



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA - FOUFBA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA E SAÚDE**

Simone Cristina Leal Tosta dos Santos

**PARTICIPAÇÃO DE FATORES OSTEOCLASTOGÊNICOS NA
IMUNOPATOGENIA DE LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS HUMANAS**

Salvador/Bahia
2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA - FOUFBA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA E SAÚDE**

SIMONE CRISTINA LEAL TOSTA DOS SANTOS

**PARTICIPAÇÃO DE FATORES OSTEOCLASTOGÊNICOS NA
IMUNOPATOGENIA DE LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Odontologia e Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Águida Cristina Henriques Leitão

Salvador/Bahia
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,
Sistema de Bibliotecas da UFBA

S237 Santos, Simone Cristina Leal Tosta dos.

Participação de fatores osteoclastogênicos na imunopatogenia de lesões periapicais crônicas humanas / Simone Cristina Leal Tosta dos Santos. - Salvador, 2016.

80f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Águida Cristina Henriques Leitão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde, 2015.

1.Cisto radicular. 2. Granuloma periapical. 3. Reabsorção óssea. 4. Interleucina. 5. Fator de necrose tumoral alfa. I. Leitão, Águida Cristina Henriques.II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde III. Título.

CDU: 616.314-007




UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA E SAÚDE

TERMO DE APROVAÇÃO

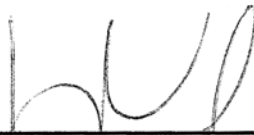
C.D. SIMONE CRISTINA LEAL TOSTA

**“PARTICIPAÇÃO DE FATORES OSTEOCLASTOGÊNICOS NA
IMUNOPATOGENIA DE LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS EM
HUMANOS”**

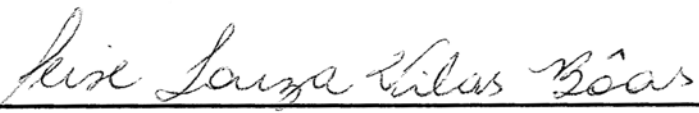
BANCA EXAMINADORA:



Profa. Dra. Aguida Cristina Gomes Henriques Leitão (Orientador)
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia



Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos (Examinador Interno)
Professor da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia



Profa. Dra. Deise Souza Vilas Boas (Examinador Externo)
Professor da Universidade Federal da Bahia - ICS

“A verdadeira coragem é ir atrás de seus sonhos mesmo quando todos dizem que ele é impossível!”

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida de forma incondicional, apoiando e incentivando os meus sonhos e projetos.

À minha mãe Maria Elena Kravchychyn, pelo amor infinito

À minha filha Maria Elena Leal, por ser meu maior tesouro.

Ao meu noivo, Marcos Rocha, por ser meu companheiro de todas as horas.

Às minhas irmãs, Andréia Figueiredo e Viviane Leal, pela nossa união.

Aos meus sobrinhos, Gabriela Leal, Carlos Eduardo Figueiredo e Clara Leal, por sempre me trazerem a esperança.

AGRADECIMENTOS

A minha gratidão às pessoas que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal ao longo desta trajetória.

À Deus, força maior do Universo, que diariamente, me mostra que é possível acordar, recomeçar se for preciso e seguir em frente nesta caminhada tão valiosa, que a Vida.

À minha orientadora Prof. Dra. Águida Cristina Henriques Leitão, por ter me presenteado com tantos momentos ricos em conhecimento e aprendizado. Por ser, hoje, o meu grande modelo de Competência e Comprometimento com a docência. Muitas vezes precisou segurar na minha mão, mas em outras, sensível e atenta, me deixou voar sozinha. Minha gratidão eterna a esta grande Mulher.

À minha mãe, Maria Elena Kravchychyn, meu porto seguro, minha referência de mulher valente e íntegra. Sem seu olhar cuidadoso, jamais teria chegado aonde cheguei.

À minha filha, Maria Elena Leal, meu grande amor, minha razão por estar viva e forte. Sua presença me instiga a sempre fazer o melhor. Seu sorriso me faz criar forças que jamais imaginei ter, me ensinando, diariamente, como é maravilhoso e divino ser sua mãe.

Ao meu noivo Marcos Rocha, meu anjo protetor. A vida nos uniu novamente depois de 28 anos, nos mostrando que o destino é implacável. Estamos entrelaçadas para sempre e hoje somos fortes, cúmplices e parceiros desta linda estória de amor.

Às minhas irmãs, Andréia Figueiredo e Viviane Leal, modelos de mulheres fortes e destemidas, que jamais desistem de seus sonhos. Somos fortes porque nossa união é sólida e intocável.

Aos professores do Programa de Pós graduação em Odontologia e Saúde, pelo incentivo à minha capacitação técnica. Em especial aos **Profs.**

Drs. Andréia Figueiredo, Flávia Caló, Jean Nunes e Luciana Ramalho, por serem sinônimos de excelência, competência e amor à Docência.

À Prof. Dra. Estela Winocur, minha eterna mestra e minha referência como Endodontista. Seus ensinamentos e exemplos levo comigo pra vida toda.

À todos os meus colegas da Programa de Pós Graduação que compartilharam conhecimentos e vivências, enriquecendo o meu aprendizado. Agradecimento especial a **Virginia Uzeda** e **Raisa Dourado,** minhas colegas que honrosamente as tenho como amigas, compartilhando comigo momentos de muitas emoções e crescimento.

Aos alunos de Iniciação Científica, Giele Tenisi, Jessica Montenegro, Larissa Abbehusen, Rafael Rodrigues e Thalita Teixeira, meus meninos queridos, que estiveram juntos neste projeto tão rico de experiências e aprendizado.

Aos Técnicos do Laboratório de Patologia na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, Táyla Pereira e Edilson Amancio, pelo apoio em toda a fase laboratorial, através de um trabalho de extrema competência e dedicação.

A Srta. Sueli Paixão, secretária do Programa de Pós Graduação, pelo apoio administrativo ao longo destes dois anos.

À Universidade Federal da Bahia, através do Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde, por ter possibilitado a concretização deste projeto e por ter incentivado a minha formação científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio e investimento na minha qualificação profissional e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo auxílio financeiro, possibilitando a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Lesões Periapicais Crônicas: Aspectos Gerais	19
2.1.1. Granuloma Periapical	19
2.1.2. Cisto Radicular	21
2.2. Remodelação Óssea	23
2.2.1. Considerações Gerais	23
2.2.2. Fatores Osteoclastogênicos	25
2.2.2.1. Sistema RANK/RANKL/OPG	25
2.2.2.2. Citocinas Inflamatórias	30
2.2.2.3. Catepsina K	36
3. OBJETIVOS	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Considerações Éticas	41
4.2 Caracterização Do Estudo	41
4.3 Variáveis Estudadas	41
4.4 População	42
4.5 Amostra	42
4.5.1 Caracterização da Amostra	43
4.6 Análise Morfológica	43
4.7 Estudo Imunoistoquímico	45
4.7.1 Técnica da Imunoistoquímica	45
4.7.2 Análise Imunoistoquímica	47
4.8 Análise Estatística	48
5. RESULTADOS	48
5.1 Dados Morfológicos	48
5.2 Imunoexpressão do RANKL, TNF α , OPG, IL33 e Catps K	49
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÕES	65
8. REFERÊNCIAS	66
9. ANEXO	81

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Fotomicrografias de CRs corados em hematoxilina/eosina (H/E). Em **A**, CR exibindo epitélio de revestimento cístico hiperplásico; em **B**, CR mostra epitélio atrófico (HE, 100x).....49
- Figura 2. Imunoexpressão de RANKL, OPG, TNF α , IL33 e Catps K em CRs. Note alta expressão de RANKL (**A**), TNF α (**C**), IL33 (**D**), CatpsK (**E**) no epitélio cístico (asterisco) e no infiltrado inflamatório crônico (setas). A cabeça de seta mostra a positividade nas células endoteliais. Em **B**, área de baixa expressão de OPG no epitélio e cápsula cística (imunoperoxidase, x200).....51
- Figura 3. Imunoexpressão de RANKL, OPG, TNF α , IL33 e Catps K em GPs. Note alta expressão das células mesenquimais para todas as proteínas (**A-E**). As setas indicam a positividade no infiltrado inflamatório crônico e a cabeça de seta mostra a positividade nas células endoteliais (**D**, **E**) (imunoperoxidase, x200).....54
- Figura 4. Imunoexpressão de OPG em CR e GP. Note em **A**, área de baixa expressão de OPG no epitélio e cápsula do CR; em **B**, alta positividade nas células mesenquimais do GP (imunoperoxidase, x200).....56

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Descrição das variáveis estudadas.....	41
Tabela 1	Informações clínicas dos pacientes de acordo com o tipo da lesão. Salvador/BA,2015.....	43
Tabela 2	Especificações dos anticorpos utilizados.....	45
Tabela 3	Intensidade do infiltrado inflamatório relacionado aos casos de CRs e GPs.Salvador/BA, 2015.....	49
Tabela 4	Distribuição percentual da imunomarcaçãode RANKL, TNF α , OPG, IL33 e Catps K no epitélio dos CRs. Salvador/BA, 2015.....	50
Tabela 5	Distribuição percentual da imunomarcação de RANKL, TNF α , OPG, IL33 e Catps K nas células mesenquimais dos CRs. Salvador/BA, 2015.....	52
Tabela 6	Distribuição percentual da imunomarcação de RANKL, TNF α , OPG, IL33 e Catps K nas células mesenquimais dos GPs. Salvador/BA, 2015.....	53
Tabela 7	Comparação da imunomarcação de RANKL, TNF α , OPG, IL33 e Catps K na cápsula/tecido conjuntivo entre CRs e GPs. Salvador/BA, 2015.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LPCs Lesões Periapicais Crônicas
GP – Granuloma Periapical
CR – Cisto Radicular
CRR – Cisto Radicular Residual
M-CSF - Fator estimulante de colônia de macrófagos
RANK - Receptor ativador do fator nuclear κ B
RANKL – Ligante do Receptor ativador do fator nuclear κ B
OPGL - Ligante da osteoprotegerina
ODF - Fator de diferenciação dos osteoclastos
OPG - Osteoprotegerina
TNF α - Fator de necrose tumoral alfa
TNF – Fator de necrose tumoral
TNFR1 – Receptor 1 de Fator de necrose tumoral
TNFR2 – Receptor 2 de Fator de necrose tumoral
Catps K - Catepsina K
IL33 – Interleucina 33
IL1 – Interleucina 1
IL1 α – Interleucina 1 alfa
IL1 β – Interleucina 1 beta
IL6 – Interleucina 6
IL8 – Interleucina 8
IL10 – Interleucina 10
IL17- Interleucina 17
Th1 – T helper 1
Th2 – T helper 2
Th17 – T helper 17
TGF β - Fator de crescimento transformante Beta
NK - natural killers
NF κ B – Fator nuclear κ B
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
IFN γ – Interferon gama

ODN - Odenacatib

HE – Hematoxilina Eosina

PBS – Tampão fosfato-salino

RESUMO

As lesões periapicais crônicas (LPCs) são consideradas patologias frequentes na cavidade bucal, resultantes de cárie dentária, fratura dentária, iatrogenia ou outras circunstâncias que levem a contaminação pulpar. A expansão das LPCs está associada à participação de células inflamatórias, que liberam fatores estimuladores da atividade osteolítica, como RANK (receptor ativador do fator nuclear kB) e seu ligante RANKL, bem como inibidores como OPG (osteroprogerina) e outras citocinas inflamatórias, como TNF α (tumor de necrose tumoral alfa), IL33 (Interleucina 33) e Catpsina K (Catps K). A proposta deste trabalho foi investigar a participação de fatores estimuladores (RANKL, TNF α , IL33 e Catpsk K) e inibidor (OPG) da osteoclastogênese, como a relação entre eles, no desenvolvimento e evolução do Cisto Radicular (CR) e Granuloma Perioapical (GP). Foram utilizados 30 CRs e 22 GPs, dos quais, cortes parafinados foram submetidos à imunistoquímica pela técnica da imunoperoxidase. As proteínas estudadas mostraram imunopositividade tanto no epitélio e cápsula dos CRs, quanto no tecido conjuntivo dos GPs. Nos CRs houve diferença na expressão dos fatores osteoclastogênicos estudados ($p=0,000$), sendo a menor positividade obtida pela OPG. Para os GPs, diferença estatisticamente significativa na imunopositividade, também foi observada ($p=0,000$) e o RANKL mostrou a menor positividade. Ao comparar a expressão imunistoquímica de todas as proteínas entre CRs e GPs, somente a OPG apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,000$). Não foi observada correlação estatisticamente significativa da expressão imunistoquímica das proteínas estudadas com os parâmetros clinicomorfológicos: tamanho da lesão periapical e intensidade do infiltrado inflamatório ($p >0,05$). O RANKL, TNF α , IL33 e Catps K participam do desenvolvimento e reabsorção óssea dos CRs e GPs. A OPG teve participação distinta, sendo mais evidente nos GPs, implicando em menor crescimento quando comparado aos CRs.

PALAVRAS-CHAVE: reabsorção óssea, lesão periapical crônica, citocinas

ABSTRACT

Chronic periapical lesions (CPLs) are considered frequent pathologies in the oral cavity, result of dental caries, tooth fracture, iatrogenic or other circumstances that lead to pulp contamination. The expansion of CPLs is associated with the involvement of inflammatory cells, which release stimulating factors in osteolytic activity as RANK (activator of nuclear factor receptor kB) and its RANKL binder, as well as inhibitors such as OPG (osteroprogerin) and other inflammatory cytokines such as TNF α (tumor necrosis factor alpha), IL33 (Interleukin 33) and Cathepsin K (Catps K). The purpose of this study was to investigate the participation of stimulating factors (RANKL, TNF α , IL33 and Catps K) and inhibitor (OPG) of osteoclastogenesis, such as the relationship between them in the development and evolution of the Radicular Cyst (CR) and Periapical Granuloma (GP). A total of 30 RCs and 22 PGs, of which paraffin sections subjected to immunohistochemistry by the technique of imunoperoxidase. The proteins studied showed immunoreactivity in both the epithelium and capsule of RCs, as the connective tissue of PGs. In the RCs were differences in the expression of osteoclastogenic factors studied ($p = 0.000$), with the smallest positive expression obtained by OPG. For PGs was also observed statistically significant difference in immunoreactivity ($p=0.000$) and RANKL showed lower positivity expression. When comparing the immunohistochemical expression of all proteins between RCs and PGs, only the OPG showed a statistically significant difference ($p=0.000$). There was no statistically significant correlation of immunohistochemical expression of the proteins studied with clinical and morphological parameters: size of apical periodontitis and intensity of the inflammatory infiltrate ($p > 0.05$). RANKL, TNF α , IL33 and Catps K participate in the development and bone resorption of RCs and PGs. OPG had distinct participation, being more evident in PGs, implying lower growth compared to CRs.

KEYWORDS: bone resorption, chronic apical periodontitis, cytokines

1 INTRODUÇÃO

As lesões periapicais crônicas (LPCs) são patologias inflamatórias comumente encontradas nos maxilares, decorrentes de contaminação bacteriana na polpa dental e de suas endotoxinas na região de periápice dentário. Esta invasão bacteriana pode ser decorrente de lesões de cárie, fraturas dentárias, iatrogenia assim como de outras circunstâncias que permitam a contaminação pulpar e, posteriormente, do tecido periapical (GRAVES *et al.*, 2011; ARAUJO-PIRES *et al.*, 2014). Como consequência da inabilidade do mecanismo de defesa do hospedeiro em erradicar a infecção, ocorre a destruição dos tecidos mineralizados na região de ápice e tecidos circunvizinhos (GAZIVODA *et al.*, 2009; RECHENBERG *et al.*, 2014).

Inicialmente, observa-se o afluxo de fagócitos e ativação de leucócitos polimorfonucleados, estimulando a migração de macrófagos e linfócitos (T e B) (GAZIVODA *et al.*, 2009; RECHENBERG *et al.*, 2014; HAO *et al.*, 2015). Esta resposta inflamatória envolve o recrutamento e ativação de células imunocompetentes da resposta imune inata e adaptativa. Desencadeia a produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, alguns envolvidos no processo de osteoclastogênese, gerando o estabelecimento e expansão de lesões osteolíticas como granuloma periapical (GP), cisto radicular (CR) e cisto radicular residual (CRR) (GRAVES *et al.*, 2011; HENRIQUES *et al.*, 2011).

Microscopicamente, essas lesões periapicais representam estágios distintos do processo inflamatório, sendo o GP caracterizado por tecido conjuntivo vascularizado e cronicamente inflamado, que se assemelha a uma reação de granulação, o CR pode se desenvolver a partir de um GP e caracteriza-se pela presença de uma cavidade patológica revestida por epitélio devido à proliferação de restos epiteliais de Malassez (PEIXOTO e PEIXOTO, 2012). Pode ocorrer ainda pela persistência da lesão periapical, quando o tecido inflamatório não é completamente curetado durante a exodontia de um dente acometido por CR, desenvolvendo-se o CRR (SCHULZ *et al.*, 2009).

A reabsorção óssea que ocorre nestas patologias aparece como um fator determinante à expansão destas lesões, sendo iniciada pela proliferação de células precursoras osteoclásticas imaturas e diferenciação das mesmas em células osteoclásticas maduras que promovem a degradação dos componentes ósseos orgânicos e inorgânicos. Os osteoclastos são células derivadas de monócitos/macrófagos e sua diferenciação é regulada principalmente pelos seguintes fatores: M-CSF (fator estimulante de colônia de macrófagos), RANK (receptor ativador do fator nuclear κ B), seu ligante RANKL e OPG (osteoprotegerina) (MENEZES *et al.*, 2006; MENEZES *et al.*, 2008).

RANK, RANKL e OPG são moléculas-chave reguladoras da atividade biológica dos osteoclastos e metabolismo ósseo. A presença do RANKL ativará seu receptor RANK, que estimulará a diferenciação dos precursores dos osteoclastos. Em contrapartida, o receptor OPG se liga ao RANKL, bloqueando a ligação RANK/RANKL, inibindo a diferenciação dos osteoclastos e conseqüentemente a reabsorção óssea (SILVA e BRANCO, 2011; MORAES *et al.*, 2011; RECHENBERG *et al.*, 2014).

Pesquisas preliminares demonstraram que a razão entre RANKL/OPG e entre outros mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios determinam a estabilização ou progressão das lesões inflamatórias crônicas, sendo a patogenicidade delas influenciadas também por várias citocinas (GRAVES *et al.*, 2011; ARAÚJO-PIRES *et al.*, 2014).

De acordo com estudos prévios (SILVA e BRANCO, 2011; RONG *et al.*, 2011; ARAÚJO-PIRES *et al.*, 2014), a descoberta do papel da tríade RANK/RANKL/OPG e de outras citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina 33 (IL33) e mais recentemente a Catepsina K (Catps K), poderá contribuir para o maior entendimento da participação desses fatores de forma direta ou indireta na osteoclastogênese de diversas patologias.

Sabendo-se do papel central que o RANK, RANKL e OPG apresentam no processo de reabsorção óssea, pode-se inferir que outras moléculas que atuem sobre a síntese das mesmas provavelmente apresentem papéis igualmente importantes neste processo. Considerando que ainda há poucos estudos referente à participação da IL 33 e Catps K em lesões periapicais, bem como a relação entre estas proteínas e RANKL/OPG, este trabalho se propõe investigar a participação destes fatores estimuladores e inibidores da osteoclastogênese no desenvolvimento e expansão dos GPs e CRs. Dessa forma, será possível contribuir para uma maior compreensão sobre a patogênese e envolvimento destes fatores no processo de reabsorção óssea destas lesões.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS : Aspectos Gerais

2.1.1 Granuloma Periapical

O Granuloma Periapical (GP) é uma lesão de longa duração que se desenvolve na região periapical de um dente desvitalizado, caracterizada pela presença de tecido cronicamente inflamado que se assemelha a uma reação de granulação. Ele representa uma reação secundária e defensiva do hospedeiro na tentativa de conter o processo infeccioso (PEIXOTO e PEIXOTO, 2011).

Estas lesões ocorrem a partir de uma sequência de injúrias à polpa dental, incluindo infecção, traumas físicos e iatrogênicos e após o insucesso do tratamento endodôntico (NAIR, 2006; SAFI *et al.*, 2008; GRAUNAITE *et al.*, 2011, PEIXOTO e PEIXOTO, 2011).

O GP é a periapicopatia crônica mais frequente. Garcia *et al.*(2007), comparando 9 trabalhos publicados, verificaram que a ocorrência de granulomas periapicais variou de 9,3% a 87,1%na população espanhola.De acordo com Neville *et al.*(2011), os granulomas representam 75% das lesões periapicais. Com relação aos dados demográficos, segundo Safi *et al.*(2008) na população do Irã, a maior incidência da lesão ocorre na terceira década de vida, comprometendo duas vezes mais os indivíduos do sexo masculino do que o feminino e sendo mais frequente na maxila.

A maioria dos granulomas periapicais é assintomático e geralmente diagnosticado durante exames radiográficos de rotina. Radiograficamente, observa-se área osteolítica, podendo ser lesões pequenas, quase imperceptíveis, até imagens radiolúcidas excedendo 2,0 cm de diâmetro. Pode ser bem circunscrita ou mal definida e ter ou não halo radiopaco (RICUCCI *et al.*,2006).

Microscopicamente, a lesão caracteriza-se por um tecido conjuntivo cronicamente inflamado e vascularizado, lembrando um tecido de granulação,

circundado por uma faixa de tecido conjuntivo mais fibroso e menos celularizado. A área granulomatosa apresenta uma variedade de células inflamatórias, tais como linfócitos, plasmócitos, histiócitos, neutrófilos e em menor número, mastócitos e eosinófilos (OMOREGIE *et al.*,2011). É possível, ainda observar glóbulos eosinófilos de gamaglobulina dispersos, denominados de corpúsculos de Russel e agregado de partículas levemente basofílicas, os corpúsculos de pironina em associação ao infiltrado plasmocitário (NEVILLE *et al.*,2011). Cristais de colesterol podem ser encontrados associados a áreas de extravasamento de hemácias, circundados por células gigantes e macrófagos, os quais favorecem a reabsorção óssea (GARCIA *et al.*,2007).

Eventualmente, é possível encontrar ilhotas de células epiteliais, provenientes dos restos epiteliais de Malassez, que podem variar em tamanho (GARCIA *et al.*,2007), sendo tais lesões denominadas de granulomas epitelizados. No entanto, cavidade patológica é ausente nesses casos e estes representariam, possivelmente, um estágio de transição entre GP e CR (NOBUHARA e DEL RIO, 1993; RICUCCI *et al.*, 2006).

Diante do seu potencial dinâmico de transformação, os GPs podem se transformar em abscessos ou cistos radiculares, sem sinais de alterações radiográficas. No caso de transformação em CR, apenas o exame histopatológico poderá estabelecer o diagnóstico definitivo (NEVILLE *et al.*,2011).

A terapêutica indicada é o tratamento ou retratamento endodôntico e mais recentemente, com as novas técnicas de regeneração periapical e engenharia tecidual, a revascularização tecidual está sendo uma outra opção de escolha (TROPE, 2010; RAJU *et al.*,2014). Sabe-se, porém, que a alta complexidade do sistema de canais radiculares e a presença de microbiota externa à raiz, na região de ápice, poderá implicar na persistência dos sinais e sintomas, levando a um prognóstico desfavorável, podendo ser indicado a

cirurgia de curetagem e ou apicectomia para a remoção da lesão periapical (NAIR, 2011; GARCIA *et al.*, 2007; RICUCCI *et al.*, 2014).

2.1.2 Cisto Radicular

O cisto radicular (CR), também denominado de cisto periapical, periodontal apical ou perirradicular, é classificado como cisto odontogênico de natureza inflamatória, segundo a Organização Mundial de Saúde (KRAMER, PINDBORG e SHEAR, 1992). Representam as lesões císticas mais comumente encontradas nos maxilares, compreendendo de 38% a 72% de todos os cistos odontogênicos diagnosticados (GROSSMANN *et al.*, 2007; OCHSENIUS *et al.*, 2007; PROCKT *et al.*, 2008).

É considerado como lesão de natureza inflamatória que se desenvolve a partir de um GP preexistente (REGEZZI *et al.*, 2008; NEVILLE *et al.*, 2011). Nesta perspectiva, embora os mecanismos envolvidos no processo de crescimento e expansão das lesões periapicais ainda não sejam totalmente conhecidos, um CR é considerado como uma sequência direta do GP, embora um GP não evolua necessariamente para um CR (NAIR, 1998).

A formação do CR está relacionada à proliferação de restos epiteliais quiescentes, provenientes dos restos epiteliais de Malassez presentes no ligamento periodontal, além de outras fontes prováveis, tais como o epitélio crevicular, o revestimento sinusal e o revestimento epitelial dos trajetos fistulosos (NEVILLE *et al.*, 2011). Os restos epiteliais proliferam, provavelmente, sob influência de endotoxinas bacterianas, citocinas pró inflamatórias e fatores de crescimento liberados durante a inflamação perirradicular (LIN *et al.*, 2007).

De acordo com a literatura consultada, a faixa etária mais acometida está entre a segunda e quarta década de vida e a lesão ocorre preferencialmente na maxila anterior (GARCIA *et al.*, 2007; PROCKT *et al.*, 2008). Quanto ao

gênero, Prockt *et al.* (2008) e Garcia *et al.* (2007), relataram o predomínio do sexo masculino.

Geralmente, os CRs são assintomáticos, a menos que exista agudização do processo inflamatório. Neste caso, pode haver tumefação, sensibilidade leve, possível mobilidade dentária e deslocamento dos dentes adjacentes (DANDODIKAR *et al.*, 2013).

Radiograficamente, apresenta o mesmo padrão dos GPs. Observa-se perda da lâmina dura ao longo da raiz adjacente e uma imagem radiográfica radiolúcida arredondada, de tamanho variado, relacionada ao ápice do dente acometido. Comumente, são detectadas apenas no exame radiográfico de rotina e diagnosticadas após exame histopatológico, quando indicado (DANDODIKAR *et al.*, 2013).

Histopatologicamente, o CR é formado por uma cavidade patológica revestida por epitélio pavimentoso estratificado, geralmente não queratinizado e de espessura variada (GARCIA *et al.*, 2007; PROCKT *et al.*, 2008; DANDODIKAR *et al.*, 2013). Subjacente, observa-se uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso e vascularizado, sede de células inflamatórias predominantemente mononucleares (GARCIA *et al.*, 2007). O epitélio cístico pode apresentar calcificações lineares ou em forma de nódulos, os corpúsculos de Rushton. Calcificações distróficas, cristais de colesterol associados a células gigantes multinucleadas e corpos hialinos representados por anéis ou massas ovoides, eosinofílicas e amorfas, podem ser achados ocasionalmente observados (GARCIA *et al.*, 2007; REGEZZI *et al.*, 2008).

Garcia *et al.* (2007) preconizaram que o tratamento de um CR deverá se iniciar pelo protocolo endodôntico e caso não haja reparo biológico com redução radiográfica da lesão, pode se tentar o retratamento endodôntico não cirúrgico. Lesões maiores que 2,0 cm podem ser tratadas através de procedimentos cirúrgicos de marsupialização, descompressão ou fenestração.

A biópsia é indicada para afastar outras possíveis patologias (NEVILLE *et al.*, 2011).

As lesões periapicais crônicas são caracterizadas pela ocorrência de destruição óssea resultante da resposta imune-inflamatória do hospedeiro a infecções bacterianas oriundas do canal radicular. Além das toxinas bacterianas, mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e proteases induzidas e ativadas por estes mediadores são continuamente liberados nas proximidades do osso alveolar, podendo levar a reabsorção óssea e a substituição por um tecido conjuntivo inflamado (LOYOLA *et al.*, 2005). Estas substâncias parecem desempenhar um papel importante na expansão das lesões periapicais, uma vez que estão associadas à ativação de osteoclastos atuantes no processo de remodelação óssea (MUGLALI *et al.*, 2008)

2.2 REMODELAÇÃO ÓSSEA

2.2.1 Considerações Gerais

A natureza dinâmica do esqueleto resulta de um processo denominado remodelação óssea, que acontece constantemente no osso cortical e trabecular. A remodelação tem início com o processo de reabsorção (catabólico), seguido por fases de reversão e de formação óssea (anabólico).

Estes eventos resultam na substituição do osso antigo por novo osso. Fisiologicamente, o tecido ósseo é continuamente reabsorvido e remodelado, devido à necessidade de se manter constante o volume ósseo e homeostase de cálcio (SIMS e GOOI, 2008; KOBAYASHI *et al.*, 2009).

Este conjunto sequencial é controlado sutilmente pelas atividades celulares de osteoclastos, osteoblastos e osteócitos que se encontram na periferia e interior da matriz (SIMS e GOOI, 2008; HUANG *et al.*, 2014). Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas da linhagem dos monócitos/macrófagos e são responsáveis pela reabsorção das matrizes

mineralizadas (XIONG *et al.*, 2012; FUJIOKA *et al.*, 2014). Uma característica morfológica importante dos osteoclastos é a sua superfície voltada para o tecido ósseo, a qual apresenta projeções irregulares, favorecendo sua ligação a matriz. Circundando essa área, existe uma região citoplasmática, denominada de zona clara, onde estão presentes filamentos de actina, poucas organelas, colagenases e hidrolases que atuam localmente digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de sais de cálcio (KOBAYASHI *et al.*, 2009). Osteoblastos são células mononucleares responsáveis pela deposição de matriz óssea, produzindo fosfato de cálcio, que será convertido em hidroxiapatita e a matriz orgânica formada principalmente por colágeno tipo I e ainda estão envolvidos na regulação dos osteoclastos (SILVA e BRANCO, 2008; HAMBLI, *et al.*, 2014; FUJIOKA *et al.*, 2014). Osteócitos são células diferenciadas derivadas dos osteoblastos e representam 90% das células ósseas na matriz óssea. São completamente envolvidos por matriz óssea mineralizada durante a formação e seus prolongamentos dentríticos são as únicas formas de se conectarem com outras células, incluindo osteócitos adjacentes, mergulhados na matriz e os osteoblastos na superfície óssea (HOMMA *et al.*, 2014; BELLIDO, 2014).

O ciclo de remodelação pode ser dividido em quatro etapas: ativação, reabsorção, reversão e formação (SIMS e GOOI, 2008). A princípio, uma superfície óssea é ativada por fatores osteoclastogênicos, atraindo da circulação os pré-osteoclastos, que se diferenciam em osteoclastos, iniciando o processo de reabsorção desta superfície. Estes são removidos desta superfície através da morte celular programada ou apoptose. A superfície óssea é colonizada por precursores osteoblásticos (fase de reversão), que posteriormente se transformam em osteoblastos maduros, iniciando a síntese da matriz óssea. Após longo período de formação óssea, a superfície óssea volta a forma quiescente, através da apoptose dos osteoblastos ou a sua transformação em osteócitos (KEARNS *et al.*, 2008; PROFF *et al.*, 2009).

A propriedade mais significativa deste processo de remodelação é provavelmente a comunicação eficiente entre osteoclastos e osteoblastos.

Esta atividade coordenada permite manter o formato e estrutura óssea sem alterações durante a vida, a despeito do processo cíclico de reabsorção e formação que o tecido ósseo é submetido (DELAISSE, 2014). Esta coordenação eficiente e prolongada é descrita como Unidade Multicelular Básica (HAMBLI, 2014). Dentro desta unidade, a atividade celular é compensada, seguindo um princípio de que a quantidade de osso destruído por osteoclastos será igual a quantidade de osso formado pelos osteoblastos (SIMS e GOOI, 2008; DELAISSE, 2014).

O desequilíbrio entre o processo de reabsorção e formação óssea, quando favorece o aumento da atividade dos osteoclastos, poderá causar desordens ósseas, incluindo osteoporose, doença óssea de Paget, artrite reumatóide, tumores ósseos primários e metástase óssea (XIONG *et al.*, 2012; HAMBLI, 2014). Durante o processo fisiológico, a dupla de eventos reabsorção e formação são reguladas por fatores físicos e por polipeptídeos, como hormônios e citocinas.

Muitos progressos foram alcançados ao longo da última década, na tentativa de entender os mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação dos osteoclastos, através da descoberta de citocinas envolvidas na osteoclastogênese. Como exemplo tem-se a tríade RANK/RANKL/OPG que são reconhecidas como reguladoras centrais do processo de diferenciação dos osteoclastos (KOBAYASHI *et al.*, 2009).

2.2.2 Fatores Osteoclastogênicos

2.2.2.1 Sistema RANK/RANKL/OPG

A reabsorção óssea é orquestrada a partir da ação de receptores e ligantes relacionados à grande família TNF (Fator de Necrose Tumoral), representados pelas proteínas RANK (Receptor Ativador Nuclear kB), RANKL (Ligante do Receptor Ativador Nuclear kB) e OPG (Osteoprotegerina) (RECHENBERG *et al.*, 2014).

A tríade RANK/RANKL/OPG é representada por moléculas chave reguladoras do processo de remodelação óssea e são essenciais no desenvolvimento e ativação do processo de osteoclastogênese, tendo papel decisivo no equilíbrio entre reabsorção e formação óssea (MENEZES *et al.*, 2006; GINER *et al.*, 2009; RONG *et al.*, 2011).

O RANK é uma proteína com 616 aminoácidos, sendo expressa pelo gene TNFRSF11a, sendo encontrado na membrana de células precursoras dos osteoclastos e quando ativadas, promovem e orientam a diferenciação destes, aumentando sua atividade celular, como também retardando o seu processo de apoptose (MENEZES *et al.*, 2006; TYROVOLA *et al.*, 2008; GINER *et al.*, 2009; TEKKESIN *et al.*, 2011; GUERRINI *et al.*, 2014).

O RANKL também conhecido como OPGL (ligante da osteoprotegerina) ou ODF (fator de diferenciação dos osteoclastos) é um polipeptídeo codificado pelo gene TNFSF11 com 317 aminoácidos (TYROVOLA *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2014; GUERRINI *et al.*, 2014), se apresentando em duas formas: ligada a membrana (a mais comum), com 40-45 kDa e a forma solúvel, com 31kDa (TELLTELBAUM, 2000; KHOSLA, 2001). Ele foi descoberto em 1998, sendo considerada a mais importante citocina, atuando como indutor fisiológico da osteoclastogênese, onde se liga diretamente ao RANK na superfície celular dos pré-osteoclastos e osteoclastos. Ao ativar o RANK, participa ativamente no processo de maturação e desenvolvimento destas células (MENEZES *et al.*, 2006; GINER *et al.*, 2009; BRAUN *et al.*, 2012; RECHENBERG *et al.*, 2014).

RANKL é expresso por osteoblastos, fibroblastos, linfócitos T e B e macrófagos (GUERRINI *et al.*, 2014). Segundo Honma *et al.* (2014) estudos recentes sugerem que os osteócitos são fonte principal de RANKL em processos patológicos e fisiológicos da osteoclastogênese. Osteócitos irão fornecer RANKL aos precursores de osteoclastos através de interação direta de suas extremidades dendríticas. Em contrapartida, o papel de RANKL com os osteoblastos ainda não está claro e precisa ser elucidada.

Osteoprotegerina (OPG) é uma proteína solúvel, membro da família TNF e é representado por 380 aminoácidos, expressa pelo gene TNFRSF11b. Ela funciona como receptor e tem propriedades antagônicas ao RANKL porque age como inibidor ao interagir com alta afinidade com o RANKL, impedindo sua ligação ao RANK, levando assim, a diminuição da osteoclastogênese (MENEZES *et al.*, 2006; TEKKESIN *et al.*, 2011; GUERRINI *et al.*, 2014). Como o RANKL, a OPG é modulada por citocinas inflamatórias (COCHRAN, 2008). A OPG é expressa por osteoblastos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais (KUNTZ *et al.*, 2001; MENEZES *et al.*, 2006; BOYCE *et al.*, 2007; GINER *et al.*, 2009).

Desequilíbrios na proporção RANKL/OPG constituem a base de diversas patologias, locais ou sistêmicas, que se caracterizam pela reabsorção do tecido ósseo (ANANDARAJAH, 2009; LAMOUREUX *et al.*, 2010). Alterações na expressão de RANKL e OPG, decorrentes de um aumento nos níveis de RANKL ou de uma diminuição nos níveis de OPG, podem resultar no estímulo da atividade osteoclástica e, conseqüentemente, a reabsorção óssea (BOYCE e XING, 2008; COCHRAN, 2008; ANANDARAJAH, 2009). Evidências provenientes de estudos em processos patológicos variados, como osteólise periprotética (WANG *et al.*, 2010), artrite reumatóide (AINOLA *et al.*, 2008), talassemia (SKORDIS *et al.*, 2008), mieloma múltiplo (GORANOVA - MARINOVA *et al.*, 2007), metástases tumorais (CANON *et al.*, 2008), doença periodontal (RECHENBERG *et al.*, 2014) e periodontite apical (RONG *et al.*, 2011) sugerem que a proporção RANKL/OPG constitui um fator importante no processo de reabsorção óssea.

O RANK, RANKL e OPG parecem estar intimamente relacionados com infiltrado inflamatório em lesões periapicais crônicas (RONG *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2013). Um estudo realizado por Armada *et al.* (2015), avaliou a distribuição da expressão destes reguladores da reabsorção óssea em cistos radiculares. Os resultados demonstraram que o tipo de infiltrado inflamatório presente nos CRs, parece influenciar a expressão de RANK,

RANKL e OPG. O infiltrado crônico esteve associado a um aumento da atividade osteolítica.

De Moraes *et al.* (2011) desenvolveram um estudo onde o objetivo foi avaliar a participação dos fatores osteoclastogênicos, RANK, RANKL e OPG, na expansão de cistos odontogênicos. Foram realizadas análises imunoistoquímicas da expressão proteica destes fatores tanto no epitélio como na cápsula fibrosa em 40 cistos (20 cistos inflamatórios e 20 cistos dentígeros). Os resultados sugeriram que a relação entre RANKL e OPG na cápsula cística estava associada com as diferentes etapas de progressão da lesão. Embora nenhuma relação significativa ($p > 0,05$) tenha sido encontrada neste estudo, houve casos que pareceu haver equilíbrio homeostático ($OPG = RANKL$) e alguns casos onde houve mínima atividade osteoclástica ($OPG > RANKL$). Estes autores acreditam que a relação entre RANKL/OPG seria mais desfavorável no início da formação da cavidade cística. Por outro lado, no epitélio, houve aumento da concentração de OPG comparada a de RANKL, que segundo estes autores, a OPG terá função de criar uma barreira contra a expansão cística.

Belibasaki *et al.* (2013) conduziram uma revisão sistemática relacionada a RANKL e/ou OPG na polpa dentária e em doenças periapicais no período entre 1948 e 2011. Foram utilizadas as bases de dados da Medline, Biosis, Cochrane, Embase e Web Sciences. Os autores concluíram que há relativamente escassez de informação disponível que enfatize a participação específica do RANKL e OPG na polpa dentária e em lesões periapicais. Constataram também que a OPG pode agir de forma protetora contra a reabsorção radicular interna e que se a razão entre RANKL e OPG estiver crescente, poderá estar indicando a presença de um processo de reabsorção óssea.

Amostras de lesões periapicais e tecidos periapicais saudáveis foram analisados imunoistoquimicamente para detecção de expressão RANKL e OPG por Rong *et al.* (2011). Os resultados demonstraram que o número de

células positivas para RANKL e a relação RANKL/OPG em lesões periapicais são maiores do que as encontradas em tecidos periapicais saudáveis.

Um estudo feito em ratos (LIU e PENG 2013), onde foram feitas análises histológicas, histoquímica, imunoistoquímica e imunofluorescência, constatou-se que fatores inibidores de macrófagos, que são citocinas-chaves na regulação da imunidade inata e adaptativa, podem também estar associados à diferenciação dos osteoclastos em lesões periapicais. Estes fatores parecem contribuir na patogênese da periodontopatia através da indução do RANKL.

Garlet *et al.* (2010), em um estudo com ratos com lesões periapicais induzidas, sugeriram que na cinética destas lesões em desenvolvimento, o efeito do aumento da concentração de RANKL só iria influenciar o aumento do número de osteoclastos, sete dias após o início do processo. Segundo estes autores, uma possível justificativa para este espaço de tempo, seria o período necessário para os pré-osteoclastos se diferenciarem em osteoclastos, quando o processo de reabsorção óssea teria início.

Menezes *et al.* (2006) em um estudo com humanos constataram que o aumento da razão RANKL/OPG está diretamente relacionada ao processo de destruição óssea em cistos e granulomas periapicais. Demonstraram, ainda, que há expressão de RANK, RANKL e OPG no epitélio de revestimento da parede de cistos odontogênicos, incluindo os cistos radiculares.

A expressão de RANK, RANKL e OPG é sistematizada direta ou indiretamente por citocinas pró-inflamatórias, tais como IL1, IL6, IL11, IL17, IL33, TNF α , fator inibidor de leucemia e Oncostatin M, regulando a osteoclastogênese e envolvendo uma relação íntima entre inflamação e perda óssea, atuando de forma crucial na resposta imune e inflamatória. Elas poderão induzir a diferenciação dos osteoclastos, aumentando a expressão de RANKL e diminuindo a de OPG. Antagonicamente, há a presença de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL10 e IL13, que também irão gerir a

expressão de RANKL e OPG, diminuindo o primeiro e estimulando o segundo (BRAUN e SCHETT, 2012; CHEN *et al.*, 2014).

2.2.2.2 Citocinas Inflamatórias

Lesões periapicais normalmente resultam de uma resposta inflamatória persistente, estimulada pela exposição contínua a agentes bacterianos, desencadeando uma resposta imunológica tanto inata como adaptativa. Durante este período em que há “reserva bacteriana”, principalmente bactérias Gram-negativas, dentro do sistema de canais radiculares, haverá liberação de citocinas inflamatórias e outros mediadores como quimiocinas, prostaglandinas e leucotrienos aos tecidos periapicais. Estes mediadores irão reforçar o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares e outros leucócitos, criando atividades mediadoras tanto de proteção como destruição óssea (PRSO *et al.*, 2007; HENRIQUES *et al.*, 2011; GRAVES *et al.*, 2011; MACIEL *et al.*, 2012).

Citocinas inflamatórias ou interleucinas são proteínas solúveis que possuem um papel importante na resposta imune, iniciando e coordenando eventos celulares, regulando a resposta do hospedeiro às endotoxinas, estimulando a reabsorção óssea através da Interleucina I α e β , TNF α ou IL6 e inibindo o processo inflamatório, como a IL10. As citocinas são secretadas por uma variedade de células, como monócitos, células dendríticas, linfócitos neutrófilos, células endoteliais e fibroblastos (GÓRSKA *et al.*, 2003; MACIEL *et al.*, 2011; GRAVES *et al.*, 2011).

De acordo com conceitos atuais, células CD4+ e T helper (Th) possuem 4 subtipos: Th1, Th2, Th17 e Treg. A resposta imune tipo 1 é caracterizada pela produção de IFN γ , TNF α e IL1, estando envolvidos na progressão, reabsorção e remodelação óssea em lesões periapicais. Ao contrário destas, mecanismos imunossupressores mediados por Treg e Th2, produzem

citocinas que são responsáveis por cicatrização tecidual, restringindo o mecanismo imune inflamatório (HENRIQUES *et al.*, 2011).

Como esperado, as citocinas inflamatórias diante da inabilidade do hospedeiro em debelar a invasão bacteriana, tendem a estimular a formação e crescimento de lesões osteolíticas como granulomas periapicais e cistos radiculares, mesmo com a presença antagônica de citocinas anti-inflamatórias (TEIXEIRA-SALUM *et al.*, 2010).

Muglali *et al.* (2008) realizaram um estudo para analisar concentrações de TNF α , IL1 α , pelo método ELISA no fluido cístico aspirado de 21 pacientes (11 cistos radiculares e 10 cistos residuais). Constatou-se que tanto nos fluidos císticos dos cistos radiculares como nos residuais houve presença de TNF α e IL1 α , havendo diferença estatística entre as lesões, sendo maior no cisto radicular em comparação como o cisto residual ($p < 0,001$). Os autores chegaram à conclusão que nos cistos residuais há um certo grau de inflamação, embora em menor extensão quando comparados aos cistos radiculares, porém, existindo potencial para expansão da lesão.

Gazivoda *et al.* (2009) isolaram células inflamatórias em 67 lesões periapicais humanas, sendo cultivadas por 24 horas. Os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL1 β , IL6, IL8 e TNF α) e citocinas imunoreguladoras (TGF β e IL10) foram determinados em cultura. Concluiu-se que lesões sintomáticas são caracterizadas pela alta produção de citocinas pró-inflamatórias e as citocinas imunoreguladoras são mais importantes na supressão de inflamação em lesões assintomáticas.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF α) é o principal membro da superfamília do TNF, possui um papel importante no início e coordenação dos eventos celulares que irão fazer parte do sistema de resposta imunológica contra o processo infeccioso, estando relacionado com reabsorção óssea, particularmente em doenças ósseas inflamatórias crônicas (LAM *et al.*, 2000).

TNF α é um mediador pró-inflamatório secretado por macrófagos, monócitos, fibroblastos e células NK (KOBAYASHI *et al.*, 2000; PRSO *et al.*, 2007; JURISIC *et al.*, 2008). Ele irá estimular a osteoclastogênese de forma independente, como também estimulará a expressão de RANKL junto com outras citocinas, como IL1 e IL6 (KITAURA *et al.*, 2013).

De forma alternativa, na presença do TNF α , a diferenciação dos osteoclastos poderá ser induzida pelo RANKL em baixa concentração, onde o TNF α irá potencializar a ação do RANKL (KITAURA *et al.*, 2013). Segundo Lamet *al.* (2000) em um estudo *in vitro*, concluíram que uma população de precursores de osteoclastos não conseguiram completar a osteoclastogênese quando tratados somente com a presença de TNF α . Em contraste, esta citocina estimulou drasticamente a diferenciação dos macrófagos com menos de 1 % da quantidade de RANKL necessário para a indução da formação dos osteoclastos.

TNF α exibe propriedades biológicas pela ligação com dois receptores de alta afinidade (TNFR1 e TNFR2), com tamanhos moleculares de 55 kDa e 75 kDa (NIKOLOPOULOS *et al.*, 2008). Ambos podem traduzir sinais intracelulares que estimulam a quebra proteolítica de I κ B, um inibidor citoplasmático do NF κ B. O NF κ B ativado é então translocado para o núcleo, onde induz a transcrição de vários genes responsivos ao TNF α . Além disso, a ligação do TNF α ao seu receptor TNFR1 desencadeia a morte celular programada em muitas células. Este processo depende da presença do "domínio de morte", localizado na região citoplasmática de TNFR1, que é ausente em TNFR2 (KOBAYASHI *et al.*, 2000).

O insucesso do tratamento endodôntico é frequentemente causado pela persistência de microrganismos dentro do sistema de canais. Sabendo deste fato, Henriques *et al.* (2011) fizeram um estudo pra determinar se havia RNAm de TNF α expresso em lesões periapicais refratárias comparando com um grupo controle (tecido vital pulpar). Os resultados demonstraram diferença significativa entre os níveis de RNAm de TNF α , quando comparados ao grupo

controle. Conclui-se que há um aumento importante na expressão de TNF α em lesões periapicais refratárias, sugerindo que citocinas pró-inflamatórias possuem papel importante neste tipo de lesões.

Em um estudo, Prso *et al.* (2007), demonstraram alta concentração de TNF α em todas as lesões periapicais coletadas, sem diferença estatística entre lesões sintomáticas e assintomáticas. Ainda encontraram pouca concentração deste em tecidos saudáveis, demonstrando claramente, que o TNF α é um potente e importante mediador no processo de reabsorção óssea.

Jurisc *et al.* (2008) investigaram a concentração do TNF α em 43 amostras de cistos radiculares em humanos retiradas de fluído cístico obtidos após procedimento cirúrgico. O objetivo deste estudo foi o de correlacionar valores de TNF α , dependendo da contagem de células inflamatórias e grau de vascularização nos cistos radiculares. O resultado demonstrou a presença de alta concentração de TNF α associado aos menores cistos, como também de proteínas e células inflamatórias no conteúdo cístico. Estes autores acreditam que a determinação de TNF α em fluído cístico simultaneamente com outros parâmetros pode ser ferramenta auxiliar importante ao diagnóstico clínico.

Segundo Teixeira-Salum *et al.* (2010), em um estudo com 17 cistos radiculares e 30 granulomas periapicais em humanos, observou-se alto grau de citocinas inflamatórias, como TNF α , nos cistos radiculares, comparados aos granulomas periapicais. Os resultados demonstraram também altas concentrações de TNF α , IFN γ relacionados à presença de edema tecidual, sugerindo participação destes na reação inflamatória aguda.

Em 1999, foi identificada outra citocina pró-inflamatória, membro da família da Interleucina1 (IL1), denominada de Interleucina 33 (IL33) (VILLARREAL *et al.*, 2014; CAYROL e GIRARD, 2014). Primeiramente, a IL33 foi descoberta como um fator nuclear presente em células endotélias e

epiteliais, sendo mais tarde, identificada como ligante extracelular funcional do receptor de membrana ST2 (LEFRANÇAIS e CAYROL, 2012; VILLARREAL e WEINER, 2014; CAYROL e GIRARD, 2014; DA LUZ *et al.*, 2014).

O receptor ST2 é expresso por várias células de defesa com linfócitos Th2, NK, mastócitos e células de linhagem mielóide (monócitos, células dendríticas e granulócitos). A IL33 irá se ligar ao receptor ST2 e juntos irão promover tanto resposta imunológica Th1 como Th2, dependendo do tipo de célula ativadora como também do microambiente onde está ocorrendo o dano tecidual (MILOVANOVIC *et al.*, 2012; VILLARREAL e WEINER, 2014).

Esta proteína tornar-se altamente atrativa às pesquisas, devido à descoberta que sua principal célula alvo, seria a célula linfóide inata tipo2, envolvida no início da resposta imune em infecções parasitárias e doenças alérgicas, como a asma (LEFRANÇAIS e CAYROL, 2012; MILOVANOVIC *et al.*, 2012).

A IL33 é expressa, predominantemente, na camada epitelial como a primeira linha de defesa contra os patógenos, sendo ativada por células hematopoiéticas, mastócitos, eosinófilos, basófilos, células NK, CD8+, linfócitos e células não hematopoiéticas. Ela irá atuar tanto no núcleo como fora da célula, podendo ser encontrada de duas formas: IL33 completa (pró-IL-33) ou IL33 madura (mtr IL33) (VILLARREAL e WEINER, 2014; CAYROL e GIRARD, 2014). Segundo Da Luz *et al.* (2014), durante a apoptose, a IL33 é retida no núcleo, ocorrendo sua clivagem e a inativação de suas propriedades pró-inflamatórias. Em contrapartida, durante a necrose tecidual, a IL33 será secretada na matriz extracelular e provavelmente irá ter sua função de alarme imunológico, sinalizando o local da injúria. Esta citocina precisa estar presente extracelularmente, para que tenha participação ativa em doenças inflamatórias, infecciosas e autoimunes, incluindo choque anafilático, artrite reumatóide, arteriosclerose, esclerose sistêmica e doenças cardiovasculares.

Saidi *et al.* (2011) investigaram a participação da IL33 no processo de remodelação óssea em amostras de sangue de 3 doadores humanos

saudáveis. Os resultados revelaram que RNAm da IL33 é expresso pelos osteoblastos/osteócitos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, como, também, os adipócitos podem ser fonte de IL33 em medula óssea humana. Neste trabalho, os autores chegaram a constatação que a expressão do RNAm da IL33 parece ser elevada por citocinas como TNF α e IL1 β em células do estroma medular, osteoblastos e células adipócitas. Porém, a IL33 não mostrou efeito sobre estas células ou sobre células precursoras osteoclásticas (CD14) e nenhuma destas células expressou o receptor ST2 em condições basais. Acreditaram então, que a IL33 parece não ter participação direta na remodelação óssea.

Num estudo realizado por Kim e Choi (2012), foram coletadas amostras de sangue de doadores humanos sadios. Monócitos CD14+ foram isolados das células periféricas mononucleares. Inicialmente, eles determinaram se células CD14+ expressavam o receptor ST2 da IL33. O resultado demonstrou que mais de 90% das células apresentavam os receptores em sua superfície. Foi investigado se a ação da IL33 dependeria ou não da ação do RANKL. Os autores observaram que houve uma resposta igual e potente da IL33, estimulando a diferenciação dos osteoclastos, quando sozinha e quando associada à presença do RANKL. É possível que a combinação de tratamento entre IL33 e RANKL leve ao aumento da diferenciação dos osteoclastos. O bloqueio do receptor ST2, resultou na inibição da IL33 e sua ação não foi influenciada pelo bloqueio de OPG ou RANKL, sugerindo que a diferenciação dos osteoclastos pela IL33 parece ocorrer através do receptor ST2, independente da tríade RANK/RANKL/OPG. Eles acreditam que a habilidade da IL33 em estimular a formação de osteoclastos e reabsorção óssea poderá ter implicações terapêuticas nas doenças ósseas inflamatórias.

Segundo alguns autores, mesmo se sabendo que há aumento de concentração de IL33 em processos inflamatórios e alérgicos, mais estudos sobre sua forma de ação e regulação devem ser conduzidos para o desenvolvimento de terapias para doenças inflamatórias e alérgicas (CAYROL e GIRARD, 2014; VILLARREAL e WEINER, 2014).

2.2.2.3 Catepsina K

No ano de 1995, uma nova proteinase de cisteína lisossômica foi identificada, membro da família da papaína, recebendo a denominação de Catepsina K (Catps K). Esta enzima é sintetizada, primeiramente, como uma pro enzima antes de ser transportada para os lisossomos, onde será clivada para transformar-se em enzima ativa. Ela é produzida de forma intensa pelos osteoclastos, atuando em pH ácido e sendo regulada pelo ligante do Receptor Ativador Nuclear kB (RANKL). O RNAm da Catepsina K já foi encontrado em ovário, coração, pulmão, músculos e intestino (GARNERO *et al.*, 1998; GOTO *et al.*, 2003; GAO *et al.*, 2008; FULLER *et al.*, 2010; BONNEN *et al.*, 2012; DUONG, 2012).

Quando comparada às outras catepsinas (B, C, D, E, G e L), a Catps K é a mais secretada e importante protease, participando ativamente na mediação e degradação dos componentes proteicos da matriz óssea, participando ativamente do processo de reabsorção óssea (GOTO *et al.*, 2003; FULLER *et al.*, 2010; DUONG, 2012, GAO *et al.*, 2013).

Na zona de selamento, onde ocorrerá o processo de reabsorção óssea, serão secretados prótons e enzimas lisossomais, que irão formar hemivacúolos digestivos extracelulares. Nestes hemivacúolos, os prótons irão solubilizar os componentes minerais, expondo as fibras colágenas, que correspondem a 90% da matriz óssea orgânica. Uma vez que este colágeno fique exposto, estará disponível para a dissolução pela Catepsina K. A CatpsK destruirá o colágeno tipo 1, não apenas no sítio do telopeptídeo como também em múltiplos sítios de domínio helicoidal (FULLER *et al.*, 2010; LEUNG *et al.*, 2011; JENSEN *et al.*, 2014; HAO *et al.*, 2015).

Tanto em animais como em humanos, a deficiência genética de Catepsina K compromete a reabsorção óssea e pode estar implicada na

osteopetrose. A inibição da ação desta proteína é uma promissora estratégia no tratamento de osteoporose (SHILLING *et al.*, 2007; PENNYPACKER *et al.*, 2009; FULLER *et al.*, 2010; JENSEN *et al.*, 2014). Outra importante ação da Catepsina K, foi sugerida por Yamalik *et al.* (2012), após um estudo feito em humanos, em que a Catps K poderia servir de parâmetro bioquímico para monitorar perda óssea alveolar em pacientes com periodontites e após implantes dentários. Segundo Bonnem *et al.* (2012), quando a Catepsina K apresenta-se ausente ou inibida em ratos, coelhos ou macacos, a formação óssea é mantida ou elevada. Em humanos, segundo estes autores, a inibição desta protease é associada com redução nos marcadores de reabsorção óssea, mas com pequena ou temporária redução nos marcadores de formação óssea.

Em um estudo, feito por Gao *et al* (2013), foram utilizados camundongos, os quais tiveram a expressão gênica da Catps K silenciada, visando bloquear a produção de osteoclastos e reabsorção óssea. Lesões periapicais foram induzidas em primeiros molares inferiores, através de contaminação pulpar com quatro tipos de bactérias. Os resultados demonstraram que, onde houve presença de RNA silenciador, houve mínima imagem radiográfica sugestiva de reabsorção óssea periapical. Em contraste com o grupo controle, onde houve significativa indicação de imagem sugestiva de reabsorção óssea. Estes achados demonstraram que o RNA silenciador de Catps K, reduz o desenvolvimento de lesões de origem endodôntica, conseqüentemente inflamação na região periapical e destruição óssea.

Outro trabalho *in vitro*, realizado por Leung *et al.*(2011), demonstrou a importância da Catps K em relação a sua ação estimuladora da reabsorção óssea. Estes autores utilizaram a Odenacatib (ODN), uma potente e seletiva medicação, utilizada em pacientes do sexo feminino, no período pós menopausa, contra a osteoporose. Este estudo demonstrou que ODN é um inibidor importante na ação da Catps K. Como conclusão, após o uso da ODN, observou-se uma seletiva ação da Catps K sobre os osteoclastos, reduzindo o processo de reabsorção óssea, bloqueando a desmineralização e

degradação do colágeno tipo I nas zonas de reabsorção, como também retardou a transição para futuros processos de degradação proteica. Os osteoclastos mantiveram outras funções importantes, mesmo com a inibição do processo de reabsorção, tais como a formação celular, sobrevivência e polarização destas células, características também observadas por Duong (2012).

Os mecanismos moleculares exatos, associando a inibição da Catps K e formação óssea, ainda permanecem obscuros e provavelmente, segundo Duong (2012), é provável que envolva uma complexa rede de comunicação célula/célula. Porém, sabe-se que a Catepsina K é uma enzima que está envolvida no metabolismo ósseo e que devido a esta característica importante poderá ser de extrema relevância no processo saúde doença que envolve o sistema estomatognático (YAMALIK *et al.*,2011).

Diante do exposto percebe-se que a expressão da catepsina K parece ter relação com outros fatores osteoclastogênicos comentados nesta revisão, alguns mostrando uma relação direta com a super expressão desta colagenase. No entanto, seu papel nas doenças inflamatórias crônicas é pouco estudado e nas lesões periapicais humanas ainda não existem estudos publicados na literatura.

Portanto, constata-se que várias moléculas participam do processo de reabsorção óssea e possivelmente podem estar envolvidas na patogênese das lesões periapicais crônicas, ora estimulando a atividade osteoclastogênica ora inibindo este processo. Alguns destes fatores osteoclastogênicos têm sido extensamente estudados nas doenças inflamatórias crônicas, enquanto outros como a IL-33 e Catepsina K necessitam de mais investigações. Ademais, é relevante investigar a relação entre os fatores estimuladores e inibidores da osteoclastogênese com a finalidade de melhor esclarecer suas vias de sinalização. O conhecimento dessas vias de sinalização proporcionará o surgimento de métodos de

controle da atividade osteolítica, o que pode ser útil para o tratamento das patologias inflamatórias que envolvem a perda óssea.

3OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a expressão imunoistoquímica de fatores osteoclastogênicos, RANKL, TNF α , IL33, Catepsina K e OPG em uma série de casos de lesões periapicais crônicas humanas (CRs e GPs).

3.2 Específicos

- Comparar a expressão das proteínas entre CRs e GPs;
- Verificar correlação da expressão protéica com os parâmetros clinicomorfológicos: tamanho da lesão e intensidade do infiltrado inflamatório;
- Verificar quais tipos de células expressam as proteínas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas

O presente projeto de pesquisa encontra-se aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres Humanos da UEFS sob número de parecer 140.524 (Relatoria: 27/11/2012).

4.2 Caracterização Do Estudo

O presente estudo foi caracterizado por uma pesquisa retrospectiva e descritiva, constituída pela análise e registro da expressão imunoistoquímica do RANKL, TNF α , IL33, CatpsK e OPG em GPs e CRs.

4.3 Variáveis Estudadas

Em relação as variáveis estudadas, elas estão representadas no Quadro 1 abaixo.

Variável	Categorização
Lesão Periapical Crônica	Cisto Radicular = 1 Granuloma Periapical =2
Proteína	RANKL =1 OPG =2 TNF α = 3 IL33=4 Catps K = 5
Porcentagem expressão imunoistoquímica no epitélio	0 a 10% = 0; 11–25% =1; 26–75% =2; >76% =3
Porcentagem expressão imunoistoquímica cápsula/conjuntivo	0 a 10% = 0 ; 11–25% =1; 26–75% =2; >76% =3

Quadro 1: Descrição das variáveis estudadas. Salvador/BA – 2016

4.4 População

A população foi constituída por todos os casos registrados, diagnosticados e armazenados no Laboratório de Patologia Cirúrgica da Universidade Federal da Bahia (UFBA) de 2002 a 2015 e no Laboratório de Patologia Oral da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) de 2005 até 2015.

4.5 Amostra

A amostra foi constituída por 52 casos de lesões periapicais inflamatórias crônicas, assim distribuídas: 30 CRS e 22 GPs.

De uma maneira geral, como critérios de inclusão foram considerados os seguintes aspectos para cada caso: (1) quantidade suficiente de tecido no bloco de parafina arquivado; e (2) condições de armazenamento dos espécimes, critérios estes necessários para a realização do estudo imunoistoquímico.

Para os GPs, foram selecionados apenas os casos com ausência de qualquer remanescente de epitélio odontogênico disperso no tecido conjuntivo constituinte da lesão. Para as lesões císticas, foram incluídos somente os espécimes que exibiram uma cavidade patológica revestida total ou parcialmente por epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado e quantidade suficiente de cápsula fibrosa para realização das avaliações morfológica e imunoistoquímica.

No caso dos granuloma periapicais e cistos radiculares foi comprovada a existência de um dente com comprometimento pulpar associado à lesão. Estes dados estavam presentes nas fichas de encaminhamento de biópsia dos referidos casos e/ou nas imagens radiográficas disponíveis.

4.5.1 Caracterização da Amostra

Informações referentes à idade e sexo dos pacientes acometidos pelas patologias periapicais incluídas na amostra, bem como a localização e tamanho das lesões encontram-se na tabela 1. Com a relação à idade dos pacientes estudados, nos CRs a média foi de 44,3 anos e nos GPs foi de 38,8 anos, sendo os homens e mulheres acometidos igualmente pelo CR e as mulheres apresentaram maior frequência de GPs. Os dois tipos de lesões acometeram mais a maxila, especialmente a região posterior, sendo o tamanho médio encontrado de 2,16cm para os CRs e 1,63 para os GPs. Em alguns casos, não foi possível obter informações sobre localização das lesões, devido à falta de dados na ficha clínica.

Tabela 1. Informações clínicas dos pacientes de acordo com o tipo da lesão. Salvador/BA - 2016.

LESÃO	IDADE	SEXO % (N)		LOCALIZAÇÃO				TAMANHO
	Média (mín-max)	F	M	Md.A	Md.P	Max. A	Max.P	Média (mín-max)
CR	44,3 (14-66)	50(15)	50(15)	2	4	11	8	2,16 (0,3-10)
GP	38,8 (19-68)	63,63(14)	36,6(8)	0	6	3	10	1,63 (0,1- 5,5)

*CR: Cisto Radicular, GP: Granuloma Periapical, F:feminino,M: Masculino, min: mínimo, max: máximo, Md A: mandíbula anterior, Md P: mandíbula posterior, Mx A: maxila anterior, Mx P: maxila posterior.Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde/UFBA

4.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Esta análise foi realizada em cortes histológicos de 5µm de espessura, corados pela técnica de rotina da hematoxilina e eosina (HE), em lâminas confeccionadas e arquivadas no laboratório de Anatomia Patológica da UFBA

e UEFS, sob microscopia de luz. Foram descritos os aspectos referentes aos padrões característicos do tecido conjuntivo/cápsula de todas as lesões estudadas e do componente epitelial das lesões císticas.

O infiltrado inflamatório foi caracterizado em relação aos seguintes parâmetros:

- **Tipos de células predominantes** (linfócitos, plasmócitos, macrófagos, neutrófilos);
- **Localização do infiltrado** nos cistos (justaepitelial, dispersamente distribuído ou na periferia da lesão) e nos granulomas periapicais (centralizado ou dispersamente distribuído);
- **Intensidade do infiltrado** foi estabelecida através da gradação sugerida por Tsai *et al.* (2004). Cada espécime, corado em HE, foi graduado num aumento de 100x como: grau discreto (células inflamatórias representam menos de 1/3 da lesão), grau moderado (células inflamatórias representam 1/3 a 2/3 da lesão), grau severo (células inflamatórias representam mais de 2/3 da lesão).

Para os CRs, a espessura do revestimento epitelial foi analisada de acordo com metodologia proposta por Moreira *et al.* (2000). Nesta perspectiva, foram considerados atróficos os revestimentos epiteliais que apresentaram em sua maior extensão 2 a 10 camadas de células de espessura e hiperplásicos os revestimentos epiteliais com espessura variável, constituídos por mais de 10 camadas de células.

Todas as análises foram realizadas por dois observadores independentes e em caso de discordância, houve a participação de um terceiro observador, para o desempate.

4.7 Estudo Imunoistoquímico

4.7.1 Técnica da imunoistoquímica

Todos os espécimes fixados em formol a 10% e emblocados em parafina, referentes aos casos previamente selecionados para este estudo, foram submetidos a cortes histológicos de 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro previamente limpas e preparadas com adesivo à base de Organosilano (*3-aminopropyltriethoxi-silano*, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA). Posteriormente, foram submetidos ao método da imunoistoquímica, pela técnica da imunoperoxidase, utilizando-se os anticorpos anti-RANKL, anti-OPG, anti-TNF α , anti-IL33, e anti-Catepsina K, de acordo com o protocolo descrito a seguir. As especificações dos anticorpos utilizados encontram-se na Tabela 2. A lesão central de células gigantes foi utilizada como controle positivo e, como controle negativo, cortes histológicos foram incubados com soro diluente (S3022, Dako, Carpinteria, CA, USA) substituindo os anticorpos primários.

Tabela 2. Especificações dos anticorpos utilizados.

Anticorpo	Fabricante	Clone	Recuperação antigênica	Diluição	Incubação
RANKL	Santa Cruz	N-19	Citrato	1:150	Overnight
OPG	Santa Cruz	N-22	Citrato	1:150	Overnight
TNF α	Santa Cruz	52B83	Citrato	1:200	Overnight
IL33	Abcam	Ab118503	Citrato	1:150	Overnight
CatpsK	Abcam	2F1	Citrato	1:750	Overnight

Fonte: Programa de Pós-graduação em Odontologia e Saúde., Salvador/BA - 2016

- Desparafinização: 3 banhos em xilol (1,2 e 3) – 5 min cada;
- Reidratação: 2 banhos em álcool absoluto (100% - 1 e 2), 1 em álcool 95% (3) e 1 em álcool 70% (4) – 3min cada;
- Lavagem: PBS/Triton 0,1%, 2 vezes por 5 min;
- Bloqueio da Peroxidase Endógena: incubação em solução de H₂O₂ a 3% em PBS, por 45 min;
- Lavagem: PBS/Triton 0,1%, 2 vezes por 5 min;
- Recuperação Antigênica: incubação em tampão citrato-fosfato – pH 6,0 a 96°C (steamer ou banho-maria), por 20 min;
- Resfriamento: 20 min, temperatura ambiente;
- Lavagem: PBS/Triton 0,1%, 2 vezes por 5 min;
- Bloqueio de biotina endógena: leite mólico 4% por 10 min para o anticorpo RANK-L, OPG e Catps K;
- Bloqueio de Ligações Inespecíficas: Protein Block Serum-Free (K0909, Dako) 10 min para os anticorpos RANKL, OPG, IL33 e Catps K;
- Incubação Anticorpo Primário: diluídos em diluente (S3022, Dako) por 18h (overnight) a 4°C;
- Lavagem: PBS/Triton 0,1%, 2 vezes por 5 min;
- Sistema de Detecção:
 - Kit LSAB+System HRP (K0690, Dako) para RANKL, OPG e Catps K;
 - ADVANCETM HRP (K4069, Dako) para TNF α e IL33, ambos em duas etapas 30 min cada;
- Lavagem: PBS/Triton 0,1%, 2 vezes por 5 min;
- Cromógeno: kit DAB (Dako, K3468) 5-10min;
- Água destilada (paralisação reação do DAB);
- Contra-Coloração:
 - Hematoxilina de Harris;
 - Lavagem em água corrente por 10 min;
 - Álcool 70% por 2 min;
 - Álcool 1 por 2 min;
 - Álcool 2 por 2 min;

- Álcool 3 por 2 min;
- Xilol 1 por 3 min;
- Xilol 2 por 3 min;
- Xilol 3 por 3 min;

4.7.2 Análise imunoistoquímica

As lâminas coradas pela imunoistoquímica foram analisadas em microscópio de luz e as características do padrão de expressão de cada fator, foram registrados em fichas individuais, sendo analisados os seguintes aspectos:

- **Presença de imunorreatividade** em células epiteliais e/ou mesenquimais;
- **Tipo de célula** mesenquimal positiva (inflamatória, fibroblastos e células endoteliais)
- **Porcentagem da imunomarcção:** a imunoexpressão foi avaliada no revestimento epitelial e cápsula fibrosa/tecido conjuntivo de acordo com Moraes *et al.* (2011). A imunoexpressão no epitélio foi semi quantitativamente analisada por 2 observadores num aumento final de 100x e classificada de acordo com os escores: 0 ou nenhuma marcação (<10% das células positivas), 1 (11–25%), 2 (26–75%) e 3 (>76%). Na cápsula/tecido conjuntivo, a análise foi quantitativa e o número de células positivas foram contados em cinco campos histológicos representativos com aumento final de 400x. A imagem de cada campo foi obtida em fotomicroscópio Nikon E200 com câmera digital acoplada a um microcomputador para o qual as imagens foram transferidas. As células imunomarcadas e não marcadas foram contadas com a utilização do *Software Image J for Windows* versão 3.0, sendo calculado, então, o número médio em cada caso. Baseado na média de células totais

obtidas para cada caso, obteve-se o percentual de células positivas, atribuindo assim o mesmo sistema de escore utilizado na análise epitelial.

4.8 Análise Estatística

Os dados numéricos foram tabulados e tratados estatisticamente com o auxílio do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) na versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). O nível de significância utilizado na decisão dos testes foi de 5% ($p < 0,05$) e Intervalo de Confiança de 95%. Para a análise das associações foram utilizado o teste Qui-quadrado (X^2) com o intuito de testar as hipóteses a seguir.

H₀ - Não existem diferenças estatisticamente significativas entre a expressão de fatores estimuladores e inibidores da osteoclastogênese nas lesões periapicais inflamatórias estudadas.

H₁ – Existem diferenças estatisticamente significativas entre a expressão de fatores estimuladores e inibidores da osteoclastogênese nas lesões periapicais inflamatórias estudadas.

5 RESULTADOS

5.1 Dados Morfológicos

Analisando a cápsula dos CRs, bem como o tecido conjuntivo dos GPs, foi observada a predominância de um infiltrado inflamatório mononuclear, onde foi possível observar linfócitos, plasmócitos e macrófagos e em alguns casos, notou-se a presença de neutrófilos. Este infiltrado inflamatório apresentou-se dispersamente distribuído na maioria dos casos de CRs e GPs. Em ambas as lesões, predominou a intensidade severa, como ilustra a tabela 3.

Tabela 3. Intensidade do infiltrado inflamatório relacionado aos casos de CRs e GPs. Salvador/BA, 2016.

TIPO DE LESÃO	ITENSIDADE DO INFILTRADO		
	Leve	Moderado	Severo
CR	5	11	14
GP	3	5	14

*Fonte: Programa de Pós Graduação em Odontologia e Saúde/UFBA

A análise do revestimento epitelial das lesões císticas revelou um epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado, exibindo ora aspecto hiperplásico (n=15), ora atrófico (n=15), como demonstra a figura 1.

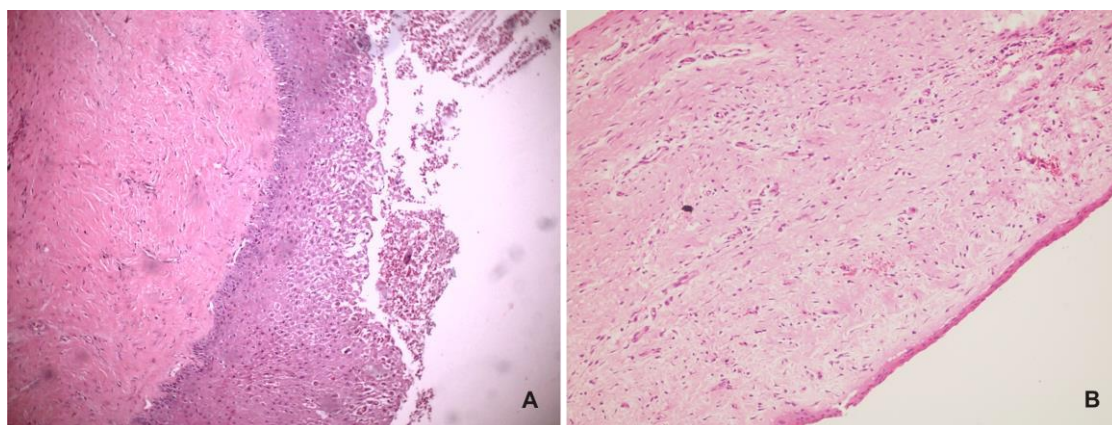


Figura 1. Fotomicrografias de CRs corados em hematoxilina/eosina (H/E). Em **A**, CR exibindo epitélio de revestimento cístico hiperplásico; em **B**, CR mostra epitélio atrófico (HE, 100x).

5.2 IMUNOEXPRESSÃO DO RANKL, TNF α , OPG, IL33 e Catps K

De uma forma geral, considerando o compartimento celular, a positividade de marcação foi evidenciada predominantemente no citoplasma, tanto das células epiteliais quanto das células do tecido conjuntivo. Os tipos celulares que imunoexpressaram as proteínas em estudo no tecido conjuntivo/cápsula foram linfócitos, plasmócitos, neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, bem como osteoblastos quando na presença de tecido ósseo, oriundos do procedimento cirúrgico.

Expressão imunoistoquímica nos CRs

Ao comparar a expressão das proteínas estudadas no epitélio cístico, foi observada maior imunomarcção para o TNF α (90% dos casos classificados no escore 3), seguido pela IL33, CatpsK, RANKL e OPG, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,000$) (tabela 4).

Tabela 4. Distribuição percentual da imunomarcção de RANKL, TNF α , OPG, IL33 e Catps K no epitélio dos CRs. Salvador/BA, 2016.

PROTEÍNA	ESCORE DE MARCAÇÃO EM EPITÉLIO			Valor de <i>p</i>
	1 (11 a 25%) n (%)	2 (26 a 75%) n (%)	3 (76 a 100%) n (%)	
RANKL	3 (10)	12(40)	15(50)	0,000*
OPG	6(20)	20(66,7)	4(13,3)	
TNFα	0(0)	3(10)	27(90)	
IL33	0(0)	4(13,3)	26(86,7)	
Catps K	0(0)	13(43,3)	17(56,7)	

*Teste Qui-Quadrado. Fonte: Programa de Pós Graduação em Odontologia e Saúde/UFBA

A figura 2 ilustra a expressão imunoistoquímica do RANKL, TNF α , OPG, IL33 e Catps K no epitélio de revestimento dos CRs.

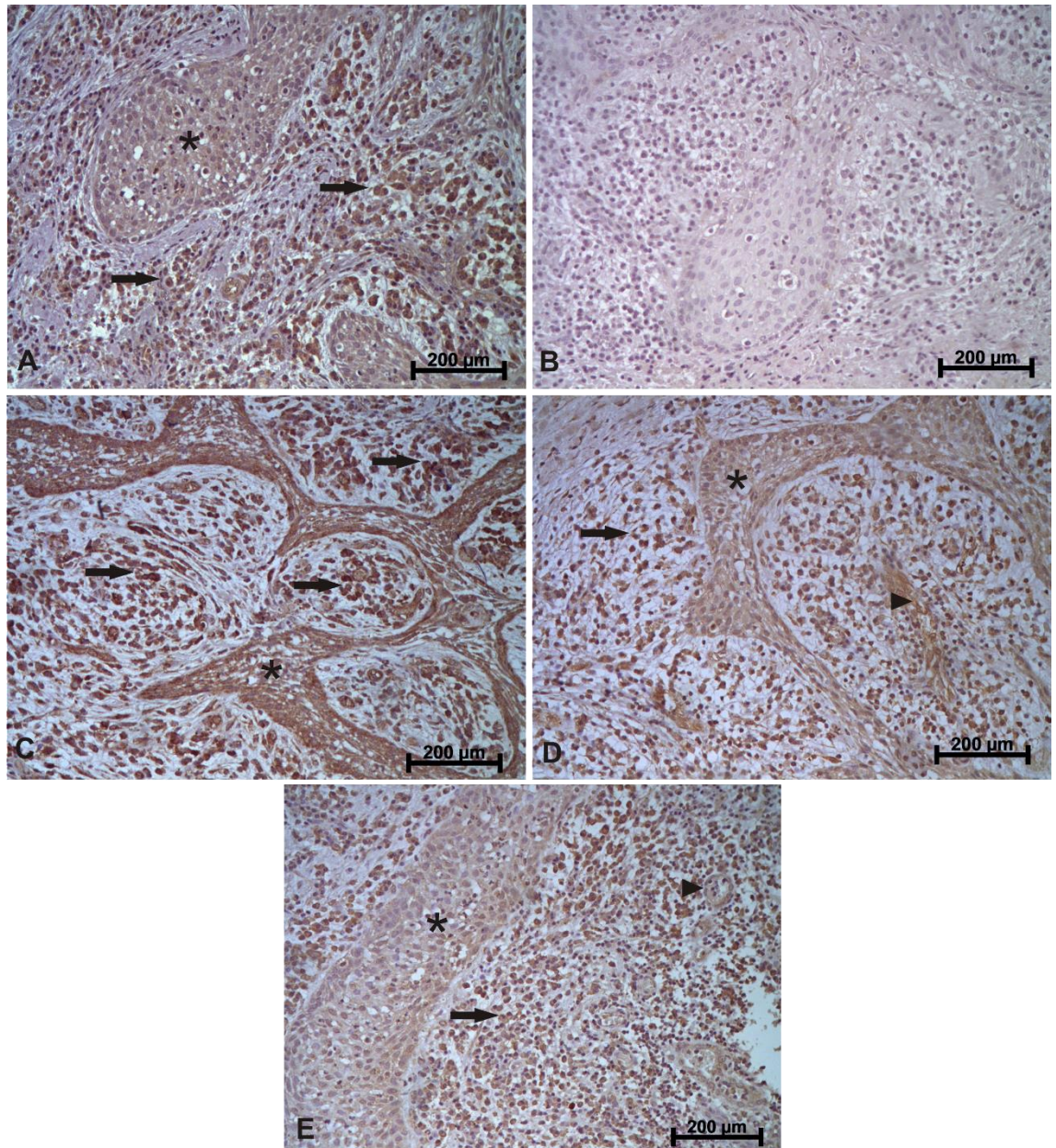


Figura 2. Imunoexpressão de RANKL, OPG, TNF α , IL33 e Catps K em CRs. Note alta expressão de RANKL (A), TNF α (C), IL33 (D), Catps K (E) no epitélio cístico (asterisco) e no infiltrado inflamatório crônico (setas). A cabeça de seta mostra a positividade nas células endoteliais. Em B, área de baixa expressão de OPG no epitélio e cápsula cística (imunoperoxidase, x200).

As proteínas estudadas também mostraram imunoexpressão diferenciada na cápsula dos CRs, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,000$) (tabela 5). A IL33, Catps K e TNF α apresentaram a maior marcação pelas células mesenquimais, no qual a maioria dos casos foi classificado no escore 3 (tabela 5). A maior parte dos casos imunomarcados pelo RANKL

(76,7%) foram incluídos no escore 2 e a menor marcação foi obtida pela OPG (56,7% classificados no escore 0).

Tabela 5. Distribuição percentual da imunomarcacão de RANKL, TNF α , OPG, IL33 e Catps K nas células mesenquimais dos CRs. Salvador/BA, 2016.

PROTEÍNA	ESCORE DE MARCAÇÃO EM CONJUNTIVO				Valor de <i>p</i>
	0 0 a 10% n(%)	1 (11 a 25%) n(%)	2 (26 a 75%) n(%)	3 (76 a 100%) n(%)	
RANK L	0(0)	0(0)	23(76,7)	7(23,3)	
OPG	17(56,7)	6(20)	7(23,3)	0(0)	0,000*
TNFα	0(0)	0(0)	6(20)	24(80)	
IL33	0(0)	0(0)	0(0)	30(100)	
Catps K	0(0)	1(1,3)	2(6,7)	27(90)	

*Teste Qui-Quadrado. Fonte: Programa de Pós Graduação em Odontologia e Saúde/UFBA

Expressão imunoistoquímica nos GPs

Em relação à imunoexpressão das proteínas no tecido conjuntivo dos GPs, foi observada marcação superior para a IL33, Catps K e TNF α (predominância do escore 3), seguidos pela OPG e RANKL, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,000$), como demonstra a tabela 6. A figura 3 ilustra a marcação das proteínas no tecido conjuntivo dos GPs.

Tabela 6. Distribuição percentual da imunomarcagem de RANKL, TNF α , OPG, IL33 e Catps K nas células mesenquimais dos GPs. Salvador/BA- 2016.

PROTEÍNA	ESCORE DE MARCAÇÃO EM CONJUNTIVO				Valor de P
	0 0 a 10% n(%)	1 (11 a 25%) n(%)	2 (26 a 75%) n(%)	3 (76 a 100%) n(%)	
RANKL	0(0)	0(0)	19(86,4)	3(13,6)	
OPG	0(0)	1(4,5)	16 (72,7)	5(22,7)	0,000
TNFα	0(0)	0(0)	1(4,5)	21(95,5)	
IL33	0(0)	0(0)	0(0)	22(100)	
Catps K	0(0)	0(0)	0(0)	22(100)	

*Teste Qui- Quadrado. Fonte: Programa de Pós Graduação em Odontologia e Saúde/UFBA.

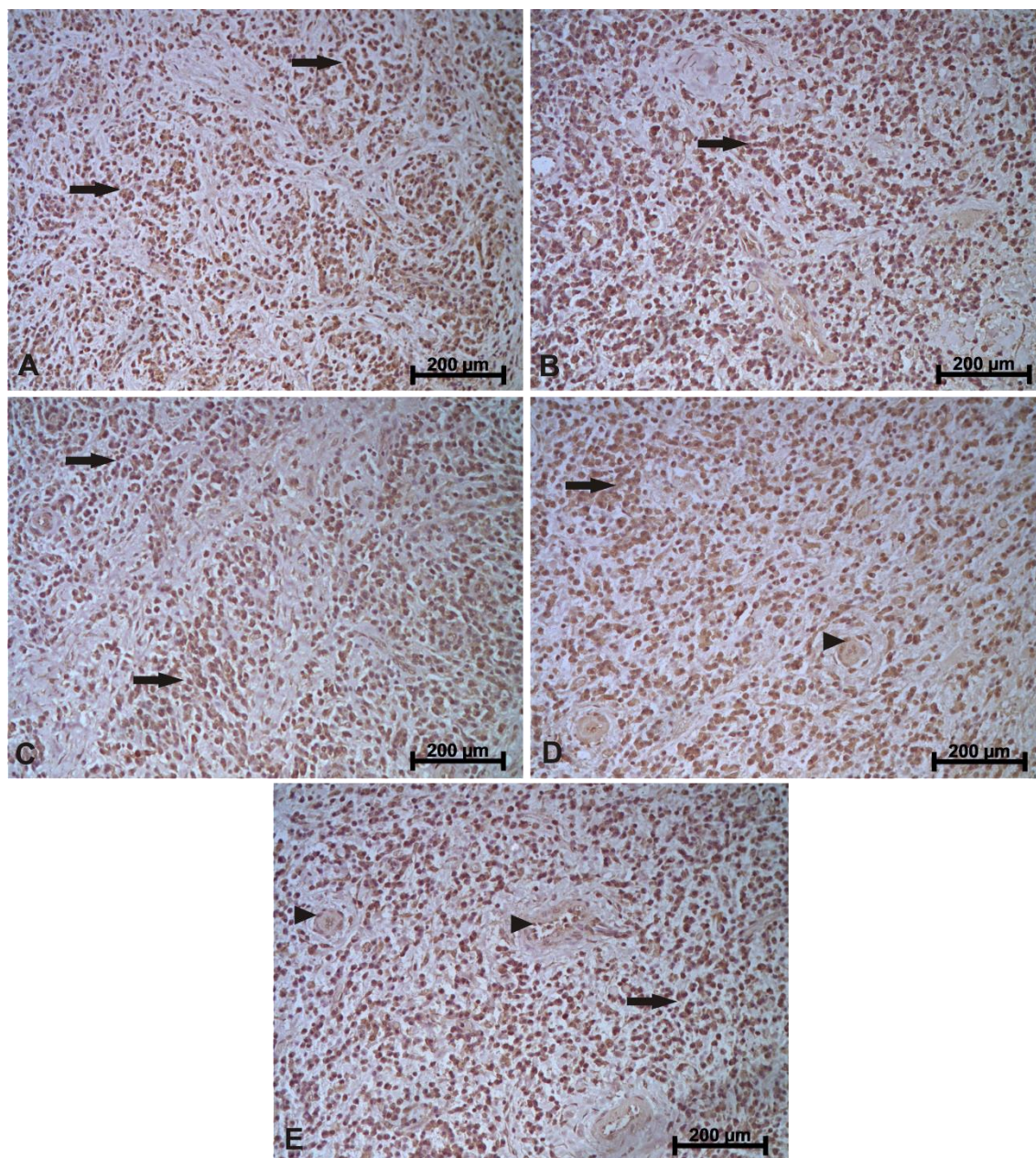


Figura 3. Imunoexpressão de RANKL, OPG, TNF α , IL33 e Catps K em GPs. Note alta expressão das células mesenquimais para todas as proteínas (A-E). As setas indicam a positividade no infiltrado inflamatório crônico e a cabeça de seta mostra a positividade nas células endoteliais (D, E) (imunoperoxidase, x200).

Comparação da expressão imunohistoquímica do RANKL, TNF α , OPG, IL33 e Catps K entre CRs e GPs

A expressão imunohistoquímica das proteínas estudadas foi comparada entre os CRs e GPs, sendo observado que o GP apresentou as maiores expressões de OPG ($p=0,000$) (tabela 7, figura 4). O RANKL, TNF α , IL33 e Catps K foram igualmente expressos pelas células mesenquimais da cápsula/tecido conjuntivo dos CRs e GPs.

Tabela 7. Comparação da imunomarcaçãode RANKL, TNF α , OPG, IL33 e Catps K na cápsula/tecido conjuntivo entre CRs e GPs. Salvador/BA- 2016.

PROTEÍNA	ESCORE DE MARCAÇÃO EM CONJUNTIVO				Valor de <i>P</i>
	0 0 a 10% n(%)	1 (11 a 25%) n(%)	2 (26 a 75%) n(%)	3 (76 a 100%) n(%)	
RANKL					0,381
CR	-	-	23(76,7)	7(23,3)	
GP	-	-	19 (86,4)	3(13,6)	
OPG					0,000
CR	17(56,7)	6 (20)	7(23,3)	-	
GP	-	1(4,5)	16(72,7)	5(22,7)	
TNFα					0,107
CR	-	-	6(20)	24(80)	
GP	-	-	1(4,5)	21(95,5)	
Catps K					0,311
CR	-	1(3,3)	2(6,7)	27(90)	
GP	-	-	-	22(100)	

*Teste Qui- Quadrado. Fonte: Programa de Pós Graduação em Odontologia e Saúde/UFBA.

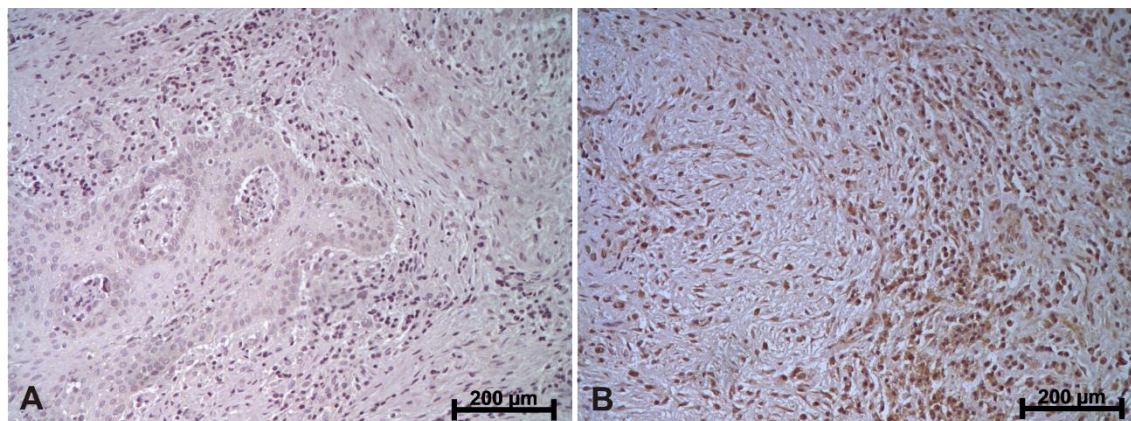


Figura 4. Imunoexpressão de OPG em CR e GP. Note em **A**, área de baixa expressão de OPG no epitélio e cápsula do CR; em **B**, alta expressão nas células mesenquimais do GP (*imunoperoxidase, x200*).

Expressão imunoistoquímica x parâmetros clínicos morfológicos

O teste de *Pearson* avaliou a possível correlação da expressão imunoistoquímica das proteínas estudadas com os parâmetros clínicomorfológicos: tamanho da lesão periapical e intensidade do infiltrado inflamatório. Apesar das lesões com infiltrado inflamatório severo apresentarem expressão mais elevada de RANKL, TNF α , IL33 e Catps K, não foi observada correlação estatisticamente significativa para nenhum dos marcadores ($p > 0,05$), tanto em relação à intensidade do infiltrado, como o tamanho das LPCs.

6 DISCUSSÃO

As lesões periapicais crônicas (LPCs) ocorrem como resultado de uma resposta imune, a qual é mediada por células inflamatórias e seus produtos. Os mecanismos precisos de reabsorção óssea inflamatória periapical ainda não são completamente compreendidos, no entanto, pesquisas vêm demonstrando que algumas proteínas parecem influenciar a atividade osteoclástica dessas lesões. O presente estudo sugere o envolvimento do RANKL, OPG, TNF α , IL33 e Catps K no desenvolvimento e crescimento dos CRs e GPs.

As LPCs são caracterizadas pela presença de numerosas células inflamatórias mononucleares, as quais incluem principalmente, os macrófagos, linfócitos e plasmócitos (HARGREAVES e COHEN, 2011). A análise da qualidade do infiltrado inflamatório dos casos de CR e GP do presente estudo revelou o predomínio destes tipos celulares, concordando com os achados de De Paula-Silva *et al.* (2009). Ocasionalmente, foi observada a presença de alguns neutrófilos, o que pode estar associado ao estágio de progressão da lesão. Segundo Peixoto e Peixoto (2012) os neutrófilos apresentam tempo médio de vida curto (48-72 horas) e devido à persistência da agressão bacteriana, posteriormente são substituídos por células da linhagem monocítica/macrofágica, as quais representam a segunda linha de defesa. Dessa forma, se atribui aos neutrófilos um papel importante no início das lesões periapicais e aos macrófagos nas etapas subsequentes do processo inflamatório, o que elucidada o motivo pelo qual os neutrófilos normalmente não aparecem em estágios mais avançados dessas lesões, excetuando-se as condições de reagudização e formação de abscessos.

O infiltrado inflamatório pode variar de discreto a severo, dependendo do estado evolutivo em que se encontra a lesão. Em nosso estudo houve um predomínio do infiltrado de intensidade severa para ambas as lesões, o

que pode justificar grande atividade osteolítica na região periapical dos dentes acometidos, uma vez que as células inflamatórias expressam os fatores osteoclastogênicos investigados. Rong *et al.*(2011) e Armada *et al.*(2015) demonstraram que lesões periapicais com intenso infiltrado de linfócitos e macrófagos, mostraram maior expressão de RANKL, quando comparados às lesões com infiltrados discreto a moderado, indicando que estas células são fontes secretoras de RANKL em processos de reabsorção óssea periapical.

Alguns CRs apresentaram epitélio hiperplásico e isso pode ser atribuído a maior intensidade do infiltrado inflamatório presente na cápsula dessa lesão, o qual favorece essa alteração arquitetural (MORAES *et al.*, 2013). Por outro lado, uma mesma proporção de CRs, apresentou epitélio mais delgado e regular, sendo estes casos associados, possivelmente, a uma cápsula menos inflamada e mais colagenizada (GARCIA *et al.*, 2007).

Na análise realizada, vários tipos celulares exibiram expressão imunohistoquímica para as proteínas estudadas, tais como células epiteliais, fibroblastos, células endoteliais e do infiltrado inflamatório. Estes achados estão de acordo com alguns relatos da literatura que investigaram a imunoexpressão destes mesmos fatores osteoclastogênicos em LPs. Menezes *et al.*(2006), Vernal *et al.* (2006) e Moraes *et al.* (2013) observaram imunopositividade para RANKL e OPG em linfócitos, plasmócitos, neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, indicando inclusive uma relação positiva entre a atividade leucocitária e maior expressão de RANKL durante a perda óssea periapical. No estudo de Velickovic *et al.* (2015), a IL33 foi expressa por células inflamatórias e por fibroblastos, enquanto, Jurisic *et al.* (2008) observaram que a expressão de TNF α estava relacionada ao grande número de macrófagos na parede dos CRs, mostrando uma possível relação dos macrófagos ativados com a formação de LPCs. Estes resultados indicam que esta grande variedade de células está envolvida no processo da osteoclastogênese e relacionada intimamente

com a expressão de citocinas inflamatórias, contribuindo com a expansão de lesões de origem endodôntica.

Nos CRs do nosso estudo, observou-se positividade para todas as proteínas estudadas, o que indica um possível papel destas moléculas na regulação do metabolismo ósseo envolvido no desenvolvimento desta lesão. Tanto no epitélio quanto no tecido conjuntivo, às maiores expressões foram obtidas pela IL33, Catps K, TNF α e RANKL, as quais são consideradas estimuladoras da atividade osteolítica, uma vez que vem demonstrando ser favorável a reabsorção óssea, fato comprovado em diversos estudos (JURISIC *et al.*, 2008; VELICKOVIC *et al.*, 2015; ARMADA *et al.*, 2015).

Jurisc *et al.* (2008) detectaram alta expressão de TNF α em CRs, sendo mais significativa nos cistos com menores dimensões quando comparados a lesões de maior tamanho. Os autores sugerem que provavelmente ocorra dissolução desta proteína dentro do volume cístico em lesões maiores. Velickovic *et al.* (2015) demonstraram que IL33 e seu receptor ST2 são altamente expressos em CRs, sinalizando uma provável participação desta proteína na patogênese dos CRs. Outro estudo importante feito por Armada *et al.* (2015) demonstraram a presença de RANKL e OPG em CRs e observaram que o infiltrado inflamatório crônico, presente nestas lesões, estava associado diretamente a uma maior expressão de RANKL em relação à OPG, indicando maior atividade osteolítica nestas lesões.

Por outro lado, em nossa pesquisa a OPG mostrou a menor expressão nos CRs, tanto em epitélio quanto na cápsula de tecido conjuntivo, quando comparado às outras proteínas. Considerando que as moléculas relacionadas ao favorecimento da reabsorção óssea estão altamente reguladas nos CRs aqui estudados, é de se esperar que a OPG estivesse com expressão inferior, já que é uma molécula que inibe a proliferação e diferenciação dos osteoclastos, competindo com o RANKL ao

impedir que este se ligue ao RANK, inibindo, dessa forma, a atividade osteolítica (GRAUNAITE *et al.*, 2011).

Concordando com o nosso estudo, Zhang *et al.*(2011) demonstraram que houve expressão de OPG em CRs, porém com menor intensidade quando comparado ao RANKL, indicando que ambos possuem papel importante na osteoclastogênese. Nosso resultado corrobora ainda com Armada *et al.*(2015), onde a expressão de OPG foi menor que RANKL, tanto no epitélio atrófico como no hiperplásico, indicando uma menor concentração de fatores anti-reabsortivos no epitélio cístico.

O tecido epitelial tem sido considerado um importante componente no processo inflamatório, incluindo sua participação no processo de sensibilização de células T helper pela ação de células dendríticas (HAMMAD e LAMBRECHT, 2008). As células dendríticas apresentam antígenos às células imunes e podem estar envolvidas na osteoclastogênese induzida pelo processo inflamatório, com consequente efeito na reabsorção óssea (ALNAEELI e TENG, 2009). Outro fato importante é a capacidade de células dendríticas imaturas se transdiferenciarem em osteoclastos funcionais na presença de RANKL e fator estimulante de colônia de macrófagos, resultando na formação de lesões osteolíticas derivadas de doença óssea inflamatória (RIVOLLIER *et al.*, 2004). Um estudo imunoistoquímico prévio mostrou a presença de células dendríticas em epitélio de cisto radicular e dentígero expressando RANKL (DEMORAES *et al.*, 2011). Esses achados, juntamente aos do presente estudo indicam uma alta concentração de fatores que favorecem a reabsorção no epitélio cístico.

Os fatores IL33, Catps K, TNF α e RANKL também parecem participar do processo de reabsorção óssea nos GPs avaliados na presente pesquisa. Semelhante ao nosso estudo, Araújo-Pires *et al.* (2014), também encontraram alta expressão de TNF α na fase ativa dos GPs. Hu *et al.* (2015) demonstraram a presença de RANKL e OPG em GPs, sugerindo o envolvimento dessas moléculas na remodelação óssea dessa lesão.

Velickovic *et al.*(2015) indicaram em seu estudo a expressão relevante de IL33 e seu receptor ST2 em GPs, mostrando marcação positiva, principalmente em fibroblastos. Esses resultados enfatizam a importância desses fatores proteicos na progressão e expansão dessas lesões.

Interessante notar que a OPG teve expressão superior ao RANKL nos GPs, sugerindo que sejam potencialmente lesões mais estáveis. Esses resultados estão de acordo com Menezes *et al.*(2008), onde a expressão de RANKL e OPG esteve associada ao GP, sendo constatado que poderia haver variação na proporção de expressão entre RANKL e OPG, dependendo do estágio de evolução da lesão, podendo ser considerada estável (OPG>RANKL) ou em progressão (RANKL>OPG). Segundo Hargreaves e Cohen (2011) este evento também pode ser explicado pelo fato que as células T ativadas produzem fatores proteicos que regulam negativamente citocinas pró-inflamatórias, implicando em processo de reabsorção tardia nos GPs. Sendo assim, é possível que os GPs fiquem “inativos” por um longo período, até que ocorra um desequilíbrio entre fatores estimuladores e inibidores.

Todos estes relatos da literatura, em conjunto aos nossos resultados, reforçam a hipótese de que a IL33, Catps K, TNF α e RANKL funcionam como estimuladores da osteoclastogênese relacionada às LPCs. Dessa forma, a evolução e crescimento da lesão vão depender da relação entre estas proteínas pró-inflamatórias e outros fatores, tais como proteínas anti-inflamatórias e as próprias endotoxinas, oriundas do sistema de canais radiculares (GRAUNAITE *et al.*, 2011; RONG *et al.*, 2011; ARMADA *et al.*, 2015).

Em nossos resultados, as expressões da IL33, Catps K e TNF α predominaram em relação ao RANKL nos CRs e GPs. Fato compreensível, tendo em vista que a literatura demonstra que o TNF α e IL33 têm a capacidade de favorecer a perda óssea tanto de forma independente, como

também estimulando a expressão de RANKL junto com outras citocinas pró-inflamatórias (GRAVES *et al.*, 2011; KITAURA *et al.*, 2013). Como o demonstrado por Graves *et al.* (2011), onde os autores indicam que o TNF α estaria associado à produção de RANKL, induzindo a diferenciação dos osteoclastos, com conseqüente reabsorção óssea. Kitaura *et al.*(2013), consideraram que a TNF α age diretamente no aumento da expressão do RANKL nos macrófagos e células do estroma, promovendo a osteoclastogênese. Assim, é possível que maiores concentrações de TNF α e IL33 antecederiam o aumento da expressão do RANKL.

A IL33 é pouco estudada, especialmente em LPCs. As pesquisas demonstram resultados controversos, nos quais ela parece atuar como favorecedora da atividade osteolítica (MUN *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2012; DA LUZ *et al.*, 2014) e por vezes, inibidora do processo osteoclastogênico (MILOVANOVIC *et al.*, 2012). Mun *et al.*(2012) demonstraram em seu estudo que a IL33 age de forma independente a ação do RANKL, regulando a diferenciação dos osteoclastos. Da Luz *et al.* (2014) relatam que a alta expressão IL33 parece induzir a produção de Catps K. Contudo, Milovanovic *et al.* (2012), revelaram que ela parece agir como uma citocina anti-inflamatória, promovendo tanto a resposta imune Th1 como a Th2.

A partir dos resultados da presente pesquisa, podemos sugerir que a IL33 realmente atua como proteína pró-inflamatória, favorecendo a perda óssea em LPCs, uma vez que sua alta expressão foi acompanhada por fatores estimuladores já conhecidos. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar sua possível relação com o RANKL.

Outros estudos foram realizados (KAWASHIMA *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2013; HAO *et al.*, 2015 e SUZUKI *et al.*, 2015) mostrando a relevância da expressão de RANKL, OPG, TNF α , IL33 e Catps K em lesões periapicais induzidas em ratos, confirmando, mais uma vez, que estas proteínas participam estimulando ou inibindo ativamente o processo de

osteoclastogênese. Na pesquisa de Kawashima *et al.* (2007), as expressões de RANKL e TNF α foram correlacionadas com a expansão das lesões periapicais, indicando uma função importante destas proteínas na cinética destas lesões, como também foi mostrado o efeito antagônico da OPG no processo de reabsorção óssea. Outros estudos recentes, como o de Gao *et al.* (2013); Hao *et al.* (2015) e Suzuki *et al.* (2015) demonstraram o efeito de silenciadores da Catps K em lesões periapicais crônicas, através da redução da destruição óssea e inflamação periapical e inibição da evolução da doença. Os resultados sugeriram que estes silenciadores atuaram tanto como inibidores da ação da Catps K nos osteoclastos, mas, também, como bloqueadores da síntese de mediadores pró-inflamatórios relacionados à osteoclastogênese.

Ao analisar comparativamente os CRs e GPs estudados, podemos inferir que os fatores estimuladores da osteoclastogênese participam do crescimento de ambas as lesões, uma vez que expressão semelhante foi observada para todas as proteínas estimuladoras. Resultados semelhantes foram relatados por Velickovic *et al.* (2015), mostrando que a IL33 e seu receptor ST2 se expressavam de maneira semelhante tanto nos CRs quanto GPs, exibindo um aumento de fibroblastos marcados positivamente para estas moléculas. Já Teixeira-Salum *et al.*, (2010), encontraram maior expressão de TNF α nos CRs quando comparados aos GPs. Fato este justificado, por serem os CRs mais ativos e por isto, a possibilidade de haver maior atividade osteolítica do que nos GPs.

Por sua vez, o nosso trabalho mostrou a OPG mais evidenciada nos GPs. Este achado pode justificar o crescimento superior, que geralmente é observado para as lesões císticas em relação aos granulomas. Achados semelhantes aos nossos foram descritos por Zhang *et al.* (2012), onde a OPG foi mais expressa nos GPs quando comparados aos CRs, demonstrando menor atividade osteoclastogênica nos GPs. Porém, diferente dos nossos resultados, Menezes *et al.* (2006) avaliaram a expressão de RANKL e OPG em CRs e GPs, verificando que a OPG sempre era menos

expressa nos GPs, sendo a razão entre as duas proteínas a mesma para as duas lesões.

Acredita-se que quanto maior a expressão dos fatores estimuladores da osteoclastogênese, maior o tamanho das lesões periapicais, pois maior reabsorção óssea estaria ocorrendo. De acordo com Armada *et al.* (2015) a expressão de fatores osteoclastogênicos, tais como RANK, RANKL e OPG é mais evidente em áreas de infiltrado inflamatório crônico em comparação com áreas de infiltrado misto. Assim, é de se esperar que a quantidade e tipo do infiltrado inflamatório influenciem na quantidade de células imunomarcadas.

Em nosso estudo não foi observada correlação estatística da expressão imunoistoquímica com as dimensões das LPCs. Além disso, apesar das lesões com infiltrado mais severo mostrarem uma tendência a ter maior expressão dos fatores osteoclastogênicos, correlação estatística também não foi constatada. Este achado pode ser justificado, pelo fato da maioria das LPCs terem sido classificadas com intensidade severa de infiltrado inflamatório e poucas células polimorfonucleadas foram detectadas nas lesões.

A visão molecular mais ampla do processo de formação das LPCs tem relevância clínica quando se considera as dificuldades e desafios enfrentados pelo dentista clínico ou pelo próprio especialista, ao se depararem com imagens radiográficas inconclusivas e/ou achados clínicos subjetivos, em relação à evolução ou resolutividade da LPCs. A comprovação do envolvimento dessas proteínas na etiopatogenia das LPCs em humanos implica no surgimento de promissores e efetivos desenhos terapêuticos, uma vez que torna possível a idealização e desenvolvimento de moléculas silenciadoras capazes de atuar como bloqueadoras da progressão dessas lesões.

7 CONCLUSÕES

- RANKL, TNF α , IL33 e Catps K participam do desenvolvimento e processo de reabsorção óssea nos CRs e GPs;
- OPG teve participação distinta, sendo mais significativa nos GPs, influenciando possivelmente seu crescimento inferior em relação aos CRs;
- Não houve correlação estatisticamente significativa entre expressão das proteínas estudadas com o tamanho da lesão e intensidade do infiltrado inflamatório;
- Os fatores estimuladores e inibidores da atividade osteoclástica são expressos pelas células epiteliais e mesenquimais constituintes das LPCs.

8 REFERÊNCIAS

AINOLA, M.; MANDELIN, J.; LILJESTRÖM, M.; KONTTINEN, Y.Y.; SALO, J. Imbalanced expression of RANKL and osteoprotegerin mRNA in pannus tissue of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**. 26: 40-46, 2008.

ALNAEELI, M.; TENG, Y.T. Dendritic cells: a new player in osteoimmunology. **Curr Mol Med**. 9:893-910, 2009

ANANDARAJAH, A.P. Role of RANKL in bone diseases. **Trends Endocrinol Metab**. 20: 88-94, 2009.

ARAUJO-PIRES, A.C.; FRANCISCONI, C.F.; BIGUETTI, C.C.; CAVALLA, F. LETRA, A.; TROMBONE, A.P.F.; FAVERI, M.; SILVA, R.M.; GARLET, G.P. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. **J Appl Oral Sci**. 22(4): 336-46, 2014.

ARMADA, L.; MARROTA, P.S.; PIRES, F.R.; SIQUEIRA, J.F. **JOE**. 41: 8, August, 2015.

BELIBASAKI, G.N.; RECHENBER, D.K.; ZEHNDER, M. The receptor activator of NF- κ B ligand-osteoprotegerin system in pulpal and periapical disease. **International Endodontic Journal**. 46: 99-111, 2013.

BELLIDO, T. Osteocyte-Driven bone remodeling. **Calcif Tissue Int**. 94(1): 25-34, January, 2014.

BONNEN, S.; ROSENBERG, E.; CLAESSENS, F.; VANDERSCHUEREN, D.; PAPAPOULO, S. Inhibition of Cathepsin K for treatment of Osteoporosis. **Curr Osteoporos Rep**. 10:73-79, 2012.

BOYCE, B.F.; XING, L. Function of RANK/RANKL/OPG in bone modeling and remodeling. **Arch Biochem Biophys.** 473:139-46, 2008.

BRAUN, T.; SCHEFF, G. Pathways for bone loss in Inflammatory disease. **Curr Osteoporos Rep.** Published online: 25 April 2012.

CANON, J.R.; ROUDIER, M.; BRYANT, R.; MORONY, S.; STOLINA, M.; KOSTENUIK, P.J.; DOUGALL, W.C. Inhibition of RANKL blocks skeletal tumor progression and improves survival in a mouse model of breast cancer bone metastasis. **Clin Exp Metastasis.** 25(2):119-29. Dec 54, 2008.

CAYROL, C.; GIRARD, J.P. IL-33:analarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. **Current Opinion in Immunology.** 31:31-37, 2014.

CHEN, B.; WU, W.; SUN, W.; ZHANG, Q.; YAN, F.; XIAO, Y. RANKL Expression in Periodontal Disease: Where Does RANKL Come from? **Biomed Res Int.** Volume 2014, 2014.

COCHRAN, D.L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J Periodontol.**79: 1569-76, 2008.

DA LUZ, F.A.C.; OLIVEIRA, A.P.L.; BORGES, D.; BRÍGIDO, P.C.; SILVA, M.J.B. The physiopathological role of IL-33: New highlights in Bone Biology and a proposed role in Periodontal Disease. **Mediators of Inflammation.** 2014.

DANDOTIKAR, D.; PEDDI, R.; LAKHANI, B.; LATA, K.; MATHUR, A.; CHOWDARY, U.K. Nonsurgical Management of a Periapical Cyst: A Case

Report. **Journal of International Oral Health**. 5(3):79-84 [79]. May-June 2013.

DELAISSE, J.M. The reversal phase of the bone-remodeling cycle:cellular prerequisites for coupling resorption and formation. **Bone Key Reports**. 3, Articlenunder: 561, 2014.

DE MORAES, M.; LUCENA, H.F.; DE AZEVEDO, P.R.M.; QUEIROZ, L.M.G.; COSTA, A.L.L. Comparative immunohistochemical expression of RANK, RANKL and OPG in radicular and dentigerous cysts. **Archives of Oral Biology**. 56:1256-1263, 2011.

DE PAULA E SILVA, F.W.G.; D'SILVA, N.J.; DA SILVA, L.A.B.; KAPILA, Y.L. High Matrix Metalloproteinase Activity is a Hallmark of Periapical Granulomas. **J Endod**. 35(9): 1234–1242, September 2009.

DUONG, L.T. Therapeutic inhibition of cathepsin K – reducing bone resorption while maintaining bone formation. **International Bone and Mineral Society**.67, 2012.

FUJIOKA, K.; KISHIDA,T.; EJIMAE, A.; YAMAMOTO ,K.; FUJII, W.;*et al*.Inhibition of osteoclastogenesis by osteoblast-like cells genetically engineered to produce interleukin-10. **Biochem.Biophys. Res. Commun**. 2014.

FULLER, K.; LINDSTROM, E.; EDLUND, E.; HANDERSON, I.; GRABOWSKA, U.; SZEWCZYK, K.A.; MOSS, R.; SAMUELSSON, B.; CHAMBERS, T.J. The resorptive apparatus of osteoclasts supports lysosomotropism and increases potency of basic versus non basic inhibitors of Cathepsin K. **Bone**. 46: 1400-1407,2010.

GAO, B.; CHEN, W.; HAO, L.; ZHU, G.; FENG, S.; CI, H., ZHOU, X.; STASHENKO, P.; LI, Y.P. Inhibiting Periapical lesions through AAV-RNAi silencing of Cathepsin K. **J Dent Res.** 92(2): 180186, 2013.

GARCIA,C.C.; SEMPERE, F.V.; DIAGO, M.P.; BOWEN, E.M.The post-endodontic periapical lesion: Histologic and etiopathogenic aspects. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**12(8):E585-90, 2007.

GARLET, T.P.; FUKADA, S.Y.; SACONATO, I.F.; AVILA-CAMPOS,M.J.;DA SILVA,T.A.; GARLET, G.P.; CUNHA, F.D.E.Q.CCR2 Deficiency results in increased osteolysis in experimental periapical lesions in mice. **JOE.** 36: 2, February, 2010.

GARNERO, P., BOREL, O., BYRJALSEN, I. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. **J Biol Chem.** 273: 32347-52, 1998.

GAZIVODA, D., DZOPALIC, T., BOZIC, B., TATOMIROVIC, Z., BRKIC, Z., COLLIC, M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. **J Oral Pathol.Med** .38: 605-611, 2009.

GINER,M., RIOSOB, M.J.; MONTROYAB, M.J.; VÁZQUEZB, M.A. RANKL/OPG in primary cultures of osteoblasts from post-menopausal women.Differences between osteoporotic hip fractures and osteoarthritis. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology** 113: 46–51, 2009.

GORANOVA-MARINOVA, V.; GORANOV,S.; PAVLOV, P.,;TZVETKOVA, T.Serum levels of OPG, RANKL andOPG/RANKL ratio in newly-diagnosed

patients with multiple myeloma: clinical correlations. **Haematologica**.92: 1000-1, 2007.

GÓRSKA, R.; GREGOREK, H.; KOWALSKI, J.; LASKUS-PERENDYK, A.; SYCZEWSKA, M.; MADALIŃSKI, K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**. 30: 1046-1052, 2003.

GOTO, T.; YAMAZA, T.; TANAKA, T. Cathepsins in the osteoclast. **Journal of Electron Microscopy**.52(6): 551-558, 2003.

GRAUNAITE, I.; LODIENE, G.; MACIULSKIENE, V. Pathogenesis of Apical Periodontitis: a Literature Review. **J Oral Maxillofac Res**. 2(4), Oct – Dec.,2011.

GRAVES, D.T.; OATES, T.; GARTLET, G.P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontics and periodontal lesions. **Journal of Oral Microbiology**.3:5304. 2011.

GROSSMANN, S.M.; MACHADO, V.C.; XAVIE, G.M. Demographic profile of odontogenic and selected nonodontogenic cysts in a Brazilian population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 104(6): 35-41, 2007.

GUERRINI, M.M., TAKAYANAGI, H. The immune system, bone and RANKL. **Archives of Biochemistry and Biophysics**.561: 118-123. 2014.

HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B.N. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. **Nat Rev Immunol**. 8:193–204, 2008.

HAMBLI,R. Connecting mechanics and bone cell activities in the bone remodeling process: an integrated finite element modeling. **Bone remodeling based on cells activities.**2 (6),April, 2014.

HAO, L.; CHEN, W.; MCCONNELL,M.; ZHU,Z.; LI, S.; REDDY, M.; ELEAZER, P.D.; WANG, M.; PING,Y. A Small Molecule, Odanacatib, Inhibits Inflammation and Bone Loss Caused by Endodontic Disease. **Infection and Immunity.** 83 (4), April, 2015.

HARGREAVES, K.M.; COHEN, S.F. **Caminhos da Polpa.** 10Edição, 2011

HENRIQUES, L.C.F.; DE BRITO, L.C.N.; TAVARES, W.L.F.; VIEIRA, L.Q.; SOBRINHO, A.P.R. Cytokine Amnalysis in Lesions Refractory to Endodontic Treatment. **JOE.**37(12), 2011.

HONMA, M.; IKEBUCHI,Y.; KARIVA,Y.; SUZUKI, H.Regulatory Mechanisms of RANKL Presentation to Osteoclast Precursors. **Curr Osteoporos Rep.**12(1):115-20,Mar, 2014.

HU,J.; LI, Q.; WANG,Y.; LI ,S. Immunoexpression and clinical significance of interleukin-21 and receptor activator of nuclear factor κ B ligand in human periapical granulomas and radicular cysts. **West China Journal of Stomatology.** 33 (3), Jun, 2015.

HUANG, H.; WILLIAMS, R.C.; KYRKANIDESC, S. Accelerated orthodontic tooth movement: Molecular mechanisms. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.**146 (5),November,2014.

JENSEN, P.R.; ANDERSEN, T.L.; PENNYPACKER, B.L.; DUONG, L.T.; DELAISSÉ, J.M. The bone resorptionOdanacatib and Alendronate affect postosteoclastic events differently in ovariectomized rabbits.**Calcif Tissue Int.** 94: 212-222, 2014.

JURISIC, V.; TERZIC, T.; JURISIC, M. The concentration of TNF – α correlate with number of inflammatory cells and degree of vascularizations in radicular cysts. **Oral diseases**.14 , 600-605, 2008.

KEARNS, A.E.; KHOSLA, S.; KOSTENIUK, P.J. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. **Endocr Rev**. 29: 155-92, 2008.

KHOSLA, S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinol**.142 (12): 5050-5055, 2001.

KOBAYASHI, K.; TAKAHASHI, N.; JIMI, E.; UDAGAWA, N.; TAKAMI, M.; KOTAKE, S.; NAKAGAWA, N.; KINOSAKI, M.; YAMAGUCHI, K.; SHIMA, N.; YASUDA, H.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K.; MARTIN, T.J.; SUDA, T. Tumor Necrosis Factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of ODF/RANKL-RANK interaction. **J Exp Med**. 191(2): 275-285, January, 2000.

KOBAYASHI, Y.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N. Action of RANKL and OPG for Osteoclastogenesis. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**.19(1): 61–72, 2009.

KITAURA, H.; KIMURA, K.; ISHIDA, M.; KOHARA, H.; YOSHIMATSU, M.; TAKANO-YAMAMOTO, T. **Clinical and Developmental Immunology**. Article ID 181849, 8 pages, 2013.

KRAMER, I.R.; PINDBORG, J.J.; SHEAR, M. The WHO histological typing of odontogenic tumours; a commentary on the second edition. **Cancer**. 70 (12), 1992.

KUNTZ, K.A.; BROWN, Jr., C.E.; LEGAN, J.J.; KAFRAWY, A.H. An Immunohistochemical Study of Osteoprotegerin in the Human Dental Pulp. **Journal of Endodontics**. 27 (11), November, 2001.

LAM, J.; TAKESHITA, S.; BARKER, J.E.; KANAGAWA, O.; TEITELBAUM, S.L. **J. Clin Invest**. 106:1481–1488, 2000.

LAMOUREUX, F.; *et al.* Regulation of osteoprotegerin pro- or anti-tumoral activity by bone microenvironment. **Biochim Biophys Acta**. 1805: 17-24, 2010.

LEUNG, P.; PICHRSKI, M.; ZHUO, Y.; MASARACHIA, P.J.; DUONG, L.T. The effects of the cathepsin k inhibitor odanacatib on osteoclastic bone resorption and vesicular trafficking. **Bone**. 49: 623-635, 2011.

LEFRANÇAIS, E.; CAYROL, C. Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. **Eur Cytokine Netw**. 23 (4), 2012.

LIU, L.; PENG, B. The Expression of Macrophage migration inhibitory factor is correlated with receptor activator of nuclear factor Kappa B ligand induced rat periapical lesions. **JOE**. 39 (8), August, 2013.

LIN, L.M.; HUANG, G.T.J.; ROSENBERG, P.A. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cyst, and regression of apical cysts after periapical wound healing. **J Endod**. 33 (8): 908-16, 2007.

LOYOLA, A.M.; CARDOSO, S.V.; LISA, G.S.; OLIVEIRA, L.J.; MESQUITA, R.A.; CARMO, M.A.; AGUIAR, M.C. Apoptosis in epithelial cells of apical radicular cysts. **IntEndod Journal**. v.38, p. 465-469, 2005.

MACIEL, K.F.; NEVES DE BRITO, L.C.; TAVARES, W.L., MOREIRA, G.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q.; RIBEIRO SOBRINHO, A.P. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. **International Endodontic Journal**.45: 354-362, 2012.

MENEZES, R.; BRAMANTE, C.M.; DA SILVA PAIVA, K.B.; LETRA, A.; CARNEIRO, E.; FERNANDO ZAMBUZZI, W.; GRANJEIRO, J.M. Receptor activator NF- κ B-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**.102:404-9, 2006.

MENEZES, R.; GARLET, T.P.; LETRA, A.; BRAMANTE, C.M.; CAMPANELLI, A.P.; FIGUEIRA, R.D.E.C.; SOGAYAR, M.C.; GRANJEIRO, J.M.; GARLET, G.P. Differential patterns of RANKL/OPG expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. **J Endod**.; 34(8): 932–938, August, 2008.

MORAES, M.; DE MATOS, F.R.; DE SOUZA, L.B.; FREITAS, R.A.; COSTA, A.L.L.C. Immunoexpression of RANK, RANKL, OPG, VEGF, and vWF in radicular and dentigerous cysts. **J Oral Pathol Med**. 42: 468–473, 2013.

MILOVANOVIC, M.; VOLAREVIC V.; RADOSAVLJEVIC, G.; JOVANOVIC, I.; PEJNOVIC, N.; ARSENIJEVIC, N.; LUKIC, M.L. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. **Immunol Res**. 52(1-2): 89-99, Apr, 2012.

MUGLALI, M.; KOMERIK, N.; BULUT, E.; YARIM, G.F.; CELEBI, N.; SUMER, M. Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cyst fluids. **J Oral Pathol Med**. 37:185-189, 2008.

MUN. S.H.; KIM. H.S; KIM,J.W.; KIM, D.O.K.; KIM,A.R.; LEE, S.H.; KIM, Y.G.; LEE, C.K.; LEE, S.H.; KIM, B.K.; BEAVEN, M.A.; KIM, Y.M.; CHOI, W.S. Interleukin-33 stimulates formation of functional osteoclasts from human CD14+ monocytes. **Cell Mol Life Sci.** 67(22):3883-92, Nov, 2010.

NAIR, P.N. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. **Int Endod J.** 3(4): 249-81, 2006.

NEVILLE , B.; DAMM, D. **Patologia Oral e Maxilofacial.** 3ª Edição, 2011.

NIKOLOPOULOS, G.K.; DIMOU, N.L.; HAMODRAKAS, S.J.; BAGOS, P.G. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease : a metaanalysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. **J Clin Periodontol.** 35: 754-767, 2008.

NOBUHARA, W.; DEL RIO, C. Incidence of periradicular pathoses in endodontic treatment failures. **J Endod.** 19 (6): 315-8, 1993.

OCHSENIUS, G.; ESCOBAR, E.; GODOY, L.; PEÑAFIEL, C. Odontogenic Cysts: Analysis of 2.944 cases in Chile. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** 12: 85-91, 2007.

OMOREGIE, F.O.; OJO, M.A.; SAHEEB, B.D.O.; ODUKOYA, O. Periapical granuloma associated with extracted teeth. **Nigerian Journal of Clinical Practice.** 14(3), Jul-Sep, 2011.

PEIXOTO, R.F.; PEIXOTO, D.F. Aspectos Imunológicos e Etiopatogênicos das lesões periapicais crônicas. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde.** 14(3):175-82, 2012.

PENNYPACKER, B.; SHEA, M.; LIU, Q.; MASARACHIA, P.; SAFTIG, P.; RODAN, S.; RODAN, G.; KIMMEL, D. Bone density, strength, and formation in adult cathepsin K (-/-) mice. **Bone**.44: 199–207,2009.

PROCKET, A.P.; SCHEBELA, C.R.; MAITO, F.D.M.; SANT'ANA-FILHO, E.M.; RADOS, P.V. Odontogenic Cyst: Analysis of 680 Cases in Brazil. **Head and Neck Pathol**.2:150–156, 2008.

PROFF, P.; ROMER, P. The molecular mechanism behind bone remodeling: a review. **Clin Oral Invest**. 13: 355-62, 2009.

PRSO, I.B.; KOCJAN, W.; SIMI, H.; BRUMINI, G.; PEZELJ-RIBARIC, S.; BORCI, J.; SILVIO FERRERI, S.; IVANA MILETIC KARLOVI, I.M. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin 6 in Human Periapical Lesions. **Mediators of Inflammation**.2007, 2006.

RAJU, S.M.K.; YADA, S.S.; KUMAR, S.R. Revascularization of Immature Mandibular Premolar with Pulpal Necrosis - A Case Report. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. 8(9), Sep,2014.

RECHENBERG, D.K.; BOSTANCI, N.; ZEHNDER, M.; BELIBASAKIS, G.N. Periapical fluid RANKL and IL-8 are differentially regulated in pulpitis and apical periodontitis. **Cytokine**. 69 (2014): 116–119, 2014.

REGEZZI, J.A.; SCIUBBA, J.J.; JORDAN, R.C.K. Cistos dos Maxilares e Pescoço. **Patologia Bucal – Correlações Clinicopatológicas**. 5. ed. Rio de Janeiro. Elsevier.cap. 10: 237-259,2008.

RICCUCCI, D.; MANNOCCI, I.F.; FORD, T.R.A. Study of periapical lesions correlating the presence of a radiopaque lamina with histological findings .**Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 101 (3) :389- 94, 2006.

RICCUCCI, D.; SIQUEIRA, Jr.; LOPES, W.S.P.; VIEIRA, A.R.; ROÇAS, I.N. Extraradicular Infection as the Cause of Persistent Symptoms: A Case Series. **JOE.** 2014.

RIVOLLIER, A.; MAZZORANA ,M.; TEBIB, J.; PIPERNO, M.; AITSISELMI, T.; RABOURDIN-COMBE, C.; JURDIC, P.,; SERVET-DELPRAT, C. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. **Blood.** 104:4029–37, 2004.

SAIDI, S.; BOURI, F.; LENCEL, P. IL-33 is expressed in human osteoblasts, but has no direct effect on bone remodeling. **Cytokine.** 53 (3): 347-354, 2011.

SAFI, L.; ALIREZA, A.; AZAR, MR.; AKBARY, R.A. Twenty-year Survey of Pathologic Reports of Two Common Types of Chronic Periapical Lesions in Shiraz Dental School. **JODDD.** 2(2), Spring , 2008.

SCHILLING, A.F.; MÜLHAUSEN, C.; LEHMANN, W.; SANTER, R.; SCHINKE, T.; RUEGER, J.M.; AMLING, M. High bone mineral density in pycnodysostotic patients with a novel mutation in the propeptide of cathepsin K. **Osteoporos Int.** 18:659–69, 2007.

SCHULZ, M.; VON ARX, T.; ALTERMATT, H.J. Histology of Periapical Lesions Obtained During Apical Surgery. **J Endod.** 35 (5), 2009.

SILVA, I.; BRANCO, J.C. RANK/RANKL/OPG: Literature review. **ACTA Reumatol Port.** 36: 209-218, 2011.

SIMS, N.A.; GOOI, J.H. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of boneformation and resorption. **Seminars in Cell & Developmental Biology**.19:444–451,2008.

SKORDIS, N.; EFSTATHIOU, E.; KYRIAKOU, A.; TOUMBA, M. Hormonal dysregulation and bones in thalassaemia: an overview. **Pediatr Endocrinol Rev**. 6:107-15,2008.

TEIXEIRA-SALUM, T.B.;RODRIGUES, D.B.R.; GERVÁSIO, A.M.;SOUZA, C.J.A.; *et al.* Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. **J Oral Pathol Med**. 39: 250-26, 2010

TELLTELBAUM, S.L. Bone resorption by osteoclastos. **Science**.289: 1504-8, 2000.

TEKKESIN, M.S.; MUTLU,S.; OLGAC,V. The Role of RANK/RANKL/OPG Signalling Pathways in Osteoclastogenesis in OdontogenicKeratocysts, Radicular Cysts, and Ameloblastomas.**Head and Neck Pathol**. 5: 248–253, 2011.

TROPE, M. Immature Tooth with a Non–Vital Pulp and Apical Periodontitis. **Dent ClinNam**54: 313–324,2010.

TSAI, C.H.; WENG , S.F.; YANG, L.C.; HUANG, F.M.; CHEN, Y.J.; CHANG, Y.C. Immunohistochemical localization of tissue-type plasminogen activator and type I plasminogen activator inhibitor in radicular cysts. **J Oral Pathol Med**. 33 (3): 156-61, 2004.

TYROVOLA, J.B.; SPYROPOULOS, M.N.; MAKOU, M.; PERREA, D. Root resorption and OPG/RANKL/RANK system: a mini review. **Journal of Oral Science**.50 (4): 367-376, 2008.

VELICKOVIC, M.; PEJNOVIC, N.; PETROVIC, R.; MITROVIC,S.; JEFTIC, I.;KANJEVAC, T.; LUKIC, A. Expression of interleukin-33 and its receptor ST2 in periapical granulomas and radicular cysts.**J Oral Pathol Med**. 2015.

VERNAL, R.; DEZEREGA, A.; DUTZAN, N.; CHAPARRO, A.; LEÓN, R.; CHANDÍA , S.; SILVA, A.; GAMONAL, J. Rankl in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. **Oral Diseases**.12: 283-289,2006.

VILLARREAL, D.O.; WEINER, D.B. Interleukin 33:a switch- hitting cytokine. **Current Opinion in Immunology**. 28:102-106,2014.


XIONG, J.; ONAL, M.; JILKA, R.L.; WEINSTEIN, R.S.; MANOLAGAS, S.C.; O'BRIEN, C.A. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. **Nat Med**. 17(10):1235–1241,2012.

WANG, C.T.; LIN, Y.T.; CHIANG, B.L.; LEE, S.S.; HOU, S.M. Over-expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand(RANKL), inflammatory cytokines, and chemokines in periprostheticosteolysisofloosened total hip arthroplasty. **Biomaterials**. 31: 77-82, 2010.

YAMALIK, N.; GÜNDAY, S.; UYSAL, S.; KILINÇ, K.; KARABULUT, E.; TÖZÜM, T,F. Analysis of Cathepsin K activity at tooth and Dental implant sites and the potencial of this enzyme in reflecting alveolar bone loss. **J Periodontol**. 83:498-505, 2012.

ZHANG, M.; YU ,Y.; MIAO, Y. The expression and significance of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerininperiapical cyst and periapical granuloma. **West China JournalofStomatology.** 30(4), Aug,2012.

ANEXO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
FEIRA DE SANTANA - UEFS 

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Imunodeteção de Fatores Osteoclastogênicos em Lesões Periapicais Inflamatórias Crônicas Humanas

Pesquisador: Valéria Souza Freitas

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 05941712.2.1001.0053

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Feira de Santana

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 140.524

Data da Relatoria: 27/11/2012

Apresentação do Projeto:

Segundo a autora, "o estudo será caracterizado por uma pesquisa retrospectiva e descritiva, constituída pela análise e registro da expressão imunoistoquímica do RANKL, TNF, IL-6, cathepsina K, OPG, IL-10 e IL-33 em granulomas periapicais (GPs), cistos radiculares (CRs) e cistos radiculares residuais (CRRs), objetivando correlacionar a expressão destes biomarcadores com as características clínico-morfológicas e observar a

relação com o comportamento biológico das lesões".

De acordo com o Projeto de Pesquisa apresentado a amostra do estudo será constituída por todos os casos registrados, diagnosticados e armazenados no Laboratório de Patologia Bucal da UEFS e no Laboratório de Patologia Cirúrgica da UFBA. Será constituída por 90 casos de lesões periapicais inflamatórias crônicas, distribuídos em: 30GPS, 30 CRs e 30CRRs. Os critérios de inclusão na amostra obedecerão aos aspectos descritos a seguir e deverão estar descritos nas fichas de encaminhamento de biópsia dos referidos casos e/ou

nas imagens radiográficas disponíveis.(1) quantidade suficiente de tecido no bloco de parafina arquivado;(2) condições de armazenamento dos espécimes, Para os GPs, serão selecionados os casos com ausência de qualquer remanescente de epitélio odontogênico disperso no tecido conjuntivo constituinte da lesão. Para as lesões císticas, serão incluídos somente os espécimes que exibirem uma cavidade patológica revestida total ou

parcialmente por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado, o qual apresente subjacente uma quantidade suficiente de cápsula fibrosa para realização das avaliações morfológica e

Endereço: Km 03 - BR 116- Campus Universitário
Bairro: Módulo I **CEP:** 44.031-460
UF: BA **Município:** FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3151-8067 **E-mail:** cep.uefs@yahoo.com.br

imunohistoquímica. No caso dos granuloma periapicais e cistos radiculares deverá ser comprovada a existência de um dente com comprometimento pulpar associado à lesão. Serão excluídos dos arquivos, os casos dos arquivos dos laboratórios de patologia da UEFS e UFBA que não apresentem o diagnóstico das lesões periapicais inflamatórias crônicas a serem estudadas e não atendam aos demais critérios de inclusão propostos.

Delimitada a amostra de estudo, posteriormente será feita a análise clínica, morfológica, o estudo imunohistoquímico e a análise estatística dos dados.

O orçamento da pesquisa é de R\$ 20.700,00. Descreve detalhadamente a contrapartida da UEFS e apresenta o cronograma de acordo com as atividades propostas.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a expressão imunohistoquímica de fatores estimuladores (RANKL, TNF alfa, IL-1alfa, IL-6, IL-17 e catepsina K) e inibidores (OPG, IL-10, IL-33 e interferon-gamma - IFN-gamma) de atividade osteoclastogênica em uma série de casos de lesões periapicais crônicas (GPs, CRs e CRRs). Após correlação da expressão destes biomarcadores com aspectos clínicos e morfológicos de cada lesão estudada, bem como investigação de possíveis correlações entre diferentes níveis de atividade osteolítica e o crescimento das lesões, pretende-se

contribuir para uma maior compreensão sobre a etiopatogenia e envolvimento destes fatores no processo de reabsorção óssea dos GPs, CRs e CRRs.

Objetivos Secundários:

-Correlacionar a expressão das proteínas propostas com os fatores clínicos: tamanho da lesão e história de tratamento endodôntico prévio.

-Correlacionar a expressão das proteínas propostas com as características morfológicas: intensidade e qualidade do infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo/cápsula; e com a espessura do revestimento epitelial nas lesões císticas.

- Correlacionar a expressão da catepsina K com as outras proteínas do estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Na avaliação de riscos considera apenas os riscos físicos, pois classifica os riscos do estudo como mínimos, pois será realizado a partir das fichas de biópsia, lâminas histológicas e material armazenado em bloco parafinado procedentes de biópsias previamente realizadas e armazenadas no Laboratório de Patologia Cirúrgica da UFBA e no Laboratório de Patologia Bucal da UEFS porém, não considera riscos de outra natureza.

Ressalta como Benefício da pesquisa o reexame da biópsia feito por pesquisadores da área de patologia oral, acesso ao exame caso desejem, podendo ainda contar com orientação, acompanhamento periódico e tratamento das lesões por profissionais na Clínica da UEFS mas não fica claro como será feito o encaminhamento dos Sujeitos da Pesquisa que venham a precisar de

Endereço: Km 03 - BR 116- Campus Universitário
Bairro: Módulo I CEP: 44.031-460
UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep.uefs@yahoo.com.br

um atendimento de saúde de maior complexidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é bem fundamentado, possui bibliografia vasta, metodologia cuidadosamente descrita, porém precisa melhor detalhamento sobre a abordagem dos sujeitos da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta todos os termos de apresentação obrigatória, embora esteja ausente a identificação do Biólogo que participará da equipe.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FEIRA DE SANTANA, 07 de Novembro de 2012

Assinador por:
Maria Angela Alves do Nascimento
(Coordenador)

Endereço: Km 03 - BR 116- Campus Universitário
Bairro: Módulo I CEP: 44.031-460
UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8057 E-mail: cep.uefs@yahoo.com.br