013). Com o objetivo de se analisar a relação do receptor CD163 com a produção de citocinas em infecções bacterianas, Fabriek et al. (2009) demonstraram que o reconhecimento de bactérias pelo CD163 contribui para a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 por macrófagos. Estas descobertas identificam CD163 como um receptor de macrófago para bactérias e sugerem que, durante a infecção bacteriana, CD163 em macrófagos residentes nos tecidos atuam como indutores da resposta inflamatória local para a eliminação da infecção (FABRIEK et al., 2009).

A ausência de correlação entre macrófagos M2 e a citocina IL-1 β observada em nosso estudo, pode ser explicada devido a ação das citocinas IL-4 e IL-13, responsáveis pela diferenciação de macrófagos para o subtipo M2 (MURAILLE; LEO; MOSSER, 2014), induzirem a produção em macrófagos M2 de receptores antagonistas a citocina IL-1, causando assim a inibição desta citocina (MANTOVANI et al., 2004; MOSSER, 2003).

As citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 são classicamente consideradas citocinas pró-inflamatórias e estão relacionadas com a proliferação epitelial nos CPAs, assim como

no processo de reabsorção óssea (LIN; HUANG, ROSENBERG, 2007; PRSO et al., 2007). Em nosso estudo, observamos a presença das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 na cápsula cística de CPAs. Obteve-se como resultado valores estatisticamente significativos entre regiões superficial e profunda da cápsula, sendo que maiores concentrações dessas citocinas foram observadas na região superficial. Este fato pode ser explicado devido a presença de bactérias no interior dos canais radiculares e no lúmen cístico o que ocasiona a infiltração de células inflamatórias no epitélio cístico e cápsula como resposta ao agressor (LIN et al., 2009; RICUCCI et al., 2006). Assim, a presença de células inflamatórias e suas citocinas em consequência da presença de bactérias e seus produtos no lúmen cístico, podem ser responsáveis pela persistência do CPA após terapêutica endodôntica (LIN et al., 2009). Resultados semelhantes foram observados por Henriques et al. (2011) que, ao analisar lesões persistentes após terapia endodôntica, verificaram um predomínio de citocinas pró-inflamatórias, com níveis elevados de TNF- α , o que demonstra um perfil imunológico ativo destas lesões (JAKOVLJEVIC et al., 2015).

A presença de infiltrado inflamatório em variadas intensidades pode ser observada na cápsula cística dos CPAs. Este infiltrado inflamatório é constituído por células imunocompetentes como células NK, macrófagos, linfócitos entre outras, que agirão através de mediadores, como as citocinas, na tentativa de controlar a infecção (COLIC et al., 2009). Estas citocinas ocasionarão vasodilatação e quimiotaxia de células inflamatórias como polimorfonucleares e mononucleares que produzirão mediadores para destruição de micro-organismos e dos tecidos de sustentação dos dentes, além de atrair células do sistema imune inespecífico e específico para o local, caracteristicamente associadas à migração de células inflamatórias (CEKICI et al., 2014). Deste modo, a intensidade da inflamação está diretamente relacionada com a presença de citocinas (JURISIC et al., 2008; MÁRTON; KISS, 2014). Este fato foi observado em nosso estudo quando correlacionou-se a intensidade do infiltrado inflamatório com a expressão das citocinas. Em relação ao TNF- α , observou-se uma tendência de correlação na região superficial da cápsula e a presença de correlação positiva na região profunda. Jurisic et al. (2008) constataram a existência de correlação entre as células inflamatórias e a concentração de TNF- α , sendo a presença desta citocina relacionada a macrófagos presentes na cápsula. Esta mesma correlação foi observada em nosso estudo quando correlacionadas a expressão das citocinas IL-6 e IL-1 β com a intensidade da inflamação nas diferentes regiões.

Quando correlacionadas as expressões das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 entre si, observou-se correlação positiva estatisticamente significativa em ambas regiões superficial e profunda da cápsula cística. Correlações entre estas citocinas foram observadas em estudos anteriores de lesões apicais (GAZIVODA et al., 2009; JAKOVLJEVIC et al., 2015; MARTINHO et al., 2012), sugerindo que as citocinas TNF- α e IL-1 β desempenham papéis na iniciação e estimulação da resposta inflamatória em lesões apicais e ainda estimulando a produção de outros mediadores como a IL-6 (AZUMA et al., 2014; MARTINHO et al., 2012). A IL-6 apresenta como fonte macrófagos e linfócitos Th2, sendo considerada uma citocina pró e anti-inflamatória, devido a sua produção durante o processo inflamatório e posterior inibição da secreção de TNF- α e IL-1 (AZUMA et al., 2014; GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2011). O TNF- α possui inúmeras funções, entre as quais, a capacidade de estimular a produção de IL-1 β e IL-6 (CEKICI et al., 2014). Em conjunto, estas citocinas apresentam a capacidade de estimulação da proliferação de células epiteliais (LIN et al., 1996; LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007; MEGHJI et al., 1996), e são consideradas mediadores no remodelamento ósseo (CEKICI et al., 2014; GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2011), estando estas características relacionadas com o processo de crescimento cístico (HREN; IHAN, 2009; MÁRTON; KISS, 2014).

TNF- α , IL-1 β e IL-6 agem na diferenciação de osteoclastos e estimulam sua atividade e assim a reabsorção óssea (GRAVES; OATES; GARLET, 2011; KWAN TAT et al., 2004; MÁRTON; KISS, 2014). TNF- α e IL-1 β , desempenham importante papel na reabsorção óssea em lesões inflamatórias (KWAN TAT et al., 2004), estimulando a expressão e ativação de enzimas de degradação de matriz extracelular (GRAVES; OATES; GARLET, 2011). A IL-6, como as outras citocinas, estimula a atividade de osteoclastos, entretanto ratos deficientes de IL-6 mostraram aumento da reabsorção óssea após infecção pulpar, demonstrando assim um papel de proteção (BALTO; SASAKI; STASHENKO, 2001).

Linfócitos são as células predominantes nos infiltrados inflamatórios de lesões periapicais (LIAPATAS; NAKOU; RONGOIANNI, 2003; WALKER et al., 2000), sugerindo que a resposta imunológica presente em tais lesões se mostra ativa (WALKER et al., 2000). A presença significativa das respostas imunes Th1 e Th2 em lesões periapicais indica a importância da ação simultânea dos dois tipos de resposta na patogênese da doença (MÁRTON; KISS, 2014). Acredita-se que a resposta imune

Th1 mediada pelo IFN- γ e pelas citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 estejam envolvidas na progressão das lesões e destruição óssea, enquanto a resposta Th2 mediada pela citocinas IL-4, IL-5, IL-10 seja responsável pelo processo de cura e restrição da resposta imune e inflamatória (COLIC et al., 2009; MÁRTON; KISS, 2014). Entretanto, a resposta imune Th2 pode estar relacionada a falha no controle da infecção visto que sua presença pode inibir a resposta Th1, que tem como função a eliminação de organismos agressores. Assim, a persistência da lesão pode ser atribuída a predominância de um subtipo específico de resposta imune, resultando na incapacidade de controlar a infecção ou contribuindo para a persistência do processo inflamatório (WALKER et al., 2000). O reconhecimento de que a polarização de macrófagos M1 e M2 apresenta um papel importante na progressão de processos inflamatórios crônicos e que abordagens terapêuticas envolvendo a regularização desta polarização são pontos importantes a serem considerados (DEY; ALLEN; HANKEY-GIBLIN, 2015).

Concluimos que a resposta imune Th1 e macrófagos M1 se fazem presentes nos CPAs através da expressão das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, e que a demonstração, pela primeira vez, da existência de macrófagos M2 em CPAs caracteriza a presença da resposta imune Th2 nestas lesões. Macrófagos M2 foram associados a TNF- α e IL-6, sugerindo uma nova e importante ferramenta para futuros estudos sobre processos imunológicos relacionados aos CPAs.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, pode-se constatar que os CPAs se caracterizam microscopicamente pela:

- a) expressão das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 nas regiões superficial e profunda da cápsula cística e sua correlação positiva com a intensidade do infiltrado inflamatório;
- b) marcante presença de macrófagos M2 em ambas regiões da cápsula cística;
- c) correlação positiva entre macrófagos M2 e as citocinas TNF- α e IL-6;
- d) correlação positiva entre as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 em ambas regiões da cápsula cística;
- e) presença da resposta imune Th1 e macrófagos M1 nos CPAs através da expressão das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6;
- f) presença da resposta imune Th2 através da demonstração, pela primeira vez, da existência de macrófagos M2 em CPAs.

E assim, inferir a participação das respostas Th1 e Th2 pela presença das células M1 e M2 e citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 na patogenia dos CPAs.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ALCANTARA, B. A. R. et al. Correlation between inflammatory infiltrate and epithelial lining in 214 cases of periapical cysts. **Brazilian Oral Research**, v. 27, n. 6, p. 490-495, Nov./Dec. 2013.

AGGARWAL, V.; LOGANI, A.; SHAH, N. The evaluation of computed tomography scans and ultrasounds in the differential diagnosis of periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 11, p. 1312-1315, Nov. 2008.

AVELAR, R. L. et al. Odontogenic cysts: a clinicopathological study of 507 cases. **Journal of Oral Science**, v. 51, n. 4, p. 581-586, Dec. 2009.

AZUMA, M. M. et al. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. **International Endodontic Journal**, v. 47, n. 7, p. 615-621, July 2014.

BALTO, K.; SASAKI, H.; STASHENKO, P. Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2, p. 744-750, Feb. 2001.

BANDO, Y. et al. Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 22, n. 5, p. 221-227, May 1993.

BECCONSALL-RYAN, K.; TONG, D.; LOVE, R. M. Radiolucent inflammatory jaw lesions: a twenty-year analysis. **International Endodontic Journal**, v. 43, n. 10, p. 859-865, Oct. 2010.

BERNARDI, L. et al. Radicular Cyst: An Update of the Biological Factors Related to Lining Epithelium. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 12, p. 1951-1961, Dec. 2015.

BRACKS, I. V. et al. Distribution of Mast Cells and Macrophages and Expression of Interleukin-6 in Periapical Cysts. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 1, p. 63-68, Jan. 2014.

CARLI, M. L. et al. M2 macrophages and inflammatory cells in oral lesions of chronic paracoccidioidomycosis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 45, n. 2, p. 141-147, Feb. 2016.

CARRILLO GARCÍA, C. et al. The post-endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 12, n. 8, p. 585-590, Dec. 2007.

CAVALLA, F. et al. Cytokine networks regulating inflammation and immune defense in the oral cavity. **Current Oral Health Reports**, v. 1, n. 2, p. 104-113, June 2014.

CEKICI, A. et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 64, n. 1, p. 57-80, Feb. 2014.

COLIC, M. et al. Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 12, p. 1120-1130, Dec. 2006.

COLIC, M. et al. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 1, p. 101-113, Nov. 2009.

COLIC, M. et al. Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 9, p. 690-696, Oct. 2010.

DE DEUS, Q. D. **Endodontia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992.

DEL CORSO, G et al. Jaw Cysts Diagnosed in an Italian Population Over a 20-Year Period. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 22, n.8, p.699-706, Dec. 2014.

DEY, A.; ALLEN, J.; HANKEY-GIBLIN, P. A. Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 5, Jan. 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00683/full>>. Acesso em: 25 jul. 2016.

FABRIEK, B. O.; DIJKSTRA, C. D.; VAN DEN BERG, T. K. The macrophage scavenger receptor CD163. **Immunobiology**, v. 210, n. 2-4, p. 153-160, 2005.

FABRIEK, B. O. et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. **Blood**, v. 113, n. 4, p. 887-892, Jan. 2009.

FRAGA, C. A. C. et al. Th1 and Th2-like protein balance in human inflammatory radicular cysts and periapical granulomas. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 4, p. 453-455, Apr. 2013.

GAZIVODA, D. et al. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 38, n. 7, p. 605-611, Aug. 2009.

GRAUNAITE, I.; LODIENE, G.; MACIULSKIENE, V. Pathogenesis of apical Periodontitis: a literature review. **Journal of Oral & Maxillofacial Research**, v. 2, n. 4, Jan. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3886078/>>. Acesso em: 25 jul. 2016.

GRAVES, D. T.; OATES, T.; GARLET, G. P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. **Journal of Oral Microbiology**, v. 3, Jan. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3087239/>>. Acesso em: 13 jul. 2016.

HARGREAVES, K.M.; COHEN, S. **Caminhos da polpa**. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HENRIQUES, L. C. F. et al. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 12, p. 1659-1662, Dec. 2011.

HEUSINKVELD, M.; VAN DER BURG, S. H. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, Dec. 2011. Disponível em: <<https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-9-216>>. Acesso em: 10 jul. 2016.

HREN, N. I.; IHAN, A. T lymphocyte activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 2, p. 156-161, Feb. 2009.

HUUMONEN, S.; ØRSTAVIK, D. Radiological aspects of apical periodontitis. **Endodontic Topics**, v. 1, n. 1, p. 3-25, Mar. 2002.

IVASHKIV, L. B. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 5, p. 216-223, May 2013.

JAKOVLJEVIC, A. et al. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. **Australian Endodontic Journal**, v. 41, n. 2, p. 72-77, Aug. 2015.

JETTEN, N. et al. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. **Angiogenesis**, v. 17, n. 1, p. 109-118, Jan. 2014.

JURISIC, V. et al. The concentration of TNF- α correlate with number of inflammatory cells and degree of vascularization in radicular cysts. **Oral Diseases**, v. 14, n. 7, p. 600-605, Oct. 2008.

KRAMER, I.R.; PINDBORG, J.J; SHEAR, M. editors. **Histological typing of odontogenic tumors**. 2. ed. Geneva: World Health Organization, 1992.

KUBOTA, Y. et al. Relation between size of odontogenic jaw cysts and the pressure of fluid within. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 42, n. 5, p. 391-395, Oct. 2004.

KUSUMI, A. et al. High IL-6 synthesis in cultured fibroblasts isolated from radicular cysts. **Archives of Oral Biology**, v. 49, n. 8, p. 643-652, Aug. 2004.

KWAN TAT, S. et al. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 1, p. 49-60, Feb. 2004.

LEONARDO, M. R.; LEAL, J. M. **Endodontia**. 3. ed. São Paulo: Panamericana, 1998.

LEONARDO, M. R.; LEAL, J. M.; SIMÕES FILHO, A. P. **Endodontia: tratamento de canais radiculares**. São Paulo: Panamericana, 2005.

LIAPATAS, S.; NAKOU, M.; RONTOGIANNI, D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 7, p. 464-471, July 2003.

LIN, L. M. et al. Detection of epidermal growth factor receptor in inflammatory periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v. 29, n. 3, p. 179-184, May 1996.

LIN, L. M.; HUANG, G. T.-J.; ROSENBERG, P. A. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 8, p. 908-916, Aug. 2007.

LIN, L. M. et al. Nonsurgical root canal therapy of large cyst-like inflammatory periapical lesions and inflammatory apical cysts. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 5, p. 607-615, May 2009.

LOVE, R. M.; FIRTH, N. Histopathological profile of surgically removed persistent periapical radiolucent lesions of endodontic origin. **International Endodontic Journal**, v. 42, n. 3, p. 198-202, Mar. 2009.

LOYOLA, A. M. et al. Apoptosis in epithelial cells of apical radicular cysts. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 7, p. 465-469, July 2005.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 677-686, Dec. 2004.

MARTIN, L.; SPEIGHT, P. M. Odontogenic cysts. **Diagnostic Histopathology**, v. 21, n. 9, p. 359-369, Sept. 2015.

MARTINHO, F. C. et al. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 6, p. 740-745, June 2012.

MÁRTON, I. J.; KISS, C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 2, p. 155-163, Feb. 2014.

MEGHJI, S. et al. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. **Archives Oral Biology**, v.41, n.6, p. 523-531, June 1996.

METZGER, Z. Macrophages in periapical lesions. **Endodontics & Dental Traumatology**, v. 16, n. 1, p. 1-8, Feb. 2000.

MOESTRUP, S. K.; MØLLER, H. J. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. **Annals of Medicine**, v. 36, n. 5, p. 347-354, 2004.

MØLLER, H. J. Soluble CD163. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory investigation**, v. 72, n. 1, p. 1-13, Feb. 2012.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 2, p. 209-212, Feb. 2003.

MUGLALI, M. et al. Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cyst fluids. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.37, n. 3, p.185-189, Mar. 2008.

MURAILLE, E.; LEO, O.; MOSER, M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism?. **Frontiers Immunology**, v. 5, Nov. 2014. Disponível em: <
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00603/full>>. Acesso em: 03 jul. 2016.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723-737, Oct. 2011.

NAIR, P. N. R. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontology 2000**, v. 13, n. 1, p. 121-148, Feb. 1997.

_____. New perspectives on radicular cysts: do they heal? **International Endodontic Journal**, v.31, n. 3, p.155-160, May 1998.

_____. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 6, p. 348-381, Nov. 2004.

_____. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. **International Endodontic Journal**, v. 39, n. 4, p. 249-281, Apr. 2006.

NAIR, P. N. R.; SUNDQVIST, G.; SJÖGREN, U. Experimental evidence supports the abscess theory of development of radicular cysts. **Oral Surgery, Oral Medicine**,

Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, v. 106, n. 2, p. 294-303, Aug. 2008.

NEVILLE, B.W, et al. **Patologia oral e maxilofacial**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

NORTON, A. J.; JORDAN, S.; YEOMANS, P. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): A simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. **The Journal of Pathology**, v. 173, n. 4, p. 371-379, Aug. 1994.

NOVAK, M. L.; KOH, T. J. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. **The American Journal of Pathology**, v. 183, n. 5, p. 1352-1363, Nov. 2013.

OCHSENIUS, G. et al. Odontogenic cysts: analysis of 2.944 cases in Chile. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 12, n. 2, p. 85-91, Mar. 2007.

PARSLOW, T. G. et al. **Imunologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

PROCKT, A. P. et al. Odontogenic cysts: analysis of 680 cases in Brazil. **Head and Neck Pathology**, v. 2, n. 3, p. 150-156, Sep. 2008.

PRSO, I. B. et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. **Mediators of Inflammation**, v. 2007, 2007. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1804300/>>. Acesso em: 13 jun. 2016.

REGEZI, J. P.; SCIUBBA, J. J.; JORDAN, R.C.K. **Patologia bucal: correlações clínicopatológicas**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

RICUCCI, D. et al. Epithelium and bacteria in periapical lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 101, n. 2, p. 239-249, Feb. 2006.

RODINI, C. de O.; LARA, V. S. Study of the expression of CD68+ macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cysts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 92, n. 2, p. 221-227, Aug. 2001.

SÁ, M. C. et al. Immunoexpression of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 α and interleukin-10 on odontogenic cysts and tumours. **International Endodontic Journal**, Mar. 2016. Disponível em: <
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iej.12640/epdf>>. Acesso em: 29 abr. 2016.

SAFI, L. et al. A twenty-year survey of pathologic reports of two common types of chronic periapical lesions in Shiraz Dental School. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, v. 2, n. 2, p. 63-67, 2009.

SCHULZ, M. et al. Histology of periapical lesions obtained during apical surgery. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 5, p. 634-642, May 2009.

SILVA, T. A. et al. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 5, p. 310-316, Oct. 2005.

SHAFER, W.G.; HINE, M.K.; LEVY, B.M. **Tratado de patologia bucal**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.

SHARIFIAN, M. J.; KHALILI, M. Odontogenic cysts: a retrospective study of 1227 cases in an Iranian population from 1987 to 2007. **Journal of Oral Science**, v. 53, n. 3, p. 361-367, Sep. 2011.

TAKAHASHI, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. **International Endodontic Journal**, v. 31, n. 5, p. 311-325, Sep. 1998.

TEKKESIN, M. S. et al. Odontogenic and nonodontogenic cysts in Istanbul: analysis of 5088 cases. **Head & Neck**, v. 34, n. 6, p. 852-855, June 2012.

TKACZUK, A. T. et al. Cystic lesions of the jaw in children: A 15-year experience. **JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, v. 141, n. 9, p. 834-839, Sep. 2015.

TORTORICI, S. et al. Prevalence and distribution of odontogenic cysts in Sicily: 1986-2005. **Journal of Oral Science**, v. 50, n. 1, p. 15-18, Mar. 2008.

TSAI, C.H. et al. Immunohistochemical localization of tissue-type plasminogen activator and type I plasminogen activator inhibitor in radicular cysts. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 33, n. 3, p. 156-161, Mar. 2004.

VARIN, A.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 630-641, 2009.

WALKER, K. F. et al. Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry. **European Journal of Oral Sciences**, v. 108, n. 3, p. 195-201, June 2000.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 445-489, 2010.

ANEXO

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE CITOCINAS IL-1b, IL-6, IL-10 E TNF- α EM CISTOS ODONTOGÊNICOS INFLAMATÓRIOS
EMENDA: ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE MACRÓFAGOS M2 E CITOCINAS IL-1b, IL-6 E TNF- α EM CISTOS ODONTOGÊNICOS INFLAMATÓRIOS

Pesquisador: João Adolfo Costa Hanemann

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 06706812.9.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.291.161

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma Emenda para o acréscimo de um marcador. Segue a justificativa do pesquisador para a Emenda: "AS REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS COM MARCADORES PARA IL-1b, IL-6 E TNF α FORAM REALIZADAS. ENTRETANTO O MARCADOR PARA IL-10 NÃO FUNCIONOU, SENDO ELIMINADO DO ESTUDO. PARA COMPLEMENTAR O ESTUDO SOLICITA-SE O ACRÉSCIMO DO MARCADOR CD163, O QUAL É MARCADOR DE MACRÓFAGOS M2"

Objetivo da Pesquisa:

"Analisar a presença de IL-1, IL-6, IL-10 (EMENDA: REMOÇÃO DE IL-10 E ACRÉSCIMO DE MACRÓFAGOS M2) e TNF- α em cistos odontogênicos inflamatórios, diagnosticados no Laboratório de Anatomia Patológica da Unifal-MG no período de 2000 a 2010, com base na expressão imunohistoquímica das referidas citocinas, com relação ao seu possível papel na patogênese e crescimento dessas lesões."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: "Nenhum".

Benefícios: "O entendimento do papel das citocinas envolvidas na etiopatogênese dos cistos odontogênicos inflamatórios auxiliará os cirurgiões-dentistas na escolha da melhor terapêutica a

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700
Bairro: centro **CEP:** 37.130-000
UF: MG **Município:** ALFENAS
Telefone: (35)3299-1318 **Fax:** (35)3299-1318 **E-mail:** comite.etica@unifal-mg.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS**



Continuação do Parecer: 1.291.161

ser adotada no tratamento destas lesões.”

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Metodologia clara, bem definida e capaz de atender os objetivos da pesquisa. Este projeto foi previamente aprovado pelo CEP e, neste momento, o pesquisador solicita somente que seja descartado o marcador IL-10 e acrescentado o CD163 (marcador de macrófagos M2).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos da Emenda:

Projeto modificado: OK

Folha de rosto modificada: OK

Formulário de informações básicas do projeto: OK

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado do CEP acata o parecer do relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--------------------------------------|------------------------|----------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_591157 E1.pdf | 18/09/2015 10:04:05 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Modificado.docx | 18/09/2015 09:54:19 | João Adolfo Costa Hanemann | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_rostoassinada.pdf | 18/09/2015 09:53:40 | João Adolfo Costa Hanemann | Aceito |
| Outros | DSC07230.JPG | 10/08/2012 14:41:36 | | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700
 Bairro: centro CEP: 37.130-000
 UF: MG Município: ALFENAS
 Telefone: (35)3299-1318 Fax: (35)3299-1318 E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 1.291.161

ALFENAS, 22 de Outubro de 2015

Assinado por:
Celso Ferrarezi Junior
(Coordenador)