



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Instituto de Ciências Biomédicas**

**Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

MON  
577.112  
T266d  
TES/ME

***Determinação de óxido nítrico e citocinas  
(TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-4) em lesões periapicais  
humanas.***

*Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa  
de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia  
Aplicadas como parte de obtenção do título de Mestre.*

Aluna:

TATIANA BERBER TEIXEIRA

Orientador:

Prof. Dr. ADRIANO MOTA LOYOLA

**Uberlândia-MG – Brasil  
Fevereiro - 2003**

**SISBI/UFU**



1000209175



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Instituto de Ciências Biomédicas**

**Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

***Determinação de óxido nítrico e citocinas  
(TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-4) em lesões periapicais  
humanas.***

*Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa  
de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia  
Aplicadas como parte de obtenção do título de Mestre.*

Aluna:

TATIANA BERBER TEIXEIRA

Orientador:

Prof. Dr. ADRIANO MOTA LOYOLA

Co-orientador:

Prof. Dr. VIRMUNDES RODRIGUES JÚNIOR

**Uberlândia-MG – Brasil  
Fevereiro - 2003**

*Dedico este trabalho ...*

*Ao meu grande amor, Rodrigo.*

*Por ser esta pessoa maravilhosa, me apoiando em todos os momentos de minha vida. Ao seu lado grandes obstáculos se tornam pequeninos.*

*À minha querida irmã, Tércia.*

*Mesmo distante, sempre presente.*

*A Deus.*

*Por me iluminar quando a escuridão prevalecia.*

*E aos professores*

*Dr. Adriano Mota Loyola*

*Dr. Virmondes Rodrigues Júnior.*

*" Homem algum poderá revelar-vos  
senão o que já está meio adormecido na  
aurora do vosso entendimento.*

*O mestre que caminha à sombra do templo,  
rodeado de discípulos, não dá de  
sua sabedoria, mas sim de sua fé e sua ternura.*

*Se ele for verdadeiramente sábio,  
não vos convidará a entrar na mansão do  
seu saber, mas vos conduzirá antes ao limiar  
de vossa própria mente".*

*(Gibran Khalil Gibran)*

*“Tudo a nossa volta está mudando constantemente. A cada dia, o sol ilumina um mundo novo. Aquilo que achamos rotina está repleto de novas propostas e oportunidades. Mas não percebemos que cada dia é diferente do anterior. Hoje, em algum lugar, um tesouro nos espera. Pode ser um pequeno sorriso, pode ser uma grande conquista – não importa. A vida é feita de pequenos e grandes milagres.”*

*(Paulo Coelho)*

*Agradecimento Especial*

*Agradeço aos meus queridos pais,  
Tarquilino e Neyde. “Semeando meu caminho,  
proporcionaram-me a colheita de belos frutos.”*

## **AGRADECIMENTOS:**

*Agradeço aos professores, cuja colaboração foi imprescindível para a conclusão deste trabalho.*

*Prof. Dr. Adriano Mota Loyola,*

*Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior*

*Profa. Denise Bertolucci Rodrigues*

*Agradeço aos pacientes, por permitirem a coleta das espécimes necessárias ao trabalho.*

*Agradeço a todos que colaboraram com a obtenção de amostras, reagentes, recursos técnicos e sugestões valiosas para o desenvolvimento deste trabalho.*

*Cirurgiões-dentistas: Ari Alves, Aurélia Martins Gervásio, Cássio José Alves Souza, Mário Carício, Raimundo Halid, Rodrigo Pugliari, Túlio Humberto Spini. Aos técnicos de laboratório: Betânia Maria Ribeiro, Carlos Alberto Mota Araújo, Regina das Dores Maia Queirós e Mônica Miguel Sawam Mendonça.*

*Agradeço à Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro e à Policlínica Getúlio Vargas da Universidade de Uberaba por auxiliarem no desenvolvimento deste trabalho.*

*Agradeço aos colegas de curso que colaboraram com incentivo, apoio e valiosa amizade.*

*Agradeço às amigas Ana Carolina Pitondo, Andréa e Danusa por me receberem sempre de braços abertos em sua residência em minhas estadias em Uberlândia.*

*Ao curso de pós-graduação, que me deu a preciosa oportunidade de conhecer pessoas incríveis, estando hoje preenchendo minha vida de maneira muito especial...*

**Trabalho desenvolvido no Laboratório de Imunologia da  
Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas  
Gerais e no Laboratório de Imunologia da Faculdade de  
Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais.  
Com auxílio financeiro da CAPES, CNPq e FAPEMIG.**



## SUMÁRIO:

	Página
RESUMO	01
ABSTRACT	02
1- INTRODUÇÃO	03
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
3- OBJETIVOS	25
4- MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1- Casuística	27
4.2- Informações clínicas	28
4.3- Coleta da amostras	28
4.4- Processamento das amostras teciduais	29
4.5- Processamento do líquido cístico	31
4.6- Ensaio imunoenzimático (ELISA) padrão para a detecção de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e TGF- $\beta$ .	31
4.7- Dosagem de nitrito/nitrato pela reação de GRIESS	33
4.8- Expressão dos Resultados	34
4.9- Análise Estatística	34
5- RESULTADOS	35
6- DISCUSSÃO	50
7-CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	88

## RESUMO:

**Objetivo:** Citocinas e óxido nítrico estão envolvidas na patogênese das lesões apicais. O propósito deste estudo foi avaliar a presença de óxido nítrico e citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-4) em cistos e granulomas periapicais, e determinar a relação entre estas moléculas e os sinais clínicos e radiográficos de cada paciente.

**Materiais e métodos:** Foram analisadas um total de 47 lesões periapicais (30 granulomas apicais e 17 cistos radiculares). Óxido nítrico e citocinas foram dosados pelos métodos de GRIESS e ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) respectivamente.

**Resultados:** TNF- $\alpha$  foi detectado em 10% dos granulomas periapicais (valores não detectáveis à 25 pg/g) e 41,2% dos tecidos de cistos radiculares (valores não detectáveis à 25 pg/g), IFN- $\gamma$  foi detectado em 70% das amostras de tecido cístico (valores não detectáveis à 50 pg/g), e em 10% dos granulomas (valores não detectáveis à 15 pg/g). Para óxido nítrico encontramos 29% de amostras teciduais císticas positivas (valores não detectáveis à 40 pg/g) e em granulomas 20% (valores não detectáveis à 40 pg/g). IL-4 foi detectada em 24% das amostras teciduais de cistos (valores não detectáveis à 25 pg/g.) e nenhuma de granulomas. TGF- $\beta$  foi detectado em todas amostras teciduais de cistos (1250 pg/g à 2500 pg/g) e granulomas (2000 pg/g à 7500 pg/g). Quanto à sintomatologia analisada, observamos níveis estatisticamente significantes de IFN- $\gamma$  e IL-4 em pacientes que apresentavam dor espontânea e/ou palpação, e IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-4 em pacientes que apresentavam aumento de volume. Quanto às lesões que apresentavam imagens radiográfica difusa, observamos níveis significantes de óxido nítrico.

**Conclusões:** Óxido nítrico e citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-4) estão envolvidos na patogenia das lesões periapicais. Dessa forma, estariam auxiliando no processo inflamatório e de reabsorção óssea, bem como, nos sinais clínicos e radiográficos característicos destas lesões.

**Palavras chaves:** citocinas, óxido nítrico, lesões periapicais, cisto radicular, granuloma periapical.

**ABSTRACT:**

**Objectives:** Citokines and nitric oxide have been involved in development of periapical lesions. The aim of this study was evaluated the levels of nitric oxide and citokynes (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  and IL-4) in human radicular cysts and granulomas and determine possible associations between it and the clinical and radiographic signs related by this patients.

**Materials and methods:** Forth seven (47) chronic periapical lesions were analysed in this study (17 radicular cysts and 30 periapical granulomas). Nitric oxide and citokynes levels were evaluated by GRIESS and ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) respectively.

**Results:** Citokynes and nitric oxide were detected in all of granulomas and radicular cysts tissue samples. TNF- $\alpha$  was detected in 10% of the periapical granulomas (no detectable to 25 pg/g) and 41,2% of the radicular cysts samples (no detectable to 25 pg/g), For IFN- $\gamma$  70% of the radicular tissue cysts (no detectable to 50 pg/g), and 10% of the granulomas (no detectable to 15 pg/g) were positive. We found 29% of the cystic samples (no detectable to 40 pg/g) and 20% of the granulomas (no detectable to 40 pg/g) positive for NO. IL-4 was reative in 24% of the radicular cysts tissue but (no detectable to 25 pg/g.) no IL-4 was detected in any samples of the granulomas. On the other hand, TGF- $\beta$  was positive in all samples of cysts (1250 pg/g to 2500 pg/g de tecido) and granulomas (2000 pg/g to 7500 pg/g). No correlation could be found between cystic tissue and fluid samples for citokynes and no levels. A statistical significant correlation was found association between IFN- $\gamma$  and IL-4 levels and tenderness and TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-4 and swelling of the lesions. The lesions with diffuse radiographic limites were statically associated with nitric oxide.

**Conclusions:** Nitric oxide and citokynes (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  and IL-4) were involved in pathology of periapical lesions. It may be participating of the inflammatory process and growth this lesions, as well as, of the bone resorption and syntoms that are characteristic features of that lesions.

**Key words:** citokynes, nitric oxide, periapical lesions, radicular cysts, periapical granulomas.

## **1. INTRODUÇÃO:**

O cisto radicular (KRAMER *et al.*, 1991) é uma lesão odontogênica inflamatória periapical, caracterizada pela presença de uma cavidade patológica revestida por epitélio pavimentoso estratificado, e tecido conjuntivo, contendo no seu interior, material líquido ou semi-sólido. Granulomas periapicais são lesões radiculares comuns que são caracterizadas histopatologicamente como uma massa delimitada de resposta inflamatória crônica no tecido conectivo periapical (YANAGISAWA, 1980). Os maiores estímulos para o desenvolvimento do cisto radicular têm sido as endotoxinas bacterianas decorrentes da infecção da polpa necrótica e os antígenos gerados pela degradação do tecido pulpar que suscitam uma resposta inflamatória, formando, inicialmente, um granuloma apical. O processo inflamatório gerado estimularia a proliferação dos remanescentes epiteliais de Malassez, resultantes da morfogênese da raiz, levando à formação do cisto radicular. Os microorganismos que colonizam os canais radiculares são freqüentemente, mas não exclusivamente, gram -negativos e anaeróbios obrigatórios. No crescimento do cisto radicular, vários fatores têm sido implicados, entre os quais: atividade proliferativa

epitelial, desenvolvimento de uma pressão hidrostática na cavidade e a reabsorção óssea é uma das conseqüências danosas do seu desenvolvimento, podendo ser responsável por fraturas patológicas, parestesia e perda de elementos dentários (SILVA, 1995).

Pouco se conhece dos fatores envolvidos neste processo. Contudo, no ambiente da inflamação periapical, são sintetizadas diferentes citocinas que, de um lado, atuam mediando o processo inflamatório e, de outro, podem estar associadas ao processo de reabsorção óssea local. Assim, sua presença pode estar intimamente associada à destruição do tecido ósseo circunvizinho, tendo papel crítico no crescimento da lesão cística (TAKEICHI *et al.*, 1996).

Linfócitos  $CD_4^+$ ,  $CD_8^+$ ,  $CD_{30}^+$ , macrófagos, plasmócitos, mastócitos e eosinófilos (YANAGISAWA, 1980; SMITH *et al.*, 1987; TERONEN *et al.*, 1996; CURY *et al.*, 1998) e diferentes citocinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e GM-CSF) tem sido encontradas em quantidades variadas, cujo significado na modulação do processo inflamatório e na reabsorção óssea necessita melhor avaliação (KOPP & SCHWARTING, 1989, STASHENKO, 1990; EVANS & RALSTON, 1996, TAKEICHI *et al.*, 1996; KABASHIMA *et al.*, 1998; CURY *et al.*, 1998; LIN *et al.*, 2000; GERVÁSIO *et al.*, 2002). Isto, em parte, repousa na análise conjunta de dados provenientes de estudos experimentais (em animais), *in vitro* e de lesões periapicais em humanos (CURY *et al.*, 1998, KAWASHIMA & STASHENKO, 1999; SUZUKI *et al.*, 1999; WALKER *et al.*, 2000; GERVÁSIO *et al.*, 2002).

Componentes da parede celular bacteriana, em particular lipopolissacarídeos de bactérias gram negativas, reagem com monócitos/macrófagos, fibroblastos e outras células do sistema imune, e levam à produção de citocinas pró inflamatórias, como: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ,

TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-8 e também citocinas anti inflamatórias como TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10 (DANIN *et al.*, 2000).

Embora diferentes estudos em lesões periapicais humanas associem a presença destas citocinas à mediação do crescimento e reabsorção óssea na lesão periapical em humanos, há uma aparente ausência de estudos que investiguem sua correlação neste modelo. Por outro lado, poucos estudos investigaram seu significado na sintomatologia das lesões periapicais (MATSUO *et al.*, 1992; LIM *et al.*, 1994). Os objetivos deste trabalho foram identificar e quantificar a presença de IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4, TGF- $\beta$  e óxido nítrico, relacionando suas identificações com sinais clínicos e radiográficos em pacientes com lesões periapicais humanas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:**

As lesões inflamatórias periapicais crônicas são representadas principalmente por granulomas e cistos periapicais, que se originam a partir de contínuas estimulações antigênicas provindas do canal radicular. São caracterizadas histologicamente pela presença de tecido de granulação com infiltrados de células inflamatórias mononucleares, como monócitos/macrófagos, linfócitos, plasmócitos, mastócitos e granulócitos (NILSEN *et al.*, 1984). A formação destas lesões está associada com perda óssea ao redor do ápice radicular, resultando em áreas radiolúcidas que podem ser observadas radiograficamente. Os granulomas periapicais são resultados de uma resposta inflamatória local mediada por infiltrado de células inflamatórias e uma variedade de fatores, incluindo citocinas e óxido nítrico (KABASHIMA *et al.*, 1998). Os cistos radiculares são uma das lesões mais comuns dos maxilares (KRAMER *et al.*, 1991). São de origem odontogênica e inflamatória, situados na região periapical dentária. São caracterizados pela presença de uma cavidade patológica revestida por epitélio, contendo no seu interior, material líquido ou semi-sólido. Estruturalmente, a lesão cística é constituída por uma cápsula, formada por tecido

conjuntivo fibroso denso, permeado por infiltrado inflamatório, em geral mononuclear, e revestida, interiormente, por epitélio pavimentoso estratificado, não queratinizado, com graus variáveis de organização (BROWNE, 1992). Os maiores estímulos para o desenvolvimento do cisto radicular têm sido as endotoxinas bacterianas decorrentes da infecção da polpa necrótica e dos antígenos gerados pela degradação do tecido pulpar que suscitam uma resposta inflamatória. Embora apresente comportamento benigno, seu crescimento leva à destruição e comprometimento da integridade óssea local. Não raro, o cisto radicular permanece no tecido ósseo após a remoção do dente afetado, sendo referido então, como cisto residual (SHEAR, 1983).

Diferentes hipóteses sobre a patogênese do cisto radicular têm sido consideradas na literatura (SHEAR, 1983; TORABINEJAD, 1983; HÖENIG *et al.*, 1991; BROWNE, 1992). A mais freqüentemente citada admite que inicialmente, haveria proliferação dos remanescentes epiteliais de Malassez resultantes da morfogênese radicular, presentes junto à abertura do forame periapical, formando um aglomerado celular sólido (granuloma apical). Num segundo momento, em função da necrose das células centrais, dar-se-ia a formação da cavidade cística. Resíduos celulares, decorrentes da necrose central, seriam responsáveis pelo desenvolvimento de uma pressão osmótica diferenciada entre o meio externo e a cavidade cística, favorecendo a entrada de líquido para seu interior. Lipopolissacarídeo, produtos metabólicos, proteínas do soro (albumina e globulinas), glicosaminoglicanas, proteoglicanas, glicoproteínas, colágeno e enzimas proteolíticas presentes na cápsula e "filtradas" para o lúmen cístico contribuiriam para a manutenção desta diferença de pressão. A ausência de drenagem linfática no interior da cavidade favoreceria o desenvolvimento de uma pressão hidrostática no interior da mesma, forçando as paredes da lesão cística contra o tecido ósseo circunjacente, induzindo a osteólise. O



processo de reabsorção óssea é uma das conseqüências danosas do seu crescimento, podendo ser responsável por fraturas patológicas, parestesia e perda de elementos dentários (SHEAR, 1983; SHAFER *et al.*, 1985; SMITH *et al.*, 1988; BROWNE, 1992).

No processo de formação e crescimento da lesão cística, a resposta inflamatória parece ser fundamental (STASHENKO, 1990). Mediadores químicos e da resposta imune, aí liberados, exerceriam não só um efeito blastogênico sobre o tecido epitelial, como também atuariam na interface óssea, favorecendo fenômenos reparadores e de reabsorção óssea (TORABINEJAD, 1983; STASHENKO, 1990; BROWNE, 1992).

Em linhas gerais, os processos inflamatórios periapicais assumem características semelhantes àqueles desenvolvidos em outros locais do organismo. Os fenômenos irritativos, que inicialmente têm lugar no tecido periapical, estão associados à liberação de substâncias antigênicas teciduais e bacterianas (lipopolissacarídeos, ácido lipoteicóico, peptidoglicanos), originada no curso da necrose e infecção pulpar (SHAFER *et al.*, 1985; TORABINEJAD, 1986; BROWNE, 1992; SELTZER & FARBER, 1994; SUNDQVIST, 1994; KURIHARA *et al.*, 1995; MEGHJI *et al.*, 1996).

A interação dos antígenos com os mecanismos de defesa do hospedeiro resultam na liberação de mediadores celulares e plasmáticos, que induzem e modulam diferentes fenômenos do processo inflamatório na sua fase aguda, a saber: vasodilatação e aumento da permeabilidade (neuropeptídeos, histamina, peptídeos fibrinolíticos, cininas, C3a, C5a, enzimas lisossomais, prostaglandinas E, leucotrienos, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub>, óxido nítrico), quimiotaxia para células inflamatórias (fibrinopeptídeos, leucotrienos, C5a), bem como aqueles relacionados à fase crônica, onde os fenômenos imunológicos participam de forma significativa. Neste sentido, ganha realce a participação de diferentes tipos de citocinas no processo de inter-ativação celular na mediação de fenômenos imunológicos celulares e

humorais. Algumas delas com ação lítica direta ou indireta sobre os tecidos locais (TORABINEJAD *et al.*, 1985; TORABINEJAD & KETTERING, 1985; HÖENIG *et al.*, 1991; LERNER, 1994; TORABINEJAD, 1994; RUBIN & FARBER, 1999).

A principal característica da resposta inflamatória na lesão cística é o seu caráter crônico. Este padrão de resposta é basicamente determinado pela persistência do agente agressor no ambiente periapical, em função de sua contínua liberação a partir do conduto radicular. Utilizando anticorpos monoclonais, Nilsen *et al* (1984), identificaram a presença de linfócitos T, B, células *natural killer* (NK), plasmócitos e macrófagos. Os autores encontraram uma relação de 2:1 entre os linfócitos CD<sub>4</sub> auxiliares e CD<sub>8</sub> citotóxicos. Através de técnica imunohistoquímica, Matsuo *et al* (1992), demonstraram em tecidos de granulomas e cistos periapicais humanos, a presença de 50% das células do infiltrado mononuclear apresentando imunoglobulinas de membrana (85% de IgG, 15% de IgA e 2% de IgM), 40% de células T (2/3 de CD<sub>4</sub><sup>+</sup> ou auxiliar, 1/3 de CD<sub>8</sub><sup>+</sup> ou célula T citotóxica/supressora) e 10% de monócitos ou macrófagos. Outros trabalhos têm identificado linfócitos T e B como células predominantes em lesões periapicais humanas (TORABINEJAD & KETTERING, 1985; GAO *et al.*, 1988; KABASHIMA *et al.*, 1998) desempenhando importante papel na resposta imune específica celular e humoral.

Maior proporção de linfócitos T auxiliares e células B tem sido relatado em lesões periapicais de dentes não tratados em relação às lesões de dentes tratados endodonticamente (ALAVI *et al.*, 1998). A presença destas células falaria a favor da ocorrência de fenômenos imunológicos associados à progressão da lesão.

Estudando cistos radiculares, Silva (1995), encontrou uma predominância de plasmócitos no infiltrado inflamatório na maioria das lesões císticas, da ordem de 36,9%. Neutrófilos corresponderam a 14%, linfócitos T 13%, macrófagos 10,2% e linfócitos B

7,2%. Foram também observadas células de Langerhans na proporção de 2%. Os resultados indicaram a participação tanto da resposta imune celular quanto da humoral na patogênese das lesões císticas. Segundo Cury *et al* (1998), o estágio de desenvolvimento cístico - atividade biológica ativa ou em latência - pode ser importante na determinação do tipo de resposta que poderia estar ocorrendo, porém não existem parâmetros clínicos que possam expressar a atividade biológica das lesões radiculares.

A maioria dos estudos envolvendo a marcação de linfócitos em lesões periapicais humanas, têm observado uma grande quantidade de células T no infiltrado inflamatório. Estes estudos, têm demonstrado a importância de células T  $CD_4^+$  e T  $CD_8^+$  no desenvolvimento inicial bem como, na perpetuação das lesões periapicais (AKAMINE *et al.*, 1994; STASHENKO *et al.*, 1994). Em relação à linhagem de células T envolvidas nas lesões periapicais, Nilsen *et al* (1984), usando microscopia de imunofluorescência indireta, encontraram que células T-auxiliares (células T  $CD_4^+$ ) foram mais abundantes do que células T supressoras/citotóxicas (células T  $CD_8^+$ ). Walker *et al* (2000), encontraram maior quantidade de células T  $CD_4^+$  e células T  $CD_8^+$  em granulomas periapicais quando comparados com cistos radiculares, que se mostrou estatisticamente significativa. Entretanto, Rodini & Lara (2001), demonstraram, por imunohistoquímica, significativa predominância de células T  $CD_8^+$  em cistos radiculares quando comparados com granulomas periapicais. Estes autores sugerem que células T  $CD_8^+$  gerariam um fenômeno supressor durante a fase tardia da lesão. Nesta fase, a cavidade cística é formada por mediadores químicos e a lesão parece estabilizar com significantes períodos de quiescência. Desta forma, tanto em cistos radiculares quanto em granulomas periapicais, a presença de células T  $CD_8^+$  espalhadas pela lesão indicaria a prevenção de uma excessiva resposta imune evitando a perda dental.

A presença de macrófagos nas lesões periapicais é extremamente importante para o desenvolvimento e perpetuação das reações inflamatórias. Todavia, sua frequência em granulomas periapicais e em cistos radiculares tem variado. Os macrófagos teriam papéis importantes tanto na fagocitose quanto na formação de mediadores essenciais na ativação de respostas imunes celular e humoral. Por análise imunohistoquímica, Rodini & Lara (2001), identificaram uma grande proporção de macrófagos em cistos (28,6%) e em granulomas apicais (36,2%). Entretanto, Kopp & Schwarting (1989), relataram que células  $CD_4^+$ , células  $CD_8^+$  e macrófagos foram encontradas em quantidades significativamente maiores em cistos radiculares do que em granulomas. Os autores discutem que os macrófagos seriam a primeira linha de defesa local, sendo responsáveis pela fagocitose e produção de prostaglandinas E, óxido nítrico, enzimas e citocinas em resposta à bactérias do canal radicular infectado. Citocinas como IL-1 (Interleucina-1) e TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ ) são conhecidas por estimular reabsorção óssea e inibir a reparação óssea, contribuindo para a expansão de lesão (STASHENKO, 1990; EVANS & RALSTON, 1996). Além disso, macrófagos estariam envolvidos em alguns sinais clínicos e sintomas característicos de lesões periapicais como inchaço (edema) e sensibilidade à percussão e palpação (MATSUO *et al.*, 1992).

Menor proporção de mastócitos têm sido encontrados tanto em cistos como em granulomas apicais (PULVER *et al.*, 1978; YANAGISAWA, 1980; STERN *et al.*, 1981; KONTIAMEN *et al.*, 1986; SMITH *et al.*, 1987). Os mastócitos contêm numerosos grânulos citoplasmáticos que são liberados após sua ativação. Estes grânulos contêm mediadores vasoativos (fator de ativação de plaquetas, mediadores quimiostáticos e algumas citocinas pró-inflamatórias como IL-3, IL-6 e TNF- $\alpha$  e anti-inflamatórias como IL-4) (WONDER-FILIPOWICZ *et al.*, 1989). Grande número de mastócitos degranulados

na área de expansão cística (borda da lesão cística com a parede óssea) tem sido observado, indicando intensa atividade destas células nesta região (TERONEN *et al.*, 1996).

Como foi brevemente revisto, tanto o granuloma como o cisto radicular, são caracterizados por uma resposta inflamatória rica em mediadores e células que medeiam fenômenos imunológicos. Tem sido sugerido que estes fatores patrocina o processo de reabsorção óssea, durante o crescimento das lesões (STASHENKO, 1990; HÖENIG *et al.*, 1991; WANG & STASHENKO, 1993; FORMIGLI *et al.*, 1995; ZECCHI-ORLANDINI *et al.*, 1996).

#### CITOCINAS, ÓXIDO NÍTRICO E IMUNO-MODULAÇÃO NA PATOGENIA DAS DOENÇAS PERIAPICAIS.

Outros mediadores da resposta imune específica e inespecífica são as citocinas. Estas proteínas solúveis atuam em vários tipos celulares (pleiotropismo), com múltiplos e diferentes efeitos, por vezes redundantes. Em geral, são sintetizadas em resposta a estímulos inflamatórios e antigênicos, atuando localmente, de modo autócrino ou parácrino, por meio de ligação a receptores de alta afinidade existentes nas células-alvo. Podem atuar como fatores de crescimento, como elo de ligação entre a imunidade específica e a imunidade natural ou como reguladoras da magnitude da natureza das respostas imunes por influenciar o crescimento e diferenciação de linfócitos (PAUL, 1998; ABBAS *et al.*, 2000).

A partir de estudos das citocinas produzidas por clones de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> em camundongo, Mosmann *et al* (1986), mostraram que haviam duas diferentes subpopulações de células T que foram divididas em grupos baseados na função e nos padrões de secreções de citocinas. A subpopulação que produzia IL-2, IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) e linfotóxina foi denominada Th<sub>1</sub>, enquanto a subpopulação que produzia IL-4, IL-5, e IL-10 foi designada como Th<sub>2</sub>. Posteriormente um terceiro grupo foi identificado, o Th<sub>0</sub>, com capacidade de

produzir citocinas de ambos os tipos e considerado como provável precursor das subpopulações Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> (FIRESTEIN *et al.*, 1989; MOSMANN & MOORE, 1991; VELLA & PEARCE, 1992). Sabe-se também que citocinas de células Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> podem regular-se mutuamente, sendo exemplo disto o IFN- $\gamma$ , produzido por células Th<sub>1</sub>, que inibe a proliferação de células Th<sub>2</sub> e produção de IL-10, enquanto que citocinas produzidas por células Th<sub>2</sub> inibem a síntese de citocinas por células Th<sub>1</sub> (GAJEWSKI & FITCH 1988; FIORENTINO *et al.*, 1991; MOSMANN & MOORE, 1991). No entanto, Letterio & Roberts (1998), conceituaram um outro subgrupo de linfócitos T denominado Th<sub>3</sub>, o qual produz TGF- $\beta$  (Fator de crescimento tumoral  $\beta$ ) e parece estar envolvido em mecanismos imunossupressores, enquanto Groux *et al* (1997), afirmaram existir uma subpopulação de células CD<sub>4</sub><sup>+</sup> capazes de produzir IL-10 e TGF- $\beta$ , mas não IL-4, que foi denominada Tr1 ("T regulatory 1").

A resposta Th<sub>1</sub> tem sido relacionada com a resposta imune mediada por células, enquanto a resposta Th<sub>2</sub> tem um envolvimento direto com a produção de IgE, mediando a inflamação e caracterizando a resposta pela ativação de mastócitos e eosinófilos como se observa na asma, na resposta imune aos parasitas e a alguns fungos (MOSMANN *et al.*, 1986; ROBINSON *et al.*, 1992; BARNER *et al.*, 1998).

Nas lesões periapicais, componentes da parede celular de bactérias, particularmente lipopolissacarídeos de bactérias gram negativa, reagem com monócitos/macrófagos, fibroblastos e outras células do sistema imune, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 e também citocinas anti-inflamatórias como TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10 (DANIN *et al.*, 2000).

A IL-1 possui as formas  $\alpha$  e  $\beta$  com mesmo peso molecular, porém, somente 26% de seqüências de aminoácidos homólogos (MARCH *et al.*, 1985). A IL-1 é estimuladora

das células T e B atuando como mediadora de múltiplos efeitos biológicos da resposta imune de fase aguda como a febre, o aumento de neutrófilos circulantes, síntese de proteínas de fase aguda, catabolismo muscular, proliferação de fibroblastos, estimulação da produção de collagenase pelos fibroblastos e células sinoviais e produção de prostaglandina por alguns tipos celulares como fibroblastos e osteoclastos.

Os osteoclastos são células envolvidas no processo de reabsorção óssea (LOUITT, 1982; BARTON & MAYER, 1989), derivados de precursores hematopoiéticos. Submetidos à influência de estímulos apropriados os precursores se diferenciam em células multinucleadas que expressam a enzima "fosfatase ácida resistente ao tartarato" (TRAP, *tartrate-resistant acid phosphatase*). Estudos têm mostrado a importância dos osteoblastos na ativação de osteoclastos, sendo a principal fonte de agentes moduladores do comportamento osteoclástico, produzindo assim: PGs, IL-1, TGF- $\beta$ , e fatores estimulantes de colônias - CSF (GM-CSF, M-CSF) (VAES, 1988). Fosfatase alcalina é um marcador enzimático de osteoblastos. Estudos têm demonstrado que TRAP e fosfatase alcalina estão presentes em lesões periapicais experimentais de ratos, onde os autores por métodos histoquímicos propuseram um modelo experimental de reabsorção/remodelação óssea, onde na fase inicial da lesão haveria um aumento de preosteoclastos e a ativação destes em osteoclastos, mediado por osteoblastos (fase de reabsorção). Em seguida, haveria uma fase de reversão seguida por uma fase de formação óssea, onde os osteoblastos agiriam na remodelação da lesão (ANAN *et al.*, 1993).

O principal componente do fator de ativação de osteoclastos (OAF) foi caracterizado como sendo idêntico à monocina IL-1 $\beta$  (STASHENKO, 1990) e à ela está sendo atribuída 60% ou mais do total da atividade de reabsorção óssea. A ação de IL-1  $\alpha$ , TNF  $\alpha$ , linfotoxinas (TNF $\beta$ ) e as interações sinérgicas entre elas são responsáveis pelo

restante da atividade do OAF (DEWHIRST *et al.*, 1985). TNF $\alpha$  e linfotoxinas são primariamente mediadores citotóxicos produzidos por macrófagos e linfócitos, respectivamente. TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória, com papel fundamental no acúmulo e maturação de macrófagos (SILVA-TEIXEIRA *et al.*, 1998). Macrófagos ativados secretam IL-1 e TNF- $\alpha$  que são capazes de estimular fibroblastos.

Tem sido observado, *in vitro* e *in vivo*, que IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  promovem reabsorção óssea (BERTOLINI *et al.*, 1986). Estes mediadores estimulam a síntese de prostaglandinas e a produção de proteases por fibroblastos e osteoblastos. Estas citocinas seriam de grande importância na destruição óssea de doenças como periodontites e artrites reumatóides (MILLER & GRISHAM, 1995). Estudos têm mostrado que a citocina IL-1 $\alpha$  seria de grande importância na destruição óssea da doença periodontal por estar em maior concentração no fluido gengival de pacientes analisados que apresentavam periodontite avançada (STASHENKO *et al.*, 1991).

Estudando a presença de citocinas nos processos periapicais, Takeichi *et al* (1996), pesquisaram IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  no fluido periapical obtido via canal radicular. Utilizando a técnica imunoenzimática, os autores observaram altas concentrações de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, mas não de TNF- $\alpha$ . Polimorfonucleares (PMNs) do fluido, isolados por gradiente de Ficoll-Hypaque, analisados através de reação de polimerase em cadeia (PCR), mostraram positividade para as expressões de RNAm para IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , mas não para IL-6.

Ao estimular fibroblastos de tecido gengival humano sadio com conteúdo de cistos radiculares, Honma *et al* (1998), observaram por ensaio imunoenzimático, que esse conteúdo foi capaz de estimular os fibroblastos à produção de IL-6 e IL-8. Foi também observado, por hibridização "*in situ*", a expressão de IL-1  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$



em macrófagos e em queratinócitos da parede epitelial do cisto radicular. Os autores consideraram que IL-1 poderia estar relacionada com a indução da proliferação de queratinócitos e fibroblastos, ativação de células T e células B e com a sua própria indução.

A presença de IL-1  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 foram observadas, no tecido epitelial de 12 lesões císticas (BANDO *et al.*, 1993). Neste mesmo estudo, observou-se que células endoteliais vasculares próximas ao epitélio cístico também expressaram IL-1 $\alpha$  e IL-6 (6 e 8 amostras, respectivamente). No entanto, somente duas espécimens foram positivas para TNF $\alpha$  e IL-8 em macrófagos, adjacentes à camada de células epiteliais. Esses achados confirmam a presença de duas citocinas importantes na modulação da reabsorção óssea: IL-1 e IL-6. Os autores sugeriram que a inibição da síntese ou da atividade dessas citocinas poderá ter efeito benéfico na terapia destas lesões.

Estudando expressões gênicas de citocinas responsáveis pela reabsorção óssea em lesões periapicais em ratos, Wang & Stashenco (1993), observaram que os níveis de RNAm de IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  apresentaram-se bastante aumentados durante os experimentos enquanto que o nível de IL-1 $\beta$  foi o mais baixo detectado. Os genes de IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  também foram altamente expressos no período relacionado com o crescimento destas lesões.

IFN- $\gamma$  produzido por células NK, células T CD $_8^+$  e subclasses Th $_1$  de células T CD $_4^+$  (PAUL, 1998), tem sido observado, *in vitro*, ser um importante modulador de reabsorção óssea osteoclástica (KABASHIMA *et al.*, 1998). Entretanto, os mecanismos responsáveis por esta modulação não estão claramente definidos (HOFFMANN *et al.*, 1987). Acredita-se, que Cathepsina K seja uma das maiores proteases responsáveis pela reabsorção óssea, pois encontra-se em abundância em osteoclastos (LI *et al.*, 1995). Estudos têm demonstrado que IFN- $\gamma$  inibiria genes de osteoclastos, como da Cathepsina K.

Com a finalidade de testar esta hipótese, Kamolmatyakul *et al* (2001), investigaram o efeito de IFN- $\gamma$  na expressão de Cathepsina K em osteoclastos. Com os resultados, concluíram que IFN- $\gamma$  inibiria a reabsorção óssea em parte, por modular a formação osteoclástica. Entretanto, o estágio preciso no qual esta citocina agiria não foi identificado.

A remodelação óssea é caracterizada por um contínuo processo de formação óssea mediado por osteoblastos e reabsorção óssea mediada por osteoclastos. Em condições patológicas de remodelação óssea, incluindo doenças como: osteoporose, osteoartrite, doenças periodontais e artrite reumatóide, citocinas inflamatórias e mediadores locais são responsáveis pelo aumento da reabsorção osteoclástica. Recentemente tem sido relatado que citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  funcionariam como moduladores da remodelação óssea *in vitro* e *in vivo* estando diretamente relacionados com o processo de reabsorção óssea por regular a atividade de osteoclastos e osteoblastos (HUGLES, 1995; CHAE *et al.*, 1997).

IFN- $\gamma$  combinado com TNF- $\alpha$  e IL-1 super induz iNOS celular (CANNON *et al.*, 1998; TACHIBANA *et al.*, 2000). O óxido nítrico (NO), ou monóxido de nitrogênio permaneceu durante muitas décadas conhecido apenas como um gás poluente nocivo, sendo alvo de interesse apenas de químicos e ambientalistas (FUKUTO, 1995), até a sua descoberta como uma molécula gerada de forma endógena por células de mamíferos (PALMER *et al.*, 1988). Desde então, este importante mediador biológico tem recebido grande atenção por parte de pesquisadores no sentido do conhecimento de suas implicações na fisiopatologia de diversas doenças e da sua relevância como mensageiro intra e intercelular liberado durante vários eventos, inclusive imunológicos (MONCADA *et al.*, 1991).

O NO é um radical livre ubíquo, produzido por uma grande variedade de células, através das ações sintetizadoras de uma família de enzimas coletivamente denominadas de óxido nítrico sintases (NOS) (HIBBS *et al.*, 1987). Essas enzimas deaminam a L-arginina para liberar NO, havendo co-produção de L-citrulina (KRONCKE *et al.*, 1998). Tem-se descrito três isoformas de NOS que são codificadas por genes separados e que requerem induções distintas. Uma é a forma encontrada nas células neuronais (nNOS, NOS-1), a segunda nas células endoteliais (eNOS, NOS-3), sendo que estas duas formas produzem constitutivamente baixas quantidades de NO que agem em processos fisiológicos incluindo a neurotransmissão e a vasodilatação (PALMER *et al.*, 1988; MONCADA *et al.*, 1991). A terceira isoforma é a NOS induzível (iNOS, NOS-2), que pode ser encontrada em quase todos os tipos celulares após estimulação (FORSTERMANN *et al.*, 1995). Os principais estimuladores das NOS que levam a uma produção acentuada de NO são as citocinas pró-inflamatórias como o IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  e/ou produtos microbianos (LPS) (XIE *et al.*, 1992; TAKEICHI *et al.*, 1998).

O NO é uma das menores moléculas mensageiras biossintetizadas por células de mamíferos biologicamente ativas, com peso molecular de 30 Da (KIECHLE & MALINSKI, 1996). É um gás com número ímpar de elétrons, reage com átomos e outros radicais livres, possui propriedades lipofílicas, sendo praticamente apolar, o que lhe confere especial capacidade de difusão pelas membranas (MILLER & GRISHAM, 1995). Sendo uma molécula instável (vida média de 3-10 segundos), o NO reage rapidamente com o oxigênio formando NO<sub>2</sub> (dióxido de nitrogênio) originando em seguida NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrito) e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrato). Além disso, combina-se com a hemoglobina, sabidamente um consumidor natural de NO, para formar metahemoglobina (KEILIN & HARTRE, 1937). Numerosos estudos têm mostrado que o NO é um importante modulador em vários processos

patológicos: infecciosos, autoimunes e carcinogênese, por exemplo (KHAN *et al.*, 1997). A ampla expressão de iNOS que ocorre em inflamações e infecções tem sido bem caracterizada e aceita como um componente vital da resposta adaptativa do hospedeiro aos estímulos nocivos (LIEW & COX, 1991). No entanto, há evidências de que a indução de iNOS, em algumas condições fisiopatológicas, seja parte de uma ativação imune descontrolada e deletéria, já que a inibição da NOS pode exercer efeitos protetores nessas condições. O papel da formação aumentada de NO tem sido investigado e discutido na insuficiência circulatória associada ao choque endotóxico e séptico (THIEMERMANN, 1994), na artrite reumatóide, osteoartrite, doença periodontal (IALENTI *et al.*, 1992) e recentemente na hipertensão portal (GADANO *et al.*, 1999). Sabe-se também que o seu papel pode variar de acordo com o processo patológico envolvido e o tecido afetado (HIRATA *et al.*, 2001).

No processo de reabsorção óssea, o NO parece exercer um efeito bifásico: em altas concentrações, age sobre a atividade osteoblástica; em baixas concentrações, estimula reabsorção óssea induzida por TNF- $\alpha$ , IL-1- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (RAULSTON *et al.*, 1995; KABASHIMA *et al.*, 1998; TAKEICHI *et al.*, 1998). Esses resultados indicam que NO regularia o metabolismo de formação e reabsorção óssea como um mediador central induzido por citocinas. Neste contexto, NO, juntamente com o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  parecem atuar de forma importante na mediação do processo inflamatório e da reabsorção óssea nas lesões periapicais (KABASHIMA *et al.*, 1998; TAKEICHI *et al.*, 1998; SUZUKI *et al.*, 2002).

Estudando a produção de iNOS em lesões periapicais humanas, Takeichi *et al* (1999), analisaram lesões císticas pela técnica de imunohistoquímica e imunofluorescência indireta. Os autores, observaram que iNOS foi significativamente expressa em células

epiteliais, endoteliais e fibroblastos. Este estudo também revelou a presença de células mononucleares que apresentaram co-imunomarcção para IFN- $\gamma$  e iNOS. Leucócitos e macrófagos que se encontravam vizinhos aos vasos sangüíneos, mostraram-se positivos para iNOS, mas aqueles que se encontravam distantes apresentaram pouca ou nenhuma reatividade a esta enzima. Por apresentar um período de vida curto, NO não se difunde para locais distantes, desta forma, acredita-se que seja sintetizado localmente para que possa ser envolvido na patologia e bioquímica das lesões periapicais. Sendo assim, acredita-se que sua ação nas patologias periapicais esteja associada à sua produção local. Concluem os autores, que lesões periapicais associadas à infecção bacteriana, podem ser reguladas e delicadamente balanceadas pela atividade biológica do NO.

Células T CD<sub>4</sub> positivas para IFN- $\gamma$  e macrófagos/monócitos positivos para iNOS foram observadas por Kabashima *et al* (1998), no infiltrado inflamatório de lesões periapicais. Segundo os autores, células produtoras de IFN- $\gamma$  e iNOS teriam um papel crítico na ativação de macrófagos através da indução de NO modulando o grau de inflamação dessas lesões. A produção de iNOS poderia ser precisamente controlada de forma autócrina e paróquina em células produtoras de IFN- $\gamma$  nos cistos radiculares humanos e teriam ainda um papel central na modulação da resposta imunológica das lesões periapicais. Sendo assim, inibidores de NO poderiam ser usados via canal radicular como tratamento farmacológico para a eliminação dessas lesões (TAKEICHI *et al.*, 1998).

Outra citocina importante na inflamação periapical é TGF- $\beta$  Possui três isoformas descritas em mamíferos: TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  e TGF- $\beta_3$  (MIYASAKA & HIRATA, 1997). São proteínas homodiméricas sintetizadas em forma latente e ativada por clivagem proteolítica (OURSLER, 1994). TGF- $\beta$  é produzida por células T estimuladas por antígenos, macrófagos ativados por LPS e alguns outros tipos celulares como eosinófilos e

fibroblastos. As células T que produzem TGF- $\beta$  produzem também IL-10 e IL-4 que como o TGF- $\beta$ , possuem atividade imunossupressora. Essa população de células T regulatórias que produzem estas citocinas são denominadas Th<sub>3</sub> e pouco se sabe sobre elas (ABBAS *et al.*, 2000). Por ser um polipeptídeo multifuncional, TGF- $\beta$  pode ser liberado pela matriz óssea no processo de remodelação. A maioria dos estudos demonstram que esta citocina inibe a formação e diferenciação osteoclástica por diminuir a produção de superóxidos e inibir o acúmulo de TRAP nestas células. TGF- $\beta$  tem efeitos poderosos em osteoblastos por induzir sua diferenciação e aumentar a formação óssea mineralizada levando à estimulação osteoblástica e formação de novo osso (BERTOLINI *et al.*, 1986). TGF- $\beta$  aumenta a replicação celular e produção de matriz óssea *in vitro*, e estimula a formação óssea *in vivo*. Estudos recentes, têm demonstrado o efeito bifásico de TGF- $\beta$  no desenvolvimento de osteoclastos: baixas concentrações desta citocina estimulam; e em altas concentrações, proporcionaria a inibição (CENTRELLA *et al.*, 1991). Podemos observar que esta citocina é mediadora de diversos efeitos inflamatórios nas respostas hospedeiras como: estimulação de proliferação fibroblástica, síntese de fibras de tecido conjuntivo, e angiogenese local (DERYNCK, 1994). Tendo ainda papel crucial na regulação do tonus vascular, inibindo vasodilatadores potentes e estimulando a produção de vasoconstrictores, sendo um dos maiores mediadores na cicatrização de feridas nos tecidos bucais (MIYAZONE & HELDIN, 1992; YANG *et al.*, 1996) Camundongos deficientes de genes que codificam TGF- $\beta$  demonstraram deficiência em promover remodelação de feridas orais (LETTERIO & ROBERTS, 1998) e desenvolvimento dental (WISE *et al.*, 1998).

TGF- $\beta$ <sub>1</sub> tem sido identificada em algumas doenças osteolíticas inflamatórias como osteoartrite, artrite reumatóide e doença periodontal (WAHL *et al.*, 1990; SKALERIC *et*

*al.*, 1997). Entretanto, pouco se sabe do papel de TGF- $\beta_1$  na patogênese destas lesões (LIN *et al.*, 2000). Discutindo o papel das citocinas na patogênese de lesões periapicais, Stashenko *et al* (1991), salientaram que TGF- $\beta$  poderia ter importante papel no recrutamento e estimulação de osteoblastos para o processo de formação óssea reparativa em lesões periapicais.

Por meio de técnica de hibridização *in situ* e imunohistoquímica, Tyler *et al* (1999), observaram TGF- $\beta$  em todos os casos estudados de lesões periapicais humanas (9 granulomas e 9 cistos). Tanto em cistos quanto em granulomas foram observados infiltrados de eosinófilos, conjugados com outros tipos celulares como fibroblastos, linfócitos e monócitos. Através deste estudo, concluiu-se que esta citocina pode estar associada com a regulação da inflamação e deposição/remodelação de matriz extracelular favorecendo uma redução na reabsorção óssea no periápice.

A presença de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  em patologias periapicais humanas por meio de técnica imunoenzimática foi avaliada por Danin *et al* (2000). Observaram uma grande porcentagem de lesões com altas concentrações de TGF- $\beta$  (21 de 25 lesões). No entanto, a presença de TNF- $\alpha$  foi detectado em somente duas amostras. Os autores observaram TNF- $\alpha$  em baixas concentrações, e discutem a possibilidade desta citocina estar presente em outras amostras, as quais o ELISA não pode detectar, devido à sensibilidade do teste. Chamam também atenção para o fato de que altas concentrações de TGF- $\beta$  foram detectadas em lesões com diâmetros maiores, explicado possivelmente pela presença de maior número de células produtoras de TGF- $\beta$ .

O desenvolvimento experimental de lesões periapicais induzidas em ratos foi analisada por Lin *et al* (2000). Nestas lesões, observaram macrófagos e células expressando TGF- $\beta_1$ , na fase inicial (aguda) e tardia (crônica) das lesões.

Interessantemente, observaram que na fase aguda, caracterizada pela reabsorção óssea, macrófagos apresentavam-se positivos para TGF- $\beta_1$ , enquanto que, osteoblastos não apresentavam reatividade para esta citocina. Entretanto, na fase tardia somente osteoblastos apresentaram-se positivos para TGF- $\beta_1$ . Os autores concluíram que os macrófagos estariam envolvidos no processo inicial e de desenvolvimento das lesões, e que TGF- $\beta_1$ , produzido por macrófagos e osteoblastos, teriam papel duplo tanto na reabsorção óssea quanto na formação óssea reparativa em lesões periapicais experimentais.

IL-4 é uma citocina produzida principalmente por células Th<sub>2</sub>, mastócitos e basófilos. Possuem várias ações biológicas como a estimulação de células B promovendo um “switching” de classe para IgE, estimular o desenvolvimento de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> a se diferenciarem em células Th<sub>2</sub> e inibição de ativação de macrófagos (ABBAS *et al.*, 2000). Tem sido estudado que IL-4 e IFN- $\gamma$  exerceriam efeitos inibitórios na reabsorção óssea por gerar efeitos negativos em osteoclastos (GOWEN & MUNDY, 1986; WATANABLE *et al.*, 1990). IL-4 estimula a expressão de fosfatase alcalina e colágeno tipo I, além de estimular a síntese de osteocalcina, proteína da matriz óssea, em osteoblastos, levando à mineralização (UENO *et al.*, 1992; RIANCHO *et al.*, 1993).

IL-4 tem sido encontrada em lesões periapicais e seus efeitos antiinflamatórios são descritos como essenciais na modulação do processo de remodelação óssea no periápice (TORABINEJAD, 1994).

Estudando a expressão de diversas citocinas em cistos radiculares e granulomas periapicais, Walker *et al* (2000), observaram que a citocina IL-4 aparecia em maiores quantidades em cistos do que em granulomas devido a maior quantidade de células T presentes naquelas lesões. O autor atribuiu o papel de citocinas como IL-4 e IL-10 como inibidoras da inflamação, agindo como moduladoras da atividade da doença.



Assim observamos que, a modulação da resposta inflamatória periapical e a remodelação óssea decorrente são processos complexos regulados por hormônios sistêmicos e fatores locais. A síntese, ativação e os efeitos dos fatores locais têm uma ação direta no metabolismo celular e modificam a replicação e funções de diferenciação de osteoclastos e osteoblastos (FAVUS, 1996).

### **3. OBJETIVOS:**

- Identificar e quantificar, comparativamente, a presença das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e TGF- $\beta$  no líquido e tecido de cistos radiculares e em granulomas apicais humanos comparados com tecidos controles.
- Identificar e quantificar metabólitos de NO em líquido e tecidos de cistos radiculares e tecidos de granulomas apicais humanos comparados com tecidos controles.
- Identificar associações entre sintomas e sinais clínicos e radiográficos associados às lesões e a presença de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, TGF- $\beta$  e NO.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS :**

A determinação e quantificação da presença de citocinas no tecido (granulomas e cistos radiculares) e líquido (cistos radiculares) das lesões periapicais foram realizadas através da técnica imunoenzimática (ELISA- *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Para tanto, estarão descritos nas linhas seguintes, o número e tipo de amostras utilizadas, critérios de coleta e seleção das mesmas, os reagentes necessários para a realização da técnica, bem como, sua seqüência.

Todos procedimentos desde a coleta das amostras até a obtenção dos resultados do ensaio imunoenzimático, foram realizados de acordo com as medidas de biossegurança em laboratórios (CHAVES-BORGES & MINEO, 1997).

O projeto de pesquisa foi desenvolvido sob prévia análise e aprovação pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa [CIEP 053/2001 (Anexo I)].

#### 4.1- Casuística

Foram utilizadas 17 amostras de cistos radiculares e 30 amostras de granulomas periapicais, extraídas cirurgicamente, das quais foram aproveitados fragmentos teciduais frescos e o conteúdo líquido dos cistos radiculares.

Os pacientes foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: 1) ter uma ou mais lesões ósseas periapicais, diagnosticadas a partir de exame clínico em que se constatava necrose da polpa dental ou tratamento endodôntico e imagem radiolúcida periapical, sugerindo lesão periapical inflamatória (lesão periapical verdadeira); 2) apresentar-se em boas condições de saúde, sem estar fazendo uso de antibioticoterapia e antiinflamatórios por, no mínimo, 6 meses; 3) consentir em participar da pesquisa através da assinatura do “Termo de Consentimento” (Anexo II).

Os pacientes foram atendidos e submetidos a cirurgias parendodônticas ou istectomias no Hospital Odontológico da Universidade Federal de Uberlândia (FOUFU), Uberlândia, MG, na Policlínica Odontológica da Universidade de Uberaba (UNIUBE), Uberaba, MG, e clínicas particulares de Itumbiara (GO), Uberaba (MG) e Uberlândia (MG).

Após a remoção cirúrgica, as amostras foram selecionadas segundo o diagnóstico específico de cisto radicular e granuloma periapical, por meio de exame anátomo-patológico, realizado no Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Uberlândia, segundo os critérios estabelecidos pela OMS (KRAMER *et al.*, 1991).

O grupo controle negativo foi constituído por 10 pacientes com indicação cirúrgica apropriada para extração de terceiros molares hígidos inclusos, dos quais foram

obtidos tecidos pulpares em que a inflamação seria um evento improvável (BARKHOLDAR *et al.*, 1999; GERVÁSIO *et al.*, 2002).

#### 4.2- Informações clínicas

Foram coletadas informações clínicas referentes à idade e sexo dos pacientes, tratamento endodôntico prévio, localização das lesões, sintomatologia (dor espontânea ou à palpação), presença de aumento de volume e eritema. Tomadas radiográficas periapicais foram realizadas para avaliar a dimensão das lesões (maior diâmetro) e seus limites (definidos-imagem radiolúcida com borda delimitada, ou difusos- imagem radiolúcida sem borda delimitada), além de presença de tratamento endodôntico prévio. (Anexo III)

#### 4.3- Coleta das Amostras

A coleta das amostras foi realizada no período de Junho de 2001 à Junho de 2002. Foram coletados fragmentos teciduais “frescos” de granulomas e cistos radiculares. Das lesões císticas, foram extraídos amostras de líquido cístico por meio de punção aspirativa. Os procedimentos de coleta das amostras podem ser sumarizados como segue:

1. Punção aspirativa, utilizando-se uma seringa descartável de 5ml com agulha hipodérmica 25x6 ou 25x7 (Becton Dickinson, USA), retirando-se, em uma só punção, o maior volume de líquido cístico possível. As amostras nas quais houve presença de sangue ou secreção purulenta (ou outro constituinte contaminante), foram submetidas à centrifugação refrigerada, a 2000g por 10 minutos, imediatamente após a coleta, para obtenção de sobrenadante límpido.

2. Transferência imediata do líquido aspirado ou sobrenadante para um tubo de congelamento (*freezing vial*, Nunc, USA) e armazenamento a  $-70^{\circ}\text{C}$ , até o momento da realização dos ensaios imunoenzimáticos.
3. Remoção de um ou mais fragmentos de tecido cístico e de granulomas, que foram devidamente picotados e acondicionados em tubos do tipo *ependorf* (Biolog, Brasil) e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ , até o momento da realização dos testes.
4. Fixação do restante da lesão em formol tamponado a 10% por 24 horas. Estes fragmentos foram posteriormente incluídos em parafina para obtenção de secções histológicas de aproximadamente  $5\mu\text{m}$  de espessura e, então, coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (H/E) para confirmação histológica dos diagnósticos clínico-radiográficos das lesões.

Para obtenção das polpas dos dentes inclusos extraídos cirurgicamente, os dentes foram congelados a  $-196^{\circ}\text{C}$  em nitrogênio líquido e imediatamente fragmentados por tração mecânica interradicular. Os tecidos pulpaes foram colhidos com cureta odontológica, e foram em seguida aliquotados em *vials*. As alíquotas foram congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  e processadas no momento do ensaio. Todas as amostras (tecido e líquido cístico, granulomas e tecidos controles) foram devidamente etiquetadas e identificadas para melhor controle dos dados obtidos.

#### 4.4- Processamento das amostras teciduais

A identificação e quantificação das citocinas e NO foram realizadas a partir de sua extração tecidual com a obtenção de um homogeneizado líquido apropriado para a utilização da técnica imunoenzimática. A metodologia empregada seguiu parâmetros

previamente descritos (HÖENIG *et al.*, 1991; STASHENKO *et al.*, 1991; MEGHJI, *et al.*, 1996; ENRIQUEZ & RIGGS, 1998; GEMMELL & SEYMOUR, 1998; GERVÁSIO *et al.*, 2002), atentando para a padronização das condições ideais de trabalho. Após o descongelamento das amostras, os tecidos já previamente picotados com auxílio de um bisturi foram aliquotados em tubos tipo *ependorf* de 1,8 ml, em quantidades previamente pesadas em uma balança eletrônica de alta precisão (*BPB Models* – Boeco, USA).

Para cada amostra aliquotada foram realizados os seguintes procedimentos:

- Um tampão de extração que contendo 50 ml de PBS, 5mg de detergente *Zwittergent* (*Calbiochem*, USA) e 10 mg de coquetel de inibidores de proteases (*Complete*, Boehringer Mannheim, Germany) foi adicionado às amostras de tecido previamente picotadas e pesadas.
  - O tecido juntamente com o tampão foram colocados em tubos tipo *ependorf* de 1,8 ml cada e macerados mecanicamente com auxílio de pestilos plásticos (*Sigma Mota Cordless*, Sta Louwis, USA) por 3 minutos em banho de gelo;
- As amostras foram incubadas por 60 minutos em banho de gelo sob agitação constante (*Fanem* - SP Brasil);
- Centrifugação das amostras a 2000g por 10 minutos a 4<sup>0</sup>C;
  - Coleta do sobrenadante e armazenamento em tubos tipo *ependorf* em freezer de temperatura -70°C até o momento da realização dos ensaios imunoenzimáticos. Ao adicionar-se o tampão de extração às amostras, observou-se sempre a proporção de 1:10, ou seja, 1ml da solução de extração para 0,1 g de tecido analisado.

Além das amostras de tecido de cistos e de granulomas, foram testadas, paralelamente, outras amostras de granulomas, denominadas de granulomas controles, processados da mesma forma anteriormente descrita. Foram acrescentadas concentrações

conhecidas de rhTNF- $\alpha$ , rhIFN- $\gamma$ , rhTGF- $\beta$  e rhIL-4 considerando estes como controles positivos para verificar se a metodologia de extração das citocinas não induziria perda protéica.

O processamento dos tecidos pulpareis utilizados como controle negativo foi similar ao das amostras anteriormente descritas.

#### 4.5- Processamento de líquido cístico

As amostras de líquido cístico, não diluídas, foram analisadas sem nenhum processamento prévio, salvo a centrifugação, quando necessária, devido à presença de exudato (purulento ou sangue).

#### 4.6- Ensaio imunoenzimático (ELISA) padrão para detecção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e TGF- $\beta$

As amostras de tecido e líquido císticos bem como de granulomas e tecidos controles foram analisadas para detecção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-4 por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) tipo *sandwich*.

As citocinas presentes nos sobrenadantes e líquido cístico foram dosadas utilizando-se placas com 96 poços de fundo chato (*NUNC - Maxisorp*, Rochester, NY, USA). As placas foram sensibilizadas com 50 $\mu$ l de anticorpo primário monoclonal [IFN- $\gamma$  - Mabtech, Suécia (1 $\mu$ g/ml), TNF- $\alpha$  - PharMingem, San Diego, CA, USA (1 $\mu$ g/ml), IL-4 - Mabtech, Suécia (1 $\mu$ g/ml), TGF- $\beta_1$  - R&D Systems, Minneapolis, MN, USA (0,2 $\mu$ g/ml)] em tampão de sensibilização (pH=9,4), "overnight" à 4° C. Posteriormente foram lavadas



com PBS/Tween a 0,05% em lavadora automática, bloqueadas com 200µl de PBS/BSA 2% (4 horas/temperatura ambiente) e lavadas novamente com PBS/Tween 0,05%. As amostras dos sobrenadantes teciduais e líquido cístico, diluídas 1:1 em PBS/BSA 1%, foram adicionadas às placas e, paralelamente, realizada a curva padrão com diluição dupla seriada da respectiva citocina recombinante. [IFN- $\gamma$  (1000pg/ml), TNF- $\alpha$  (1000 pg/ml), IL-4 (1000 pg/ml), TGF- $\beta_1$  (2000pg/ml – 31,5 pg/ml)]. As amostras juntamente com a curva padrão foram incubadas “overnight” a 4° C. Os poços foram então lavadas com PBS/Tween 20 à 0,05 % e distribuiu-se posteriormente 100µl/poço de anticorpo secundário monoclonal [IFN- $\gamma$  - Mabtech, Suécia (0,5mg/ml), TNF- $\alpha$  - PharMingem, San Diego, CA, USA (1mg/ml), IL-4 - Mabtech, Suécia (1mg/ml), TGF- $\beta_1$  biotilado, Mabtech, Suécia (0,2µg/ml)] permanecendo por duas horas à temperatura ambiente e lavando-se subsequenteemente, com solução de PBS/Tween à 0,05%. Após esta etapa, pipetou-se 100 µl/poço de fosfatase alcalina conjugada à estreptavidina (0,5µl/ml em solução de PBS/BSA 1%), permanecendo por duas horas à temperatura ambiente. Posteriormente as placas foram lavadas com solução de PBS/Tween à 0,05%, adicionando-se, em seguida, 100µl/poço do substrato indutor de atividade enzimática (pNpp – p-nitrophenyl fosfato – *Sigma Chemical Co*, San Diego, CA, USA). A absorbância foi medida a 405 nm (*Biorad 2550 Reader EIA.*, USA). A sensibilidade dos testes foram de 5 pg/ml para IFN- $\gamma$  e 10 pg/ml para TNF- $\alpha$ , IL-4 e TGF- $\beta_1$ .

As amostras foram dosadas em duplicata. Para a detecção de TGF- $\beta_1$  ativo e latente foi necessário que acidificássemos e posteriormente neutralizássemos o sobrenadante das amostras, de acordo com as instruções do fabricante (*R & D Systems*, Minneapolis, MN, USA) . Dessa forma, seguimos o seguinte protocolo de acidificação e neutralização dos sobrenadantes:

- Adição de 1,5 µl/poço de HCl 3 M em 100 µl de sobrenadante;
- Deixar 15 minutos à temperatura ambiente;
- Adição de 6 µl/poço de tampão de neutralização composto por 15 µl de NaOH - 6 N e 1M de HEPES (V/V).

Após estes procedimentos, seguimos, normalmente, o protocolo de detecção de TGF- $\beta_1$  como anteriormente descrito.

#### 4.7- Dosagem de nitrito/nitrato pela reação de GRIESS

A concentração de nitrito/nitrato foi determinada pela reação de Griess, (GREEN *et al.*, 1982), após redução enzimática de nitrato a nitrito com a enzima nitrato redutase em solução de redução. Para tal reação foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato (*Nunc-Maxsorp*, Rochester, NY, USA) onde foram depositados 50µl de cada amostra em duplicata. A redução do nitrato nas amostras de sobrenadantes e líquido cístico foram feitas a 37°C, “overnight”, com a subsequente detecção do nitrito com 50µl de reagente de Griess (preparado pela mistura de volumes iguais de sulfanilamida a 1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 2,5% e 0,1% de naftiletilenodiamida em H<sub>2</sub>O), incubado-se à temperatura ambiente por dez minutos. A absorbância foi medida a 540nm usando um leitor automático de microplacas (*Biorad 2550 reader eia.*, USA). As concentrações de nitrito foram calculadas por extrapolação para uma curva padrão de NaNO<sub>2</sub> e os dados expressos em µmoles de nitrito e nitrato.

Para que fosse possível a detecção de nitrito nas amostras de tecido cístico, foi acrescentada ácido tricloro-acético (TCA) a 10% com posterior centrifugação a 2000g por 5 minutos para remoção do precipitado protéico e realização da reação de Griess como

mencionada anteriormente. Esse procedimento foi realizado da mesma forma para as amostras controle.

#### **4.8- Expressão dos resultados**

Os níveis de reatividade das citocinas foram expressos como uma relação entre a concentração protéica e o peso do fragmento estudado. Cada 0,1 grama de tecido foi convertido em 1ml de sobrenadante; os valores de absorvância assim obtidos foram convertidos em pg/ml, representando uma concentração relacionada a cada 0,1g de tecido. Nos presentes resultados, convertemos a unidade de medida pg/ml (picograma por mililitro) das citocinas analisadas em pg/g (picograma por grama) onde analisamos as concentrações destes mediadores presentes nos tecidos das lesões císticas e granulomas. Os resultados referentes ao líquido cístico permaneceram em pg/ml.

#### **4.9- Análise estatística**

Os dados obtidos neste trabalho foram analisados pelo aplicativo Statview. Após análise de normalidade, foram utilizados testes não paramétricos (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis) e análises de correlação (Spearman, para variáveis contínuas e Qui quadrado ( $\chi^2$ ), para variáveis nominais). O nível de significância estabelecido foi para  $p < 0,05$ .

**5. RESULTADOS:**

As principais características clínico-radiográficas dos casos analisados neste estudo estão distribuídos na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos aspectos clínico-radiográficos de 17 cistos radiculares e 30 granulomas periapicais incluídos neste estudo.

	Granuloma apical	Cisto radicular	Total
Sexo			
Masculino	15	9	24
Feminino	15	8	23
Idade média	38,8 anos	35,5 anos	36,9 anos
Localização			
Mandíbula	11	2	13
Maxila	19	15	34
Edema	0	13	13
Eritema	1	1	2
Tratamento endodôntico	0	14	14
Dor à palpação e/ou espontânea	1	13	14
Dimensão da lesão (variação/média)	0,2-1,0 cm/ 0,5 cm	1,5-8,0 cm/ 3,5 cm	
Limites radiográficos			
Difusos	5	4	9
Definidos	25	13	38

Nos cistos radiculares, detectamos sete amostras teciduais positivas para TNF- $\alpha$  (7/17, 41,2%) e quatro amostras (4/17, 23%) de líquido cístico positivas para esta citocina, nos granulomas, encontramos somente três amostras positivas (3/30, 10%). IFN- $\gamma$  foi detectado em doze amostras (12/17, 70%) de tecidos císticos, no líquido cístico foram observadas oito amostras (8/17, 47%) positivas e nos granulomas somente três também foram positivas (3/30, 10%). Ao analisarmos a positividade de óxido nítrico em granulomas e cistos radiculares, detectamos poucas amostras positivas para este mediador inflamatório. Entretanto, encontramos cinco amostras (5/17, 29%) teciduais císticas

positivas para NO, e no líquido, constatamos somente duas amostras (2/17, 12%) positivas; em granulomas apicais foi detectado em seis amostras (6/30, 20%) analisadas. Interessantemente, a citocina IL-4 foi detectada em quatro amostras (4/17, 24%) teciduais de cistos radiculares e três (3/17, 18%) de líquido cístico. Entretanto, não foi detectada em nenhuma amostra de granulomas apicais. Em relação à detecção da citocina TGF- $\beta$ , todas amostras teciduais de cistos e granulomas e de líquido cístico mostraram-se positivas para esta citocina (Figura 1).

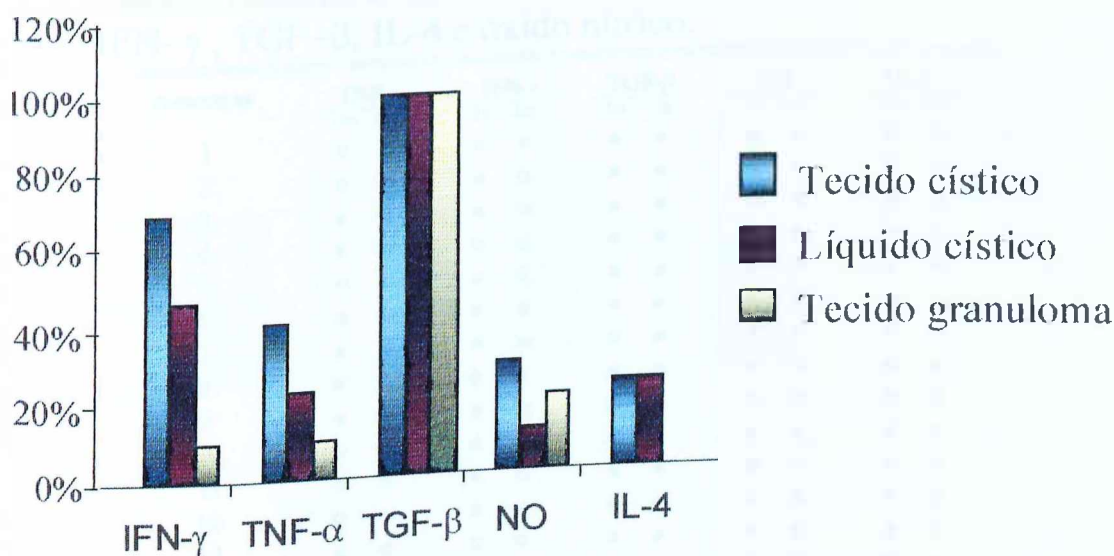


Figura 1. Porcentagem de casos reativos para NO e citocinas em tecido e líquido de cistos radiculares e granulomas periapicais humanos.

Nos tecidos císticos, 6 casos foram reativas concomitantemente para TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Deste grupo, ou seja, dos 6 casos coincidentes para TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , apenas dois foram reativos para NO. Das 17 lesões císticas analisadas para IL-4, nenhuma foi positiva para TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Tabela 2). Em relação aos granulomas apicais, as três amostras positivas para IFN- $\gamma$  foram positivas para TNF- $\alpha$  e NO. Observamos que um menor número de amostras de granulomas obtiveram reatividade para IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (3/30), quando comparadas com as lesões císticas (6/17).

Tabela 2. Distribuição das amostras de tecido e líquido cístico, reativas e não reativas para as citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-4 e óxido nítrico.

Amostras	TNF- $\alpha$		IFN- $\gamma$		TGF- $\beta$		NO		IL-4		
	Tec.	Liq.	Tec.	Liq.	Tec.	Liq.	Tec.	Liq.	Tec.	Liq.	
1	○	○	●	●	●	●	●	○	○	○	○
2	○	○	●	○	●	●	○	●	○	○	
3	●	○	●	○	●	●	○	○	○	○	
4	●	○	○	●	●	●	○	○	●	●	
5	○	○	○	○	●	●	●	○	○	○	
6	○	○	●	●	●	●	●	○	○	○	
7	●	○	●	●	●	●	●	○	○	○	
8	●	○	●	●	●	●	○	○	○	○	
9	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	
10	○	●	○	○	●	●	○	○	○	○	
11	○	○	●	○	●	●	○	○	●	○	
12	○	○	○	●	●	●	○	○	●	●	
13	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	
14	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	
15	○	○	●	○	●	●	○	○	○	○	
16	○	○	●	○	●	●	○	○	○	○	
17	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	

● reativas; ○ não reativas; tec. tecido; liq. líquido.

A citocina IFN- $\gamma$  foi encontrada em níveis aumentados nos cistos radiculares quando comparados com granulomas apicais ( $p < 0,05$ ). Os valores das concentrações encontradas em granulomas apicais variaram de 0 à 15 pg/g; enquanto que para os cistos, estas concentrações permaneceram entre 0 e 50 pg/g (mediana igual à 10 pg/g). Entretanto, para a citocina TNF- $\alpha$  não obtivemos diferenças estatisticamente significantes quando comparamos os níveis teciduais entre cistos e granulomas periapicais. Para TNF- $\alpha$  as concentrações em granulomas variaram de 0 à 25 pg/g e em cistos de 0 à 25 pg/g (Figura 2).

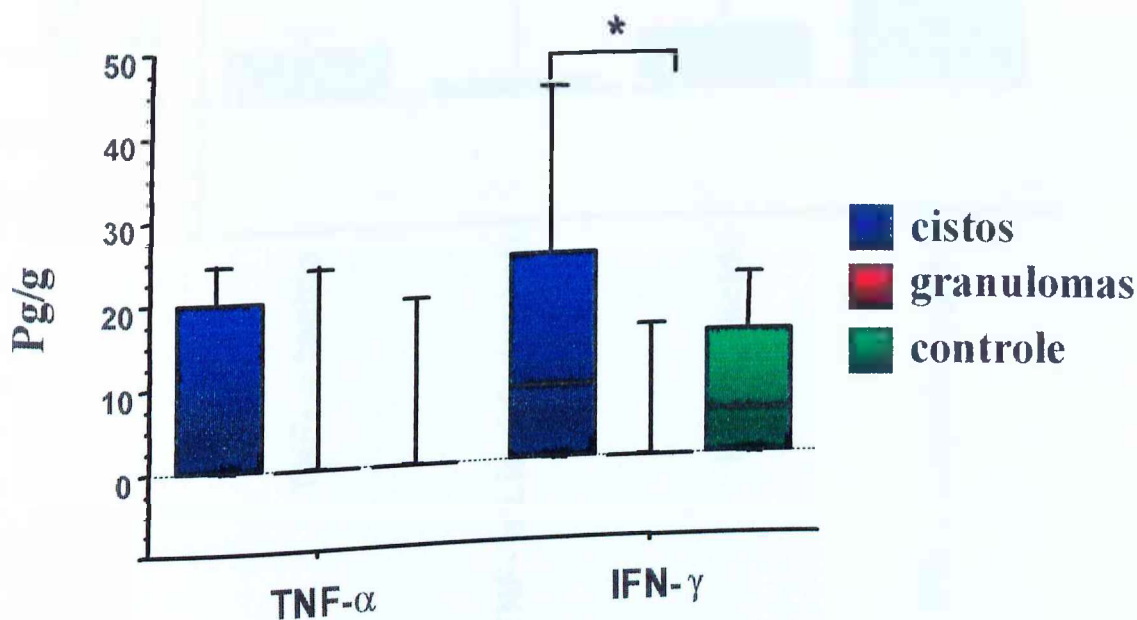


Figura 2. Proteínas extraídas de tecido cístico e granulomas apicais foram analisadas por EIE para a quantificação de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no tecido de granulomas apicais comparados com tecidos císticos. A linha horizontal representa a mediana, a barra a distribuição de percentil de 25% a 75% e a linha vertical de 10% a 90%. Os pacientes foram agrupados de acordo com o tipo de lesão em granuloma apical (vermelho) e cisto radicular (azul). Diferença estatisticamente significativa \*  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis).



Observamos diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) quando comparamos os níveis de IFN- $\gamma$  em tecidos císticos com os níveis desta citocina no líquido cístico (valores variando de 0 à 80 pg/ml) (Figura 3).

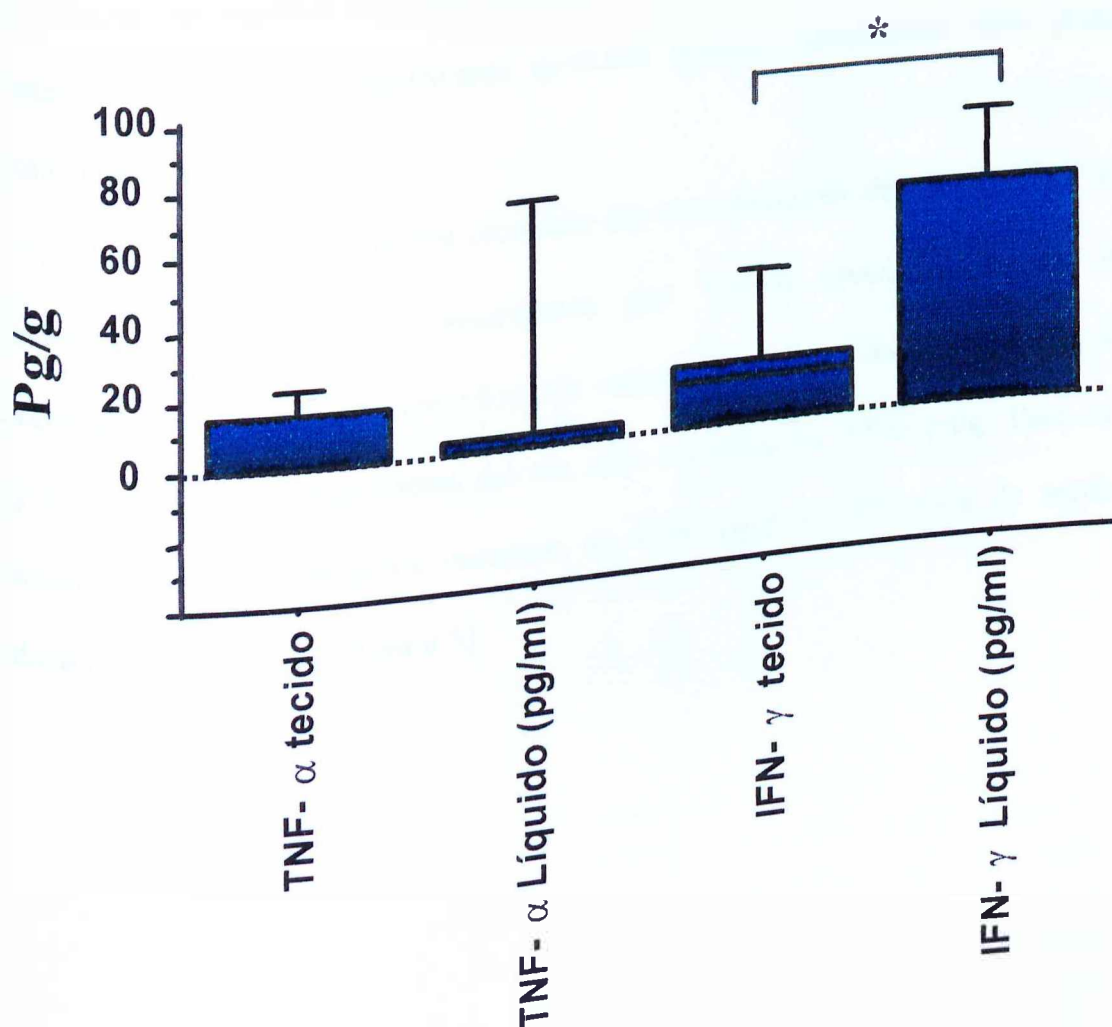


Figura 3. Comparação entre os níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no tecido e líquido de cistos radiculares humanos. A linha horizontal representa a mediana, a barra a distribuição de percentil de 25% a 75% e a linha vertical de 10% a 90%. Diferença estatisticamente significante \*  $p < 0,05$  (Mann-Whitney)

Quando comparamos os níveis teciduais de óxido nítrico em cistos (variação de 0 à 40 pg/g) e em granulomas (0 à 40 pg/g), não percebemos diferenças estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ). No líquido cístico foram determinados somente duas amostras positivas para NO, com valores de 26 e 35 pg/ml.

Os valores detectáveis para IL-4 nos cistos radiculares variaram de 0 à 25 pg/g. Esta citocina foi positiva somente em cistos radiculares, desta forma obtivemos uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados com granulomas apicais (Figura 4).

Ao comparamos os níveis teciduais das concentrações da citocina TGF- $\beta$ , entre granulomas e cistos apicais, observamos que TGF- $\beta$  apresentou-se em maiores concentrações em granulomas ( $p < 0,05$ ). Os valores para esta citocina variaram de 2000 pg/g à 7500 pg/g em granulomas apicais com mediana de 5500 pg/g. Para os cistos radiculares, estas concentrações variaram de 1250 pg/g à 2500 pg/g de tecido, com mediana igual à 1750 pg/g (Figura 5).

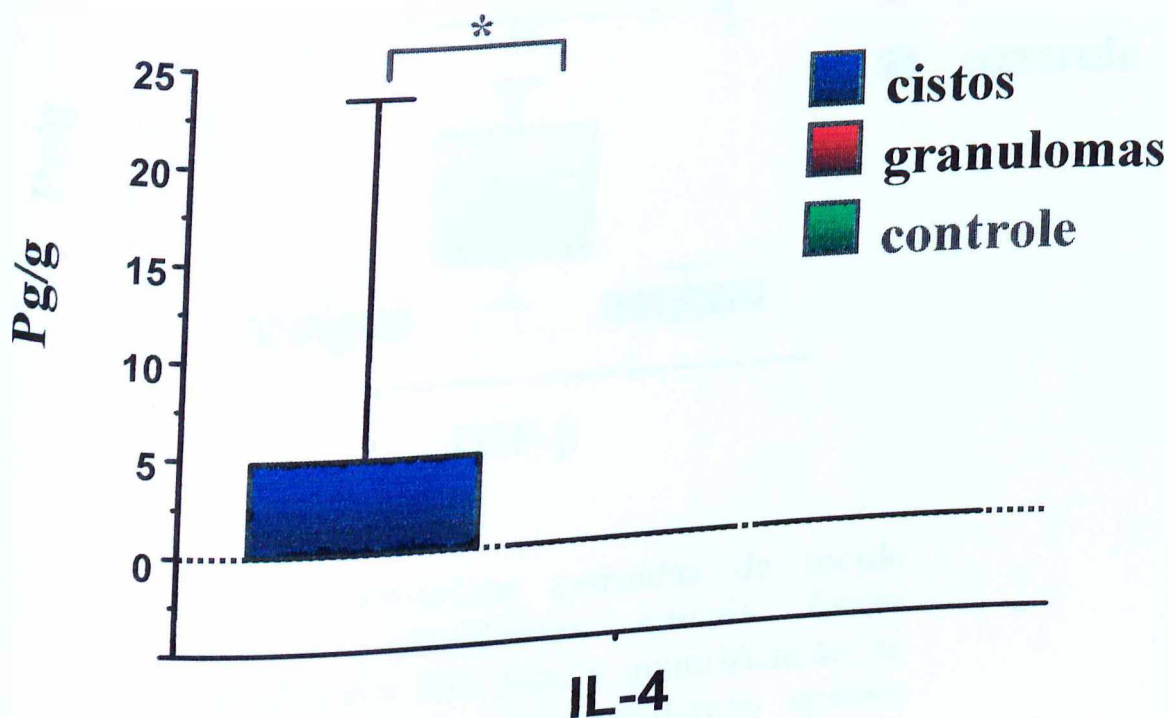


Figura 4. Proteínas extraídas de tecido cístico e granulomas apicais foram analisados por EIE para a quantificação de IL-4 no tecido de granulomas apicais comparados com tecidos císticos. A linha horizontal representa a mediana, a barra a distribuição de percentil de 25% a 75% e a linha vertical de 10% a 90%. Os pacientes foram agrupados de acordo com o tipo de lesão em granuloma apical (vermelho) e cisto radicular (azul). Diferença estatisticamente significativa \*  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis).

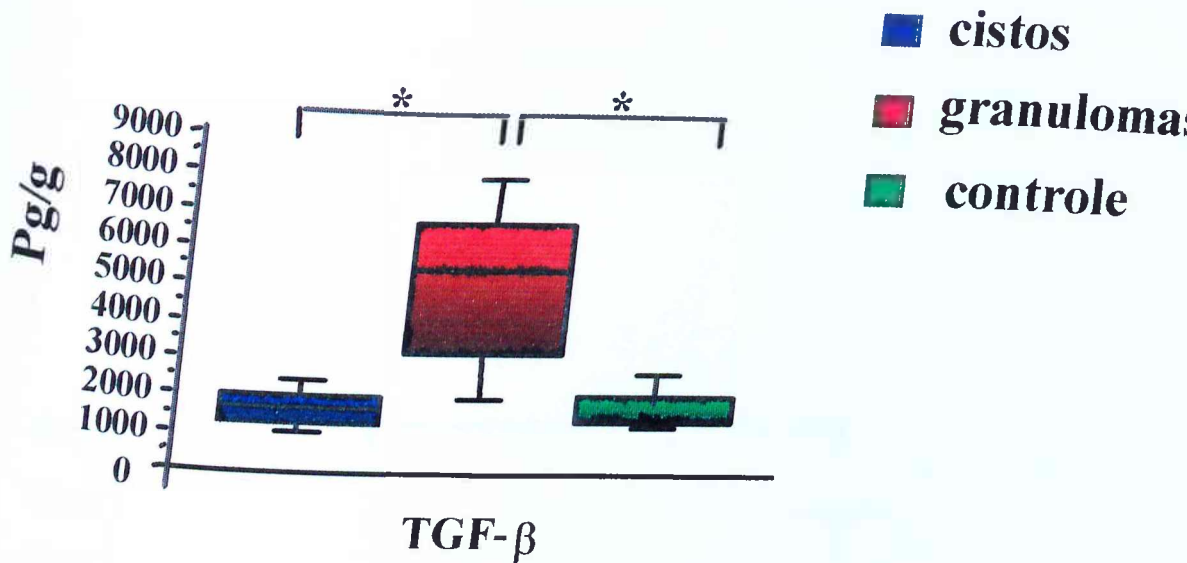


Figura 5. Proteínas extraídas de tecido cístico e granulomas apicais foram analisados por EIE para a quantificação de TGF- $\beta$  no tecido de granulomas apicais comparados com tecidos císticos. A linha horizontal representa a mediana, a barra a distribuição de percentil de 25% a 75% e a linha vertical de 10% a 90%. Os pacientes foram agrupados de acordo com o tipo de lesão em granuloma apical (vermelho) e cisto radicular (azul). Diferença estatisticamente significante \*  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis).

Em relação ao TGF- $\beta$ , também observamos uma maior concentração desta citocina nos tecidos císticos quando comparados com líquido cístico ( $p < 0,05$ ). A concentração máxima desta citocina no líquido atingiu valores iguais à 4000 pg/ml e mínima de 250 pg/ml com mediana igual à 500 pg/ml (Figura 6).

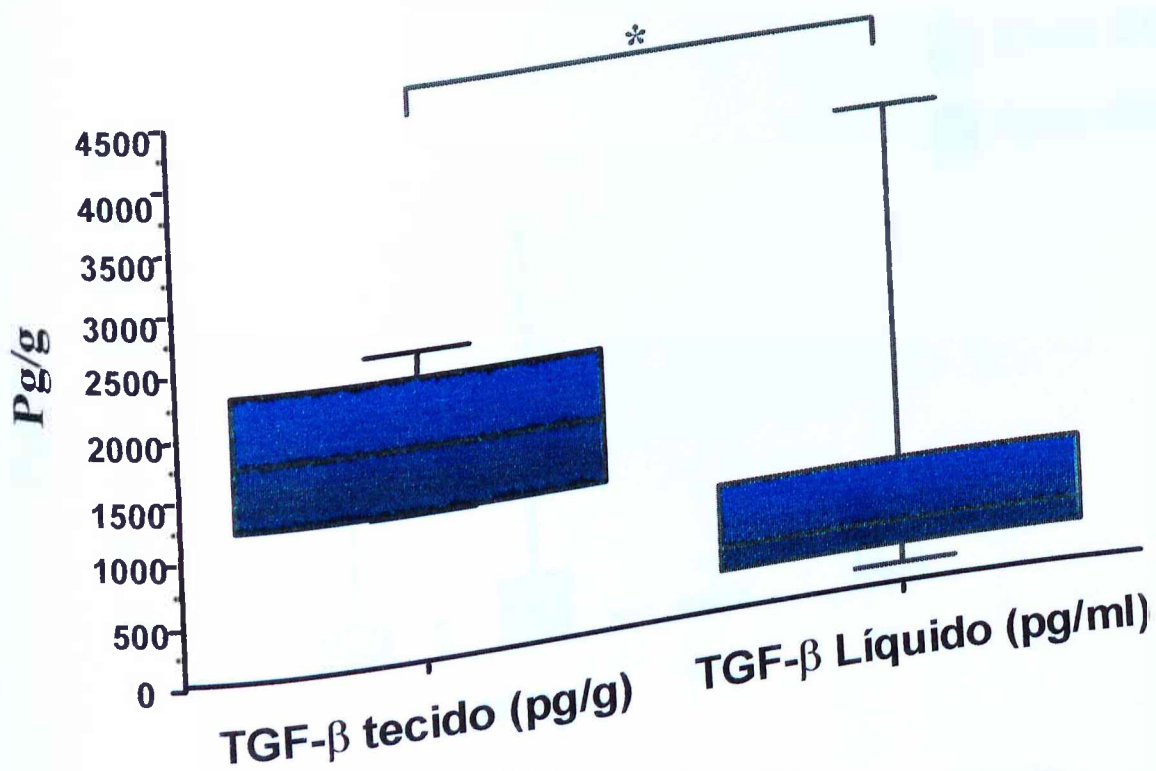


Gráfico 6. Comparação entre os níveis de TGF- $\beta$  no tecido e líquido de cistos radiculares humanos. A linha horizontal representa a mediana, a barra a distribuição de percentil de 25% a 75% e a linha vertical de 10% a 90%. Diferença estatisticamente significativa \*  $p < 0,05$  (Mann-Whitney)

Foram avaliados os sinais clínicos e radiográficos dos pacientes: dor à palpação e/ou espontânea, aumento de volume, presença de tratamento endodôntico, limites e dimensão das imagens radiográficas. Lesões que apresentaram níveis de reatividade mais elevados de IFN- $\gamma$  e IL-4 associaram-se significativamente à presença de sintomatologia dolorosa à palpação e/ou espontânea ( $p < 0,05$ ) (Figura 7). Foi também observado que a presença de aumento de volume estava significativamente associada à presença de IL-4, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 8).

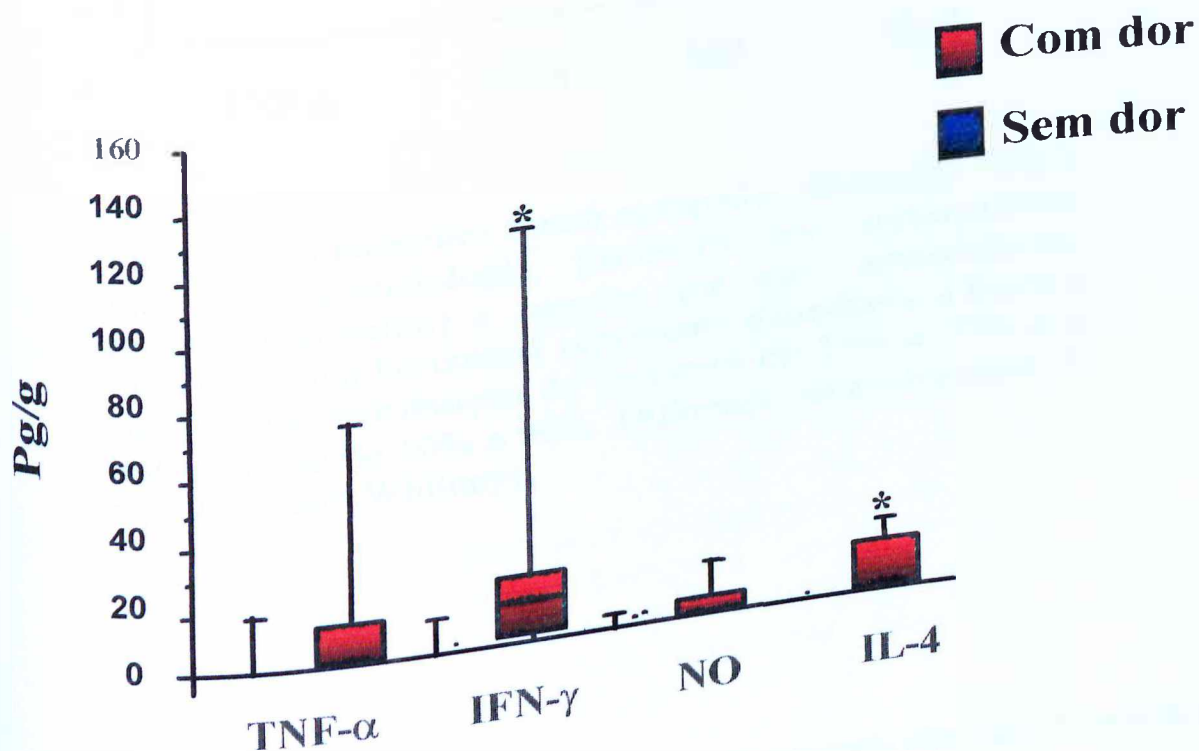


Figura 7. Os pacientes foram agrupados de acordo com o tipo de sintomatologia. Pacientes que apresentavam dor à palpação e/ou espontânea (vermelho) e aqueles que não apresentavam (azul). A linha horizontal representa a mediana, a barra a significante distribuição de percentil de 25% a 75% e a linha vertical de percentil de 10% a 90%. Diferença estatisticamente \*  $p < 0,05$  (Mann Whitney).

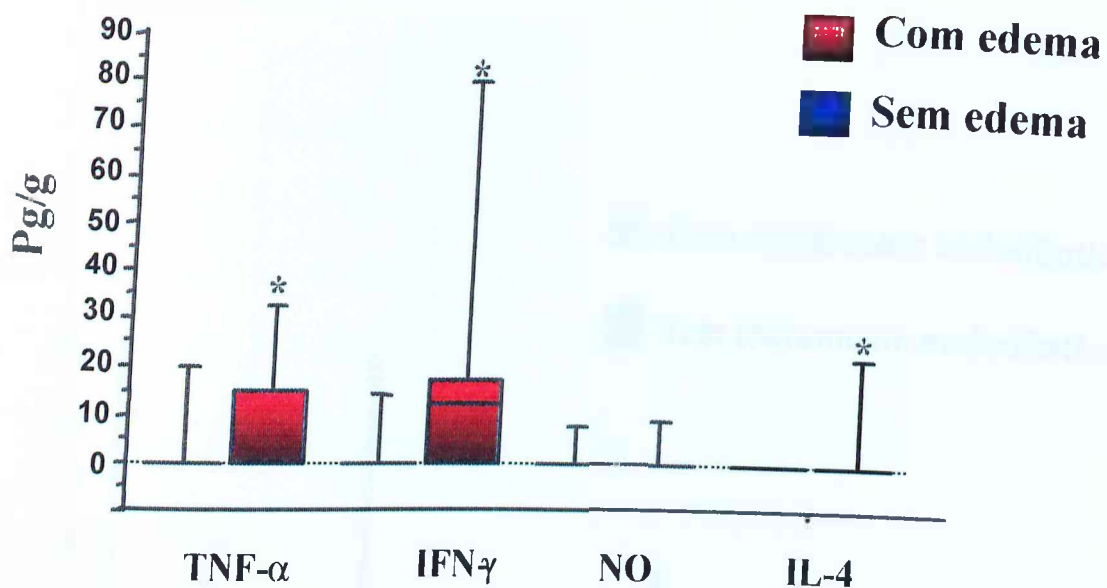


Figura 8. Os pacientes foram agrupados de acordo com o tipo de sintomatologia, pacientes que apresentavam inchaço (vermelho) e aqueles que não apresentavam (azul); A linha horizontal representa a mediana, a barra a significativa distribuição de percentil de 25% a 75% e a linha vertical de 10% a 90%. Diferença estatisticamente \*  $p < 0,05$  (Mann Whitney).

Analisando os achados radiográficos de cada paciente, observamos associações estatisticamente significantes para IFN- $\gamma$  e IL-4 em pacientes que apresentavam tratamento endodôntico prévio (Figura 9). Por outro lado, apenas a presença de óxido nítrico pôde ser estatisticamente associada à linha de reabsorção óssea difusa ao redor das lesões apicais (Figura 10).

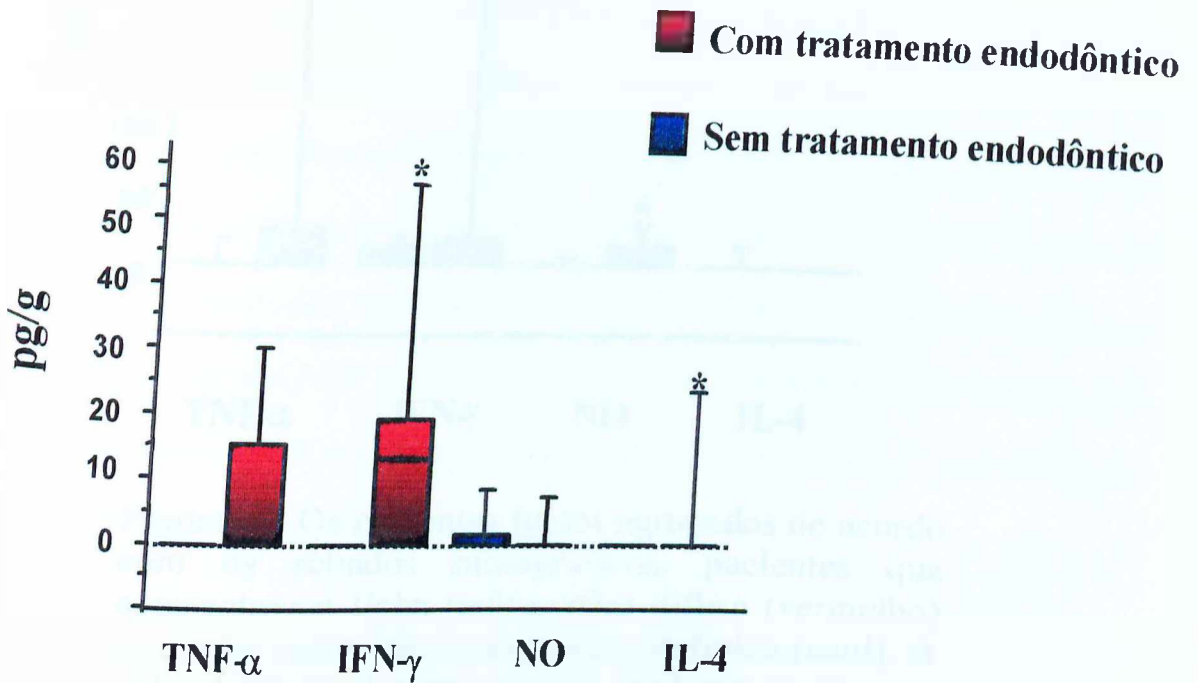


Figura 9. Os pacientes foram agrupados de acordo com os achados radiográficos; pacientes que apresentavam tratamento endodôntico (vermelho) e aqueles que não apresentavam (azul). A linha horizontal representa a mediana, a barra a distribuição de percentil de 25% a 75% e a linha vertical de 10% a 90%. Diferença estatisticamente significante \*  $p < 0,05$  (Mann Whitney).



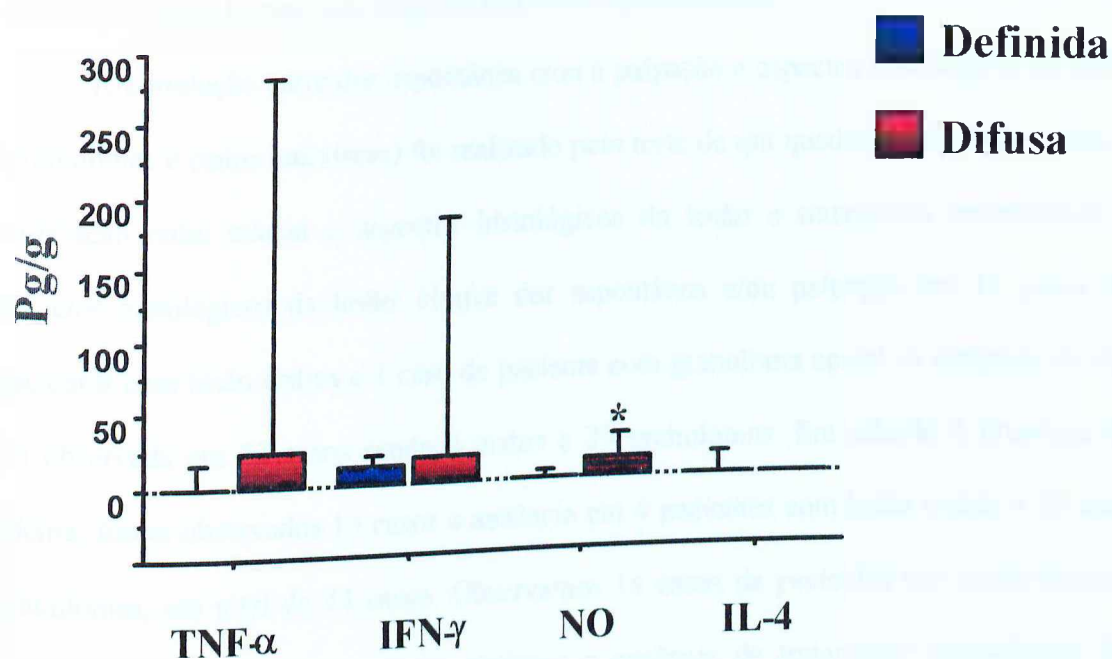


Figura 10. Os pacientes foram agrupados de acordo com os achados radiográficos; pacientes que apresentavam linha radiográfica difusa (vermelho) e aqueles com linha radiográfica definida (azul). A linha horizontal representa a mediana, a barra a distribuição de percentil de 25% a 75% e a linha vertical de 10% a 90%. Diferença estatisticamente significativa \*  $p < 0,05$  (Mann Whitney).

A citocina TGF- $\beta$  também foi analisada quanto às sintomatologias (dor espontânea e/ou à palpação e aumento de volume) e radiografias (tratamento endodôntico e imagem radiográfica), no entanto, como seus níveis de detecção foram em escalas mais elevadas que as demais moléculas analisadas, seus resultados não foram colocados nos gráficos anteriores. Sendo assim, apesar de realizarmos a análise estatística para TGF- $\beta$ , não

observamos resultados estatisticamente significantes para a mesma em relação aos itens analisados, dessa forma, seus gráficos não foram apresentados.

A correlação entre dor espontânea e/ou à palpação e aspectos histológicos da lesão (granulomas e cistos radiulares) foi realizado pelo teste de qui quadrado ( $\chi^2$ ), bem como, a correlação entre edema e aspectos histológicos da lesão e tratamento endodôntico e aspectos histológicos da lesão. Houve dor espontânea e/ou palpação em 13 casos de pacientes com lesão cística e 1 caso de paciente com granuloma apical. A ausência de dor foi observada em 33 casos sendo 4 cistos e 29 granulomas. Em relação à presença de edema, foram observados 13 casos e ausência em 4 pacientes com lesão cística e 30 com granulomas, um total de 34 casos. Observamos 14 casos de pacientes que apresentavam tratamento endodôntico com lesão cística e a ausência de tratamento endodôntico foi observada em 33 casos, sendo 3 cistos e 30 granulomas (Tabela 3).

Tabela 3 – Correlação entre dor espontânea e/ou palpação, edema e tratamento endodôntico e aspectos histológicos da lesão pela análise de correlação de Qui quadrado ( $\chi^2$ ).

	Dor	Sem dor	Edema	Sem edema	Endo	Sem endo
Cisto	13	4	13	4	14	3
Granuloma	1	29	0	30	0	30
Total	14	33	13	34	14	33
	$p < 0,001 \chi^2 = 31,5$		$p < 0,001 \chi^2 = 29,8$		$p < 0,001 \chi^2 = 31,5$	

Endo - Tratamento endodôntico

## **6. DISCUSSÃO:**

O presente trabalho objetivou a detecção das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-4 e NO, através de ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação de GRIESS, respectivamente, em lesões periapicais humanas (30 granulomas e 17 cistos). Neste trabalho, buscamos avaliar, comparativamente, a presença destas citocinas em granulomas e cistos radiculares, bem como identificar possíveis correlações entre sua presença e as características clínicas e radiográficas presentes em cada lesão. Para isto, foram necessários a coleta de dados clínicos, através de um formulário previamente elaborado.

A opção pela utilização de ELISA e da reação de GRIESS neste trabalho, foi feita considerando a possibilidade de estudarmos qualitativa e quantitativamente as citocinas e NO, que, admitidamente, estariam presentes nas células, dispersas pelos tecidos, e no líquido cístico. A quantificação destes mediadores foi possível por meio da conversão dos valores de absorbância em concentração por meio de uma curva padrão desenvolvida a partir de diluições pré-conhecidas de citocinas recombinantes (PAUL, 1998).

Como a técnica de ELISA e da reação de GRIESS são realizadas em placas com amostras em estado líquido, houve, inicialmente, a necessidade de promover a extração das citocinas pesquisadas dos tecidos colhidos. Neste sentido, uma preocupação presente durante o desenvolvimento da pesquisa foi a de evitar possíveis perdas protéicas durante a manipulação das amostras teciduais dos cistos e granulomas. Teoricamente, a obtenção do sobrenadante com os antígenos das amostras (citocinas) seria alcançada através da manipulação dos fragmentos, objetivando a dissociação tecidual e a ruptura celular.

Gervásio (2000), pesquisando a presença das citocinas GM-CSF, IL-3, IL-6 e IFN- $\gamma$  em cistos radiculares humanos através da técnica ELISA, utilizou um protocolo de processamento das amostras teciduais císticas, prevendo, inicialmente, a suspensão de fragmentos previamente recortados em um tampão de extração contendo detergente *Zwittergent* (100 $\mu$ g/ml - *Calbiochem*, USA) e um coquetel de inibidores de protease (50 $\mu$ g/mL de leupeptina, 1,6 mM de PMSF e 10  $\mu$ g/mL) e a realização de ciclos de sonicação e centrifugação para coleta dos sobrenadantes. No entanto, não conseguiu obter resultados satisfatórios para a citocina IFN- $\gamma$ , que apresentou perdas protéicas que chegaram a até 80% do conteúdo testado. A partir desta experiência, optamos por introduzir modificações na metodologia de extração das citoninas: utilizamos um tampão de extração contendo um diferente coquetel de inibidores de proteases (*Complete*, *Boehringer Mannheim*, Germany), e substituímos os ciclos de sonicação pela extração por tração manual das citocinas com auxílio de pestilos plásticos (*Sigma Mota Cordless*, *St Louis*, USA). Com isto, nenhuma perda protéica pôde ser aparentemente observada para todas as citocinas testadas. Embora tenhamos obtido um controle satisfatório deste parâmetro na metodologia utilizada, vale salientar que os níveis reativos de citocinas nas amostras aqui testadas podem não refletir sua real concentração. Este fato pode encontrar

sua explicação nos limites de detecção dos testes obtidos para cada citocina testada. Mesmo que seja prudente considerar estes aspectos na análise dos resultados, julgamos que nossos achados vão ao encontro e aperfeiçoam aqueles da literatura, obtidos por metodologias diversas daquela aqui empregada.

As citocinas são mediadores protéicos que atuam, tanto na imunidade natural quanto na adquirida. Regulam a magnitude da resposta imune influenciando o crescimento e diferenciação de vários tipos celulares, principalmente linfócitos. Dependendo da natureza e dose antigênica, os linfócitos T podem secretar distintas citocinas. Alternativamente, diferentes antígenos podem estimular diferentes subpopulações de linfócitos T, denominados linfócitos T-auxiliares (*T helper*, Th), a secretarem diferentes tipos de citocinas. A subpopulação Th<sub>1</sub> é importante indutora das reações de hipersensibilidade do tipo tardio, mediada por células, e as citocinas envolvidas nesse tipo de resposta são IL-12, IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Th<sub>2</sub> é outra subpopulação de linfócitos que produz IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e baixos níveis de TNF e são mais importantes para a imunidade humoral. Postula-se que a ativação preferencial de tais subpopulações pode ser responsável pelos diferentes aspectos clínico-patológicos de algumas doenças, incluindo as doenças periodontal e apical (MOSMANN & COFFMAN, 1989; COFFMAN & MOSMANN, 1991; SCOTT & KAUFMANN, 1991; FUJIHASHI *et al.*, 1996; MOSMANN & SAD, 1996; KABASHIMA *et al.*, 1998; TAKAHASHI, 1998). No entanto, Letterio & Roberts (1998), conceituaram um outro subgrupo de linfócitos T denominado Th<sub>3</sub>, o qual produz TGF- $\beta$  e parece estar envolvido em mecanismos imunossupressores.

O presente estudo demonstra resultados com significativa presença de IFN- $\gamma$  (70%) e IL-4 (24%) nos tecidos císticos. No entanto, onde detectamos IFN- $\gamma$  não

encontramos reatividade para IL-4. Isso poderia indicar que o perfil TH<sub>1</sub>, representado pelo IFN- $\gamma$ , seria uma característica importante na modulação da resposta inflamatória em alguns cistos, enquanto, em outros, a modulação estaria associada principalmente pelo perfil TH<sub>2</sub>, representado por IL-4. Nos tecidos de granulomas periapicais, não detectamos positividade para citocina IL-4, o que possibilitaria a predominância de um perfil TH<sub>1</sub> nestas lesões. No entanto, observamos positividade de TGF- $\beta$  em todas as lesões estudadas. A presença de TGF- $\beta$ , associada a IL-10 e IgA tem caracterizado um perfil tipo Th<sub>3</sub>. Todavia, não avaliamos IL-10 e IgA no presente estudo para viabilizar um melhor julgamento do quadro encontrado. Neste sentido, não pudemos identificar, baseado nos dados encontrados, um padrão definido de modulação da resposta inflamatória que se aplicasse a todas as lesões. É possível que isto seja resultante das constantes modificações qualitativas e quantitativas no perfil antigênico no micro-ambiente periapical.

Os mecanismos patogênicos associados à reabsorção óssea periapical são pobremente entendidos, mas certos fatores, incluindo citocinas e óxido nítrico, são considerados responsáveis por este fenômeno (MEGHJI *et al.*, 1996; TACKEISHI *et al.*, 1996, 1998, 1999; HOMNA *et al.*, 1998; KABASHIMA *et al.*, 1998; WALKER *et al.*, 2000; GERVÁSIO *et al.*, 2002). Citocinas inflamatórias como IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-3, IL-6, IL-11 e GM-CSF tem sido demonstradas possuir a capacidade de promover reabsorção óssea osteoclástica (STASHENKO *et al.*, 1998).

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 participariam na modulação da dinâmica da remodelação óssea (BERTOLINI *et al.*, 1986; STASHENKO *et al.*, 1991; LI *et al.*, 1995; KAMOLMATYAKUL *et al.*, 2001). Reproduzindo estes achados, estudos *in vitro* e *in vivo* (em humanos e animais) apontam para evidências de que estas citocinas tem sido

consideradas potenciais agentes moduladores do processo de remodelação óssea associado às lesões apicais (TAKEICHI *et al.*, 1996; 1998; KAWASHIMA & STASHENKO, 1999). Estas citocinas induziriam a produção de NO em vários tipos celulares, incluindo do tecido ósseo (KABASHIMA *et al.*, 1998; TACHIBANA *et al.*, 2000).

Osteoclastos e osteoblastos são as principais células envolvidas nos processos de remodelação óssea, em que a seqüência de reabsorção e formação óssea ocorrem de forma coordenada. A teoria que NO mediaría a sinalização intercelular no processo de remodelação óssea existente entre osteoblastos e osteoclastos, regulando a remodelação óssea no local da inflamação, especialmente em doenças associadas com citocinas como o artrites reumatóides e doença periodontal tem sido ratificada (HUGLES, 1995; CHAE *et al.*, 1997; KABASHIMA *et al.*, 1998; TAKEICHI *et al.*, 1998; SUZUKI *et al.*, 2002). Evidências mostram que, quando combinados, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 e lipopolissacarídeos super-induzem a expressão de iNOS em uma variedade de células (XIE *et al.*, 1992; TACHIBANA *et al.*, 2000). Por outro lado, tem sido relatado que NO em altas concentrações suprimiria a reabsorção óssea; em contraste, em baixas concentrações, estimularia a reabsorção óssea mediada por IL-1 (RAUSTON *et al.*, 1995).

De fato, IFN- $\gamma$  e iNOS tem sido encontrados expressos em células constituintes do infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos e tecido epitelial presentes em lesões apicias humanas, muito embora em níveis desconhecidos (KABASHIMA *et al.*, 1998; TAKEICHI *et al.*, 1996, 1998; WALKER *et al.*, 2000).

TNF- $\alpha$ , por outro lado, está presente, de forma significativa, na iniciação e desenvolvimento do processo inflamatório de reabsorção óssea periapical em lesões produzidas experimentalmente (KAWASHIMA & STASHENKO, 1999). Contudo, nas lesões em humanos, seu papel carece de melhor compreensão, haja visto que, na maioria

dos casos estudados, as lesões estão estabelecidas. Danin *et al* (2000), encontraram somente duas amostras de granulomas apicais positivas para TNF- $\alpha$  dos 25 casos estudados. Estes dados parecem concordantes com os de Artese *et al* (1991), que obtiveram baixos números de macrófagos expressando esta citocina.

No presente estudo, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e NO foram encontradas em várias das amostras analisadas. Tanto IFN- $\gamma$  como TNF- $\alpha$  foram observadas em níveis mais altos nos cistos que nos granulomas. No caso de IFN- $\gamma$ , esta diferença foi estatisticamente significativa. Walker *et al* (2000), não encontraram diferenças significantes quanto a presença de IFN- $\gamma$  em lesões císticas e de granulomas apicais analisados imunohistoquimicamente. Os autores acreditam que estas lesões apresentem uma maior expressão de resposta imune humoral, mediada principalmente por citocinas antiinflamatórias, que modulariam a atividade da doença. Dos casos estudados por Danin *et al* (2000), apenas dois dos 13 casos de granulomas apresentaram níveis reativos para TNF- $\alpha$  que não foi detectada nos casos de cistos estudados. Estes achados merecem ser aprofundados, tendo em vista a identificação de possíveis fatores ambientais e do hospedeiro responsáveis por esta variação nos achados.

Nossos resultados também mostraram maiores concentrações de IFN- $\gamma$  no líquido cístico que nos tecidos. Estudos sobre a expansão da lesão cística mostram que, na cavidade, encontram-se diferentes tipos de proteínas resultantes da secreção celular (células na cápsula e epitélio) e de sua migração, predominantemente unidirecional, favorecida pela pressão oncótica intra-cavitária (BROWNE, 1992). Assim, seria de se esperar que houvesse uma relação estreita destes mediadores entre seu conteúdo tecidual e no líquido. Cabe ressaltar, contudo, que do tecido cístico só coletamos um fragmento tecidual que, em geral, estava situado distante do local de maior drenagem antigênica



(ápice radicular). A maior ou menor proximidade com este sítio poderia favorecer um maior ou menor número de células produtoras da citocina. No caso do líquido, a concentração poderia representar não só um efeito cumulativo a partir de drenagem para o lúmen cístico das proteínas da cápsula, como também de secreção ativa de produtos pelas células epiteliais, resultado de fenômenos progressos àqueles correntes no momento da coleta. Estas especulações mereceriam melhor análise, tendo em vista que fatores tais como meia vida da proteína, ação de proteinases, a intercorrência de injúrias focais, por exemplo, que em tese, poderiam interferir quantitativamente nos achados.

Embora tenhamos encontrado nas amostras estudadas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e NO em várias amostras das lesões císticas e granulomas, somente em dois e três casos respectivamente, houve concomitância de positividade para estes mediadores. Tomado em conjunto, este quadro pode ser compatível com um processo de crescimento lento da lesão estabelecida, em que os fenômenos de reabsorção, embora presentes, desenvolvem-se em ritmo lento (periódico), caracterizando o crescimento lento próprio às lesões periapicais crônicas.

A citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$  é produzida por células NK, células T CD8+ e subclasses Th<sub>1</sub> de células T CD4+ (PAUL, 1998; ABBAS *et al.*, 2000). Esta citocina tem como uma das principais funções a ativação de macrófagos, que por sua vez após ativados, são as principais fontes de citocinas como TNF- $\alpha$  e quimiocinas e NO. A presença de macrófagos é extremamente importante para a resposta protetora em lesões apicais, bem como para o desenvolvimento e perpetuação da resposta inflamatória, embora sua frequência seja variavelmente relatada em granulomas e cistos radiculares. Como o macrófago tem sido apontado como célula central na secreção destes mediadores, é

possível que um reduzido número de células ativadas estejam presentes nesta fase (ARTESE *et al.*, 1991).

Nossos achados mostram que os níveis de NO encontrados foram estatisticamente associados à presença de limites radiográficos difusos, o que pode ser compatível com a presença de inflamação ativa na interface da lesão com o osso alveolar. Embora os níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nestas lesões também tenham sido maiores, não houve diferenças estatisticamente significantes para aqueles encontrados nas lesões com limites definidos. Este achado, deve ser considerado a luz de nossa interpretação de que os limites da imagem radiográfica torna-se mais definido à medida da maior deposição de colágeno na interface óssea e a diminuição da inflamação, entendida como estimuladora de atividade osteolítica. Não podemos deixar de considerar a limitação da imagem radiográfica e a possibilidade da imagem refletir algum fenômeno pregresso ao momento da coleta, como já comentamos anteriormente. Por outro lado, significantes níveis de NO tem sido espontaneamente produzidos por períodos prolongados em tecidos inflamados e estaria associado com a inflamação crônica. É interessante que, quatro dos cinco casos NO positivos, apresentaram positividade também para IFN- $\gamma$ , mas somente em dois houve concomitância de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e NO nas lesões císticas. Estes dados reforçam a tese de que, em função das múltiplas influências do micro-ambiente periapical, as lesões periapicais podem ser reguladas e delicadamente balanceadas pelas atividades destes mediadores (TAKEICHI *et al.*, 1998, 1999). Seria importante definir assim, quais seriam estes níveis básicos a partir dos quais o mediador atuaria como indutor de reabsorção ou reparação óssea, a partir de informações objetivamente mensuráveis da presença de reabsorção óssea.

Outrossim, encontramos uma associação estatisticamente significativa entre a presença de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  com lesões apresentando aumento de volume e IFN- $\gamma$  em

lesões com sintomatologia dolorosa. Este achado, não foi ainda descrito na literatura. Lim *et al* (1994), encontraram que lesões periapicais apresentavam uma tendência a apresentar maiores níveis de IL-1 $\beta$ , sem que estes níveis, contudo, fossem estatisticamente diferentes daqueles observados em lesões assintomáticas. Em outros estudos (MATSUO *et al.*, 1992; RODINI & LARA, 2001) observam-se uma associação da presença de macrófagos com sintomatologia (percussão/palpação) e aumento de volume. Em conjunto estes dados sugerem que os macrófagos seriam essenciais para os sintomas clínicos, no entanto, não está exatamente claro como cada sintoma é provocado e como os macrófagos são envolvidos. Entretanto, o influxo de substâncias antigênicas do interior do canal radicular provavelmente estariam aumentadas nestas lesões com sintomatologia, bem como sua resposta imunológica. Nesta situação, macrófagos migrariam para o local da inflamação, fagocitariam algumas substâncias antigênicas e as apresentariam às células B e T. Dessa forma, secretariam produtos inflamatórios os quais seriam importantes para o desenvolvimento de sinais e sintomas nos dentes envolvidos. Estes resultados devem merecer melhor análise no sentido de se verificar se os mecanismos que modulariam a sintomatologia estaria inequivocamente associada àqueles envolvidos na expansão da lesão a reabsorção óssea.

IL-4 é uma citocina produzida principalmente por células Th<sub>2</sub>, mastócitos e basófilos. Possuem várias ações biológicas como a estimulação de células B promovendo um “*switching*” de classe para IgE, estimulando o desenvolvimento de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> a se diferenciarem em células Th<sub>2</sub> e inibição de ativação de macrófagos (ABBAS *et al.*, 2000). Esta citocina tem sido encontrada em lesões periapicais e seus efeitos antiinflamatórios são descritos como essenciais na modulação do processo de remodelação óssea no periápice (KABASHIMA & NAGATA, 2001).

Em nosso estudo, IL-4 foi observada apenas nos cistos radiculares (24%), refletindo os achados de Kabashima *et al* (1998), que não encontraram esta citocina em granulomas apicais analisados pela sua expressão imunohistoquímica. Neste trabalho, os autores encontraram uma grande quantidade de células expressando IFN- $\gamma$ , IL-1 e iNOS, o que caracterizaria, a seu ver, a predominância de uma resposta imune tipo Th<sub>1</sub> no progresso das lesões apicais.

Tem sido mostrado que IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  atuam como inibidoras de IFN- $\gamma$  e iNOS *in vitro* (GAJEWSKI & FITCH, 1988; FIORENTINO *et al.*, 1991; MOSMANN & MOORE, 1991; TAKEISHI *et al.*, 1998). Em nosso estudo, casos positivos para IL-4 foram negativos para IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , ou de outro modo, os níveis estariam tão baixos que não puderam ser detectados. Pode ser que, nos casos em questão, a resposta imune local esteja associada à presença de plasmócitos, linfócitos e mastócitos, secretores de IL-4. Há evidências indicando uma maior presença de plasmócitos e linfócitos expressando CD<sub>30</sub> (YANAGISAWA, 1980; CURY *et al.*, 1998) e mastócitos degranulados na área de expansão cística (TERONEN *et al.*, 1996). Walker *et al* (2000), observaram um maior número de células expressando IL-4 e IL-6 nas lesões apicais o que lhe sugeriu a existência de uma resposta imune tipo Th<sub>2</sub> modulando seu desenvolvimento.

Por outro lado, IL-4 tem sido associada a efeitos inibitórios na reabsorção óssea por gerar efeitos negativos em osteoclastos (GOWEN & MUNDY *et al.*, 1986, WATANABLE *et al.*, 1990). IL-4 estimula a expressão de fosfatase alcalina e colágeno tipo I, além de estimular a síntese de osteocalcina, proteína da matriz óssea, em osteoblastos levando à mineralização (UENO *et al.*, 1990; RIANCHO *et al.*, 1993). Se analisados por este prisma, nossos achados podem traduzir uma fase das lesões em que a resposta do hospedeiro esteja superando a agressão microbiana, ou que esta tenha se

alterado, quantitativa ou qualitativamente, produzindo uma menor agressão aos tecidos apicais.

Adicionalmente pudemos observar uma relação estatisticamente significativa entre o tratamento endodôntico e a presença de IFN- $\gamma$  e IL-4. Estes casos apresentavam falhas no tratamento endodôntico, o que pode ter sido a causa para a permanência da lesão apical. Estudos microbiológicos têm demonstrado a prevalência de bactérias (*Enterococos*, anaeróbios facultativos) nos condutos radiculares tratados endodonticamente com persistência da lesão apical (RANTA *et al.*, 1988; MOLANDER *et al.*, 1994; SREN *et al.*, 1997). Seria oportuno, desta forma, avaliar nestes casos, quais e em que medida as alterações qualitativas e quantitativas da microbiota intra-canal afetariam a resposta imune apical. Sendo assim, esses persistentes microorganismos provocariam diferentes processos patológicos. A natureza destes processos e o meio pelo qual esta resposta imune agiria requer maiores estudos tanto na área microbiológica quanto imunológica.

Nossos resultados também mostraram uma relação estatisticamente significativa entre a presença de IL-4 e lesões sintomáticas. Este dado sugere que a base desta associação, embora seja desconhecida, esteja vinculada à presença de fenômenos reativos vasculares e exsudação focal neutrofílica. Ao analisar infiltrados celulares de lesões inflamatórias periapicais, tem-se observado uma proporção de mastócitos presentes nestas lesões (JOHANNESSEN, 1983; PERRINI & FONZI, 1985; KONTIAINEN *et al.*, 1986). Mastócitos contém numerosos grânulos citoplasmáticos, cujo conteúdo é degranulado para o espaço extracelular após sua ativação (SCHWARTZ, 1985). Teronen *et al* (1996), encontraram uma grande quantidade de mastócitos degranulados na área de expansão cística indicando uma alta atividade destas células nestas lesões. Triptase, um mediador derivado de mastócitos, tem sido implicado na destruição óssea. Heparina aumenta a

reabsorção óssea *in vitro* (GOLDHABER, 1965) e inibe a síntese de colágeno (HURLEY *et al.*, 1989). A administração crônica de heparina tem sido associada com osteoporose *in vitro* (GRIFFITH *et al.*, 1965). Outros grânulos citoplasmáticos contidos no interior destas células são: 1) Histamina: tem como funções principais o aumento da permeabilidade vascular e destruição/remodelação tecidual; 2) Prostaglandina D: promove a vasodilatação, broncoconstrição e quimiotaxia de neutrófilos para o local da inflamação; e 3) leucotrienos: têm as funções de prolongar a vasodilatação, promover a secreção de muco e aumentar a permeabilidade vascular (ABBAS *et al.*, 2000). Estas alterações poderiam concorrer não só para manifestações álgicas como a produção de edema e aumento de volume local.

Quando realizamos a análise de correlação de Qui quadrado entre dor espontânea e/ou palpação e aspecto histológico da lesão bem como, a correlação entre edema e aspecto histológico e também presença de tratamento endodôntico, observamos que pacientes com lesão cística apresentaram significativas sintomatologias como dor, edema e tratamento endodôntico. No entanto, as associações observadas poderiam estar relacionadas tanto com o fenômeno clínico bem como, o tipo de lesão que o paciente apresenta.

Nossos resultados também mostraram a presença de TGF- $\beta$  em todas as amostras teciduais bem como no líquido cístico. Este fato tem sido observado em lesões experimentalmente produzidas em animais e naquelas já estabelecidas em humanos (TYLER *et al.*, 1999; DANIN *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2000). Além disto, os níveis detectados foram, em geral, mais altos que aqueles observados para outras citocinas, realçando que os níveis nos granulomas foram mais elevados que os observados nas amostras císticas. Estes dados vão ao encontro daqueles encontrados por Danin *et al.* (2000), estudando amostras de lesões periapicais em humanos. Utilizando a técnica de

ELISA, os autores observaram concentrações de TGF- $\beta$  nos granulomas que variaram de 508 pg/mL à 10327 pg/mL, e entre 1680 à 2200 pg/mL nas amostras císticas. Acreditamos que as altas concentrações desta citocina encontradas em granulomas seja causada pela proximidade do fragmento estudado do ápice radicular, pois sendo o granuloma menor que a lesão cística, haveria maior concentração antigênica local, responsável, em tese, pelo desenvolvimento de respostas imunes mais intensas nesta lesão.

De forma semelhante às outras citocinas, o papel de TGF- $\beta$  nas lesões apicais ainda carece de melhor entendimento, especialmente no que tange as lesões humanas estabelecidas.

Sabe-se que a interação entre os produtos antigênicos da necrose tecidual e da infecção endodôntica com o tecido conjuntivo do ambiente apical compõe o quadro básico da inflamação apical e dos fenômenos de remodelação óssea conseqüentes (KAKEHASHI *et al.*, 1965; HAUSMANN *et al.*, 1972; LIN *et al.*, 2000). A liberação destes antígenos, contudo, modifica-se qualitativa e quantitativamente no decorrer da infecção pulpar, dada a interferências externas no ecossistema do conduto radicular. Esta variação acaba também por determinar alterações no curso da lesão, em especial a estabelecida: o crescimento da lesão se dá lentamente, alternando momentos de reabsorção osteoclástica e sua inibição com neoformação óssea. TGF- $\beta$  aparece como uma das principais citocinas envolvidas nesta mediação. (MUNDY, 1990; CENTRELLA *et al.*, 1991; CHENG & BATES, 1993).

Produzida por vários tipos celulares, (macrófagos, fibroblastos, eosinófilos, osteoblastos e osteoclastos), TGF- $\beta$  parece atuar na inibição da produção de osteoclastos (OURSLER *et al.*, 1991; VAES, 1998; TYLER *et al.*, 1999), e na remodelação óssea local (Mundy, 1990; Cheng & Bates, 1993). Há evidências a favor de uma maior incorporação de

fibronectina e colágeno na matriz óssea e uma diminuição da reabsorção óssea quando da presença de TGF- $\beta$  (TYLER *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2000).

Estudando experimentalmente a resposta inflamatória periapical em ratos, Lin *et al* (2000), observaram um grande número de macrófagos expressando TGF- $\beta$  na fase aguda das lesões, que se caracterizaria entre o 5° e 20° dias após exposição pulpar (fase de reabsorção óssea mais ativa). Este número decrescia à medida que as lesões se estabilizavam, traduzindo um período de crescimento mais lento das lesões (fase crônica). Nesta fase (após o 30° dia), os autores observaram maior expressão de TGF- $\beta$  em osteoblastos. Desta forma, os autores propuseram que os macrófagos teriam o papel central no início e desenvolvimento das lesões periapicais, onde TGF- $\beta$  estimularia células mononucleares a sintetizar IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6, as quais seriam fortes mediadores osteolíticos. Por outro lado, TGF- $\beta$  produzido por osteoblastos estimularia neoformação óssea, prevenindo excessiva reabsorção e conseqüente perda dental. Na linha destes comentários, Danin *et al* (2000), não encontraram níveis reativos de TGF- $\beta$  em nenhuma das amostras de cicatriz periapical. Nestas lesões há uma grande quantidade de tecido conjuntivo fibroso denso e ausência de neoformação óssea. Os autores sugerem que TGF- $\beta$  estaria “*downregulated*” na ausência de resposta inflamatória aos antígenos liberados do conduto radicular.

Analisando nossos resultados a luz destes conhecimentos, acreditamos que a presença de níveis elevados de TGF- $\beta$  nas amostras analisadas pode representar um fenômeno local compensador que acompanharia o processo de reabsorção na progressão da lesão. Nas lesões periapicais crônicas, reproduzindo o processo inflamatório crônico, que processos produtivos de reparo estão em algum grau presente, a reabsorção anda junto com



a remodelação. Caso os fatores agressores sejam totalmente removidos, TGF- $\beta$  induziria a regeneração óssea, acompanhando a regressão da lesão.

Em nosso estudo, procuramos correlacionar a presença e as concentrações de cada mediador analisado (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, TGF- $\beta$  e óxido nítrico) nas amostras teciduais dos císticos e as amostras correspondentes de líquido. De acordo com o teste de "Spearman", encontramos dados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ), somente para a citocina IL-4, não havendo concordância para as demais citocinas. Ao analisarmos a literatura, não encontramos nenhum resultado referente à esta correlação encontrada e seu provável significado. Gervásio (2000), também não encontrou concordância de positividade entre amostras de tecido e líquido císticos para as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-3, IL-6 e GM-CSF em seus resultados. É possível, como explicado em parágrafos precedentes, que a presença das citocinas ou de qualquer outro medidor no líquido cístico seja representativo de um fenômeno cumulativo, tradução de processos reativos progressivos, não coincidentes com aqueles presentes no momento da coleta.

Outro fator presente neste estudo, limitador da melhor visualização dos nossos resultados e da compreensão do processo patológico em curso nas diferentes lesões analisadas, foi a ausência de identificação do tipo e quantidade de células presentes no infiltrado inflamatório. Esta dificuldade está relacionada, em especial, ao tamanho das lesões. Quase sempre o granuloma periapical apresentava dimensões inferiores a 4 mm. No caso das lesões císticas, um fator impeditivo de seu melhor aproveitamento foi o fato de que, em várias lesões, as amostras obtidas foram provenientes de uma abordagem cirúrgica por marsupialização. Vale ressaltar, também, a ausência em nosso estudo de um parâmetro, objetivamente mensurável, que denunciasse a existência ou não do processo de

reabsorção óssea. Este fato limita uma melhor apreciação e interpretação dos níveis de reatividade encontrados para cada citocina.

Cabe ainda alguns comentários sobre os achados referentes as amostras teciduais empregadas como controle neste estudo. Em nosso trabalho, utilizamos amostras de polpas de dentes inclusos como controle negativos, na suposição de que a inflamação seria um evento improvável (BARKHORDER *et al.*, 1999; GERVÁSIO *et al.*, 2002). No entanto, surpreendentemente, os tecidos pulparem do controle negativo mostraram-se negativos somente para NO e IL-4. As concentrações para IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram baixas quando comparadas com TGF- $\beta$  (limite não detectável à 20 pg/g, limite não detectável à 25 pg/g e 1000 à 2500 pg/g com mediana igual à 1000 pg/g respectivamente). Não foi possível encontrar na literatura uma explicação para a presença de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  nos tecidos pulparem analisados. Pouco se conhece da presença de citocinas inflamatórias na ambiente tecidual associado aos dentes inclusos. Talvez, a interação entre os tecidos do folículo dental (saco dentário) e a polpa, através da circulação sanguínea, possa favorecer a detecção de citocinas no tecido pulpar. Neste sentido, alguns autores identificaram a presença de CSF-1 (M-CSF) em células de folículos implicados na erupção dental (QUE & WISE, 1997; GRIER *et al.*, 1998; WISE *et al.*, 1998). A presença de reabsorção óssea fisiológica associada à erupção dental poderia justificar estes resultados. Outro aspecto que poderia, como sugestão, justificar estes resultados seria a possível presença de estímulos antigênicos nestes tecidos. Vale salientar que dentes inclusos podem apresentar folículos dentários na vizinhança do tecido gengival de dentes erupcionados, susceptíveis, assim, à ação antigênica de microorganismos da placa dental. No entanto, estes achados mereciam melhor investigação. Gervásio (2000), detectaram a presença de GM-CSF nos tecidos

pulpaes usados também como controles negativos, contudo, não encontraram também uma justificativa para estes resultados.

TGF- $\beta$  tem sido implicado no processo de odontogênese e erupção dental. Na fase dental pré eruptiva, TGF- $\beta$  acumula-se no folículo dental, separando o órgão dental da cripta óssea, onde é invadida por osteoclastos (WISE & FAN, 1991). Além disso, fatores de crescimento tem sido implicados no processo de reabsorção dental associado à erupção dental (D'SOUZA & LITZ, 1995). Durante a fase de erupção, a produção de TGF- $\beta$  no tecido dental seria fundamental para o movimento do dente (SYMONS *et al.*, 1996). Gao *et al* (1998), analisaram a expressão de TGF- $\beta$  no desenvolvimento periodontal de ratos, por imunohistoquímica e hibridização *in situ*. Ao analisarem a presença de TGF- $\beta$  no ligamento periodontal, encontraram positividade para esta citocina também na polpa dental destes modelos experimentais, onde os osteoblastos ali presentes apresentaram-se fortemente marcados para TGF- $\beta$ . Em contraste, pouco se sabe sobre o papel de TNF- $\alpha$  no processo de erupção dental (URELES *et al.*, 2000).

De uma maneira geral a análise em conjunto dos resultados obtidos ressaltam a importância de citocinas IL-4, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e do mediador inflamatório óxido nítrico em lesões periapicais. A elucidação de mecanismos associados ao processo de reabsorção/remodelação óssea em lesões periapicais pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias efetivas para tratamentos anti-imunopatológicos de outras doenças crônicas associadas com citocinas que cursam com perdas ósseas como artrites reumatóides, osteoporose e periodontites.

## 7. CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos com esse trabalho levam às seguintes conclusões:

- O processamento dos tecidos realizados sem o uso de sonicação demonstrou ser mais adequado para a detecção das citocinas estudadas.
- A mediação do crescimento das lesões periapicais estabelecidas está mais relacionada a presença de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e NO nas lesões císticas do que nos granulomas. Nas lesões císticas com tratamento endodôntico, IFN- $\gamma$  e IL-4 parecem ser mais significativas nesta mediação.
- TGF- $\beta$  deve participar na modulação do processo inflamatório e da remodelação óssea nas lesões periapicais estabelecidas, principalmente nos granulomas periapicais.
- Não observamos uma correlação definida de positividade e níveis de reatividade entre os diferentes mediadores estudados em um mesmo tipo e entre os diferentes tipos de amostras.
- INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, e NO estão presentes nos fenômenos que modulam os sinais e sintomas associados às lesões periapicais estudadas.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

1. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Citokines; Immediate Hypersensitivity. In: Schmitt William. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 4<sup>a</sup> edition 2000. p. 259; 437.
2. AKAMINE, A.; HASHIGUCHI, I.; TORIYA, Y.; MAEDA, K. Immunological examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions. **Endodontic Dental Traumatology**, Copenhagen, v. 10, p. 121-128, 1994.
3. ALAVI, A. M.; GULABIVALA, K.; SPEIGHT, P. M.; Quantitative analysis of lymphocytes and their subsets in periapical lesions. **International Journal of Endodontics**, Baltimore, v.31, n.31, p. 233-241, 1998.
4. ANAN, H.; AKAMINE A., MAEDA K.; An enzyme histochemical study of the behavior of rat bone cells during experimental apical periodontis. **Journal of Endodontics**, Baltimore; n. 19, v. 2; p. 83 – 86, 1993.

5. ARTESE, L.; PLATTELI, A.; QUARANTA, M.; COLOSANTE, A.; MUSIANI, P. Immunoreactivity for interleukin 1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.17, p. 483-487, 1991.
6. BANDO, Y.; HENDERSON, B.; MEGHJI, S.; POOLE, S.; HARRIS, M. Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v. 22, p. 221-227, 1993.
7. BARKHORDAR, R. A.; HAYASHI, C.; HUSSAIN, M. Z. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. **Endodontic Dental Traumatology**, Copenhagen, v. 67, n. 5, p. 26-7, 1999.
8. BARNER, M.; MOHRS, M.; BROMBACHER, F. & KOPF, M. Differences between IL-4R alpha- deficient and IL-4- deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses. **Currents of Biology**, v. 8, p. 669-672, 1998.
9. BARTON, B. E.; MAYER, R. IL-3 induces differentiation of bone marrow precursor cells to osteoclast-like cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 143, p. 3211-3216, 1989.
10. BERTOLINI, D. R.; NEDWIN, G. E.; BRINGMAN, D.; SMITH, D.; MUNDY, G. R. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation *in vitro* by human tumour necrosis factors. **Nature**, London, v.319, p. 516-519, 1986.
11. BROWNE, R. M. **Investigative pathology of odontogenic cysts**. Boston: Crc , 1992. p. 253.

12. CANNON, P. J.; YANG, X.; SZABOLCS, M.; RAVALLI, S.; SCIACCA, R. R.; MICHLER, R. E. The role of inducible nitric oxide synthase in cardiac allograft rejection. **Cardioasc. Research**, v. 38, p. 6-15, 1998.
13. CENTRELLA, M.; MCCARTHY, T.L.; CANALIS, E. Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. **Journal of Bone Joint Surgery American**, New York, v. 73, p.1418-1428, 1991.
14. CHAE, H. J.; PARK, R. K.; CHUNG, H. T.; KANG, J. S.; KIM, M. S.; CHOI, D. Y.; BANG, B. G.; KIM, H. R. Nitric oxide is a regulator of bone remodelling. **Journal of Pharmacol and Pharmacology**, London, v. 49, n. 9, p. 897-902, 1997
15. CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança em laboratórios**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 1997. p. 56.
16. CHENG, T. L.; BATES, R. L. Recombinant human transforming growth factor-beta 1 modulates bone remodeling in a mineralizing bone organ culture. **Journal of Bone Mineral Research**, New York, v. 8, p. 423-434, 1993.
17. COFFMAN, R. L.; MOSMANN, T. R. CD4<sup>+</sup> T-cell subsets: regulation of differentiation and function. **Immunology Research**, v. 142, p. 7-9, 1991.
18. CURY, V. C.; SETTE, P. S.; DA SILVA, J.V.; DE ARAUJO, V. C.; GOMES, R. S. Immunohistochemical study of apical periodontal cysts; **Journal of Endodontics**, Baltimore, n. 24; v. 1; p. 36 – 7, 1998.
19. DANIN, J.; LINDER, L.E.; LUNDQVIST, G.; ANDERSSON, L. Tumor necrosis factor-alpha and transforming growug factor-beta in chronic periapical lesions. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, St. Louis, v. 90, n. 4, p. 514 – 517, 2000.
20. DERYNCK R. Transforming growth factor-beta. In: Tomson AW, editor. **The cytokine hndbook**. 2nd ed. London: Academic Press; 1994. p. 319-42.

21. DEWHIRST, F. E.; STASHENKO, P.; MOLE, J. E.; TSURUMACHI, T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identify with interleukin 1 $\beta$ . **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 135, p. 2562-2568, 1985.
22. D'SOUZA, R. N.; LITZ, M. Analysis of tooth development in mice bearing a TGF- $\beta$ 1 null mutation. **Connect Tissue Res**, v. 32, p. 41-46, 1995.
23. ENRIQUEZ, F. J.; RIGGS, M. W. Role of immunoglobulin and monoclonal antibodies against p23 in controlling murine *Cryptosporidium parvum* infection. **Infective Immunology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 4469-4473, 1998.
24. EVANS, D. M.; RALSTON, S. H. Nitric oxide and bone. **Journal of Bone Mineral Research**, New York, v. 11, p. 300-305, 1996.
25. FAVUS, M. J. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. 3. Ed. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1996. p. 477.
26. FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 137, p. 3815-3822, 1991.
27. FIRESTEIN, G. S.; ROEDER, W. D.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **Journal of Experimental Medicine**, Washington, v. 170, p. 518-525, 1989.
28. FORMIGLI, L.; ORLANDINI, S. Z.; TONELLI, P.; GIANNELLI, M.; MARTINI, M.; BRANDI, M. L.; BERGAMINI, M.; ORLANDINI, G. E. Osteolytic processes in human radicular cysts: morphological and biochemical results. **Journal Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v. 24, p. 216-220, 1995.



29. FORSTERMANN, U.; KLEINERT, H.; GATH, I.; SCHWARZ, P.; CLOSS, E; DUN, N. Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types. **Advances of Pharmacology**, New York, v. 34, p. 171-185, 1995.
30. FUJIHASHI, K.; YAMAMOTO, M.; HIROI, T.; BAMBERG, T. V.; MCGHEE, J. R.; KIYONO, H. Selected Th1 and Th2 cytokine mRNA expression by CD4(+) T cells isolated from inflamed human gingival tissues. **Clinical Experimental of Immunology**, Oxford, v. 103, n. 3, p. 422-428, 1996.
31. FUKUTO, J. M. Chemistry of nitric oxide: Biologically relevant aspects. In: **Advances in Pharmacology**, v.34, chapter 1, p. 1-15, Ed. Ignarro L. & Murad F. Acad. Press, 1995.
32. GADANO, A. C.; SOGNI, P.; HELLER, J.; MOREAU, R.; BORIES, P. N.; LEBREC, D. Vascular nitric oxide production during the development of two experimental models of portal hypertension. **Journal of Hepatology**, Chicago, v. 30, p. 896-903, 1999.
33. GAJEWSKI, T. F.; FITCH, F. W. Anti-proliferative effect of IFN- $\gamma$  in immune regulation. I. IFN- $\gamma$  inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 140, p. 4245-4252, 1988.
34. GAO, J.; SYMONS, A. L.; BARTOLD, P. M. Expression of Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) in the Developing Periodontium of Rats. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 77, n. 9, p. 1708-1716, 1998.
35. GAO, Z.; MACKENZIE, I. C.; RITTMAN, B. R.; KORSZUN, A. K.; WILLIAMS, D. M.; CRUCHLEY, A. T. Immunocytochemical examination of immune cells in periapical granulomata and odontogenic cysts. **Journal of Oral Pathology**, Copenhagen, v. 17, p. 84 -90, 1988.

36. GEMMELL, E.; SEYMOUR, G. J. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 77, n. 1, p. 16-26, 1998.
37. GERVÁSIO, A. M. **GM-CSF, IFN-gama, IL-3 e IL-6 em cistos radiculares humanos**. Uberlândia-MG, Universidade Federal de Uberlândia, Departamento de Imunologia e Parasitologia, 2000 (Tese, mestrado).
38. GERVÁSIO, A. M.; SILVA, D. A. O.; TAKETOMI, E. A.; SOUZA, C. J. A.; SUNG, S. S. J.; LOYOLA, A. M. Levels of GM-CSF, IL-3 and IL-6 in fluid and tissue from human radicular cysts. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 81, n. 1, p. 64-68, 2002.
39. GOLDHABER, P. Heparin enhancement of factors stimulating bone resorption in tissue culture. **Science**, Washington, v. 147, p. 407-408, 1965.
40. GOWEN, M.; MUNDY, G.R. Preferential inhibition of cytokine-stimulated bone resorption by recombinant interferon-gamma. **Journal of Bone Mineral Research**, New York, v. 5, p. 469-474, 1986.
41. GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWISKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBOUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [N] nitrate in biological fluids. **Annals of Biochemistry**, v.126, p.131-138, 1982.
42. GRIER, R. L.; ZHAO, L.; ADAMS, C. E.; WISE, G. E., Secretion of CSF-1 and its inhibition in rat dental follicle cells: implications for tooth eruption. **European Journal of Oral Science**, Copenhagen, v. 106, n. 3, p. 808-815, 1998.
43. GRIFFITH, G. C.; NICHOLS, G.; ASHER, J. D.; FLANAGA, N. Heparin osteoporosis. **JAMA**, v.193, p. 88-94, 1965.

44. GROUX, H.; O'GARRA, A.; BIGLER, M.; ROULEAU, M.; ANTONENKO, S.; DE VRIES, J. E.; RONCAROLO, M. G. A CD4+ T- cell subset inhibits antigen- specific T- cell responses and prevents colitis. **Nature**, London, v. 389, p. 737-742, 1997.
45. HAUSMANN, E.; WEINFELD, N.; MILLER, W.A. Effects of lipopolysaccharides on bone resorption in tissue culture. **Calcif. Tissue Research**, New York, v. 9, p. 272-282, 1972.
46. HIBBS, J. J.; TAINTON, R.; VAVRIN, Z.; Macrophage cytotoxicity: role for L- arginine deaminase activity and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, Washington, v. 235, p.473-476, 1987.
47. HIRATA, M.; KAGE, M.; HARA, T.; YONEDA, Y.; ZHANG, M. & FUKUMA, T. *Schistosoma japonicum* egg granuloma formation in the interleukin-4 or interferon- $\gamma$  deficient host. **Parasites and Immunology**, v. 23, p. 271-280, 2001.
48. HÖENIG, J. F.; RORDORF-ADAM, C.; SIEGMUND, C.; ERARD, F. Measurement of interleukin 1 alpha and 1 beta (Il-1 alpha and Il-1 beta) in human cystic lesions of the jaw. Implications for the pathogenesis of radicular cysts. **Bull. Group. Int. Rech. Sci. Stomatol. et Odontol.**, Bruxelles, v. 34, n. 2, p. 67- 72, 1991.
49. HOFFMANN, A.; KLAUSHOFER, K.; GLEISPACH, H.; LEIS, H. J.; LUGER, T.; KOLLER, K.; PETERLIK, M. Gamma interferon inhibits basal and interleukin-1 prostaglandin production and bone resorption in neonatal mouse calvaria. **Biochemistry Biophysic Research Communication**, Oxford, v. 143, p. 38-43, 1987.
50. HONMA, M.; HAYAKAWA, Y.; KOSUGI, H.; KOIZUMI, F. Localization of mRNA for inflammatory cytokines in radicular cyst tissue by *in situ* hybridization, and induction of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to

- radicular cyst contents. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v. 27, p. 399-404, 1998.
51. HUGHES, F. J. Cytokines and cell signalling in the periodontium. **Oral Disease**, California, v.1, p. 259-265, 1995.
52. HURLEY, M. M.; FALL, P. M.; KREAM, B. E.; RAISZ, L. G. Heparin inhibits collagen synthesis and steady state levels of procollagen m RNA. **Journal of Bone Mineral Research**, New York, v. 4, p. 731-736, 1989.
53. IALENTI, A.; IANARO, A.; MONCADA, S.; DI ROSA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **European Journal of Pharmacology**, London, v. 211, p. 177-182, 1992.
54. JOHANNESSEN, A. C.; NILSEN, R.; SKAUG, N. Enzyme histochemical identification of mononuclear cells in human dental periapical inflammatory lesions. **Scand Journal Dental Research**, v. 92, p. 325, 1983.
55. KABASHIMA, H.; NAGATA, K. Presence of Interleukin-4-Producing Cells for Human Bone Regeneration after Application of Guided Tissue Regeneration Membranes. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 27, n. 7, p. 444-448, 2001.
56. KABASHIMA, H.; NAGATA, K.; MAEDA, K.; IJIMA, T. Interferon- $\gamma$ -producing cells and inducible nitric oxide synthase-producing cells in periapical granulomas. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v. 27, p. 95-100, 1998.
57. KAMOLMATYAKUL, S.; CHEN, W.; LI, Y-P. Interferon- down-regulates gene expression of cathepsin K in osteoclasts and inhibits osteoclasts formation. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 80, n. 1, p. 351-355, 2001.

58. KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FRITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, St. Louis, v. 20, p. 340-349, 1965.
59. KAWASHIMA, N.; STASHENKO, P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 44, p. 55-66, 1999.
60. KEILIN, D.; HARTREE, E. F. Reaction of nitric oxide with haemoglobin and methaemoglobin. **Nature**, London, v. 548, p. 1937-1945, 1937.
61. KHAN, I. A.; SCHWARTZMAN, J. D.; MATSUURA, T.; KASPER, L. H. A dichotomous role for nitric/oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 1395-1396, 1997.
62. KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Indirect detection of nitric oxide effects: a review. **Annals of Clinical Laboratory Science**, Baltimore, v. 26, p. 501-11, 1996.
63. KONTIAINEN, S.; RANTA, H.; LAUTENSCHLAGER, I. Cells infiltrating human periapical inflammatory lesions. **Journal of Oral Pathology**, Copenhagen, v.15, n. 10, p. 544-546, 1986.
64. KOPP, W.; SCHWARTING, R. Differentiation of T lymphocyte subpopulations, macrophages, and HLA-DR-restricted cells of periapical granulation tissue. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 15, p. 72-75, 1989.
65. KRAMER, I. R. H.; PINDBORG, J. J.; SHEAR, M. **Histological typing of odontogenic tumors**. 2. Ed. Berlin: Springer-Verlag, 1991.

66. KRONCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. **Clinical Experimental of Immunology**, Oxford, v. 113, p. 147-56, 1998.
67. KURIHARA, H.; KOBAYASHI, Y.; FRANCISCO, I. A.; ISOSHIMA, O.; NAGAI, A.; MURAYAMA, Y. A microbiological and immunological study of endodontic-periodontic lesions. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 21, n. 12, p. 617-621, 1995.
68. LERNER, U. H. Regulation of bone metabolism by the kallikrein-kinin system, the coagulation cascade, and the acute-phase reactants. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, St. Louis, v. 78, n. 4, p. 481-493, 1994.
69. LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TGF- $\beta$ . **Annals of Review in Immunology**, v. 16, p. 137-161, 1998.
70. LIEW, F. Y.; COX, F. E. G. Nonspecific defense mechanisms: the role of nitric oxide. **Immunology Today**, London, v. 12, p.17-21, 1991.
71. LIM, G. C.; TORABINEJAD, M.; KETTERING, J.; LINKHARDT, T. A.; FINKELMAN, R. D. Interleucine 1 in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. **Journal Endodontics**, Baltimore, n. 20, v.5, p. 225-227, 1994.
72. LIN, S. K.; HONG, C. Y.; CHANG, H. H.; CHIANG, C. P.; CHEN, C. S.; JENG, J. H.; KUO, M. Y. Immunolocalization of macrophages and transforming growth factor-beta 1 in induced rat periapical lesions. **Journal of Endodontics**, Baltimore, n. 26, v. 6, p. 335 - 340, 2000.
73. LI, Y. P.; ALEXANDER, M.; WUCHERPFENNING, A. L.; YELICK, P.; CHEN, W.; STASHENKO, P. Cloning and complete coding sequence of a novel human cathepsin expressed in giant cells of osteoclastomas. **Journal of Bone Mineral Research**, New York, v. 14, p. 487-499, 1995.

74. LOUTIT, J. F.; NISBET, N. W. The origin of osteoclasts. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 161, p. 193-203, 1982.
75. MARCH, C. J.; MOSLEY, B.; LARSEN, A.; CERRETTI, D. P.; BRAEDT, G.; PRICE, V.; GILLIS, S.; HENNEY, C. S.; KRONHEIM, S. R.; GRABSTEIN, K.; CONLON, P. J.; HOPP, T. P.; COSMAN, D. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. **Nature**, London, v. 315, p. 641-645, 1985.
76. MATSUO, T.; EBISU, S.; SHIMABUKURO, Y.; OHTAKE, T.; OKADA, H. Quantitative analysis of immunocompetent cells in human periapical lesions: Correlations with clinical findings of the involved teeth. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 18, n. 10, p. 497-500, 1992.
77. MEGHJI, S.; QURESHI, W.; HENDERSON, B.; HARRIS, M. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 41, n. 6, p. 523-531, 1996.
78. MIYASAKA, N.; HIRATA, Y. Nitric oxide and inflammatory arthritides. **Life Science**, Washington, v. 61, n. 21, p.2037-2081, 1997.
79. MIYAZONE, K.; HELDIN, C. H. Structure, function and possible clinical application of transforming growth factor-beta. **Journal of Dermatology**, Copenhagen, v. 19, p. 644-647, 1992.
80. MILLER, M. J. S.; GRISHAM, M. B. Nitric oxide as a mediator of inflammation? You had better believe it. **Medicine and Inflammation**, Chicago, v. 4 p. 387-396, 1995.
81. MOLANDER A.; REIT, C.; DAHLEN, G.; KVIST, T. Microbiological examination of root filled teeth with apical periodontitis. **International Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 2, p. 104, 1994.

82. MONCADA, S.; PALMER, R.; HIGGS, E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacology Review**, London, v. 43, p. 109-113.
83. MOSMANN, T. R.; CHERWISNKI, H.; BOND, M. W.; GREDLIN, M.A.; COFFMANN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profile of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 2348-2357, 1986.
84. MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annals of Review in Immunology**, v. 7, p. 145-173, 1989.
85. MOSMANN, T. R.; MOORE, K.W. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. **Immunology Today**, London, v.12, p.49-53, 1991.
86. MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, London, v. 17, p. 138-146, 1996.
87. MUNDY, G. R.; BONEWALD, L. F. Role of TGF-beta in bone remodeling. **Annals of New York Academy Science**, New York, v. 593, p. 91-97, 1990.
88. NILSEN, R.; JOHANNESSEN, A. C.; SKAUG, N.; MATRE, R. In situ characterization of mononuclear cells in human dental periapical inflammatory lesions using monoclonal antibodies. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, St. Louis, v. 58, n. 2, p. 160-165, 1984.
89. OURSLER, M. J.; CORTESE, C.; KEETING, P.; ANDERSON, M. A.; BONDE, S. K.; RIGGS, B. L. Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone. **Endocrinology**, Bethesda, v.129, p. 3313-3320, 1991.



90. OURSLER, M. J. Osteoclast synthesis and secretion and activation of latent transforming growth factor beta. **Journal of Bone Mineral Research**, New York, v. 9, p. 443-452, 1994.
91. PALMER, R.; ASHTON, D. & MONCADA, S. Vascular endothelial cellssynthesize nitric oxide from L - arginine. **Nature**, London, v. 333, p. 664-668, 1988.
92. PAUL, W. E. **Fundamental of immunology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1998. p. 1589.
93. PERINI, N.; FONZI, L. Mast cells in human peripalical lesions: ultrastructural aspects and their possible physiopathological implications. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 11, p. 197, 1985.
94. QUE, B. G.; WISE, G. E. Conony-stimulating factor-1 and monocyte chemotactic protein-1 chemotaxis for monocytes in the rat dental follicle. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 42, n. 12, p. 855-860, 1997.
95. RANTA, K.; HAAPASALO, M. Monoinfection of root canal with *Pseudomonas aeruginosa*. **Endodontics and Dental Traumatology**, Copenhagen, v. 4, p.269-272, 1988.
96. RAUSTON, S. H.; HO, L. P.; HELFRICH, M.H.; GRABOWSKI, P. S.; JOHNSTON, P. W.; BENJAMIN, N. Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. **Journal of Bone Mineral Research**, New York, v. 10, p. 1040-1049, 1995.
97. RIANCHO, J. A.; ZARRABEITIA, M. T.; OLMOS, J. M.; AMADO, J. A.; GONZALEZ-MACIAS, J. Effects of interleukin-4 on human osteoblast-like cells. **Journal of Bone Mineral Research**, New York, v. 21, p. 53-61, 1993.
98. ROBINSON, D.S. Predominant Th2- like bronchoalveoalr T- lymphocyte population in atopic asthma. **New England Journal of Medicine**, London, v. 326, p. 298-304, 1992.

99. RODINI, C. O.; LARA, S. V. Study of the expression of CD68+ macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cyts. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, Philadelphia, v. 92, n. 2, p. 221-227, 2001.
100. RUBIN, E.; FARBER, J. L. **Pathology**. 3. Ed. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1999. p. 1664.
101. SCHMIDT, H. H.; POLLOCK, J. S.; NAKANE, M.; FORSTERMANN, U.; MURAD, F. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. **Cell. Calcium.**, v. 13, p. 427-34, 1992.
102. SCHWARTZ, L. B. **The mast cell**. New York: Churchill Livingstone, 1 st edition, 1985.
103. SCOTT, P.; KAUFMANN, S. H. E. The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. **Immunology Today**, London, v. 12, n. 10, p.346-348, 1991.
104. SELTZER, S.; FARBER, P. A. Microbiologic factors in endodontology. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, St. Louis, v. 78, n. 5, p. 634-645, 1994.
105. SHAFER, W. G.; HINE, M. K.; LEVY, B. M. **Patologia bucal**, 4. Ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985. p. 837.
106. SHEAR, M. **Cysts of the oral regions**. London: Wright. PSG, 2 Ed, 1983. p. 218.
107. SILVA-TEIXEIRA, D. N.; CONTIGLI, C.; GOES, A. M. Cytokine profile associated to effector functions of human T cell clones specific for *Schistosoma mansoni* antigens. **Hum Immunol.**, v. 59, p. 219-224, 1998.
108. SILVA, J. V. **Cisto radicular: estudo histológico e imunohistoquímico**. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Departamento de Patologia Bucal, 1995. 56 p. (Dissertação, Mestrado).

109. SKALERIC, U.; KRAMAR, B.; PETELIN, M.; PALVICA, Z.; WAHL, S. M. Changes in TGF- $\beta$ 1 levels in gingival crevicular fluid and serum associated periodontal inflammation in humans and dogs. **European Journal of Oral Science**, Copenhagen, v. 96, p. 458-463, 1997.
110. SMITH, G.; MATTHEWS, J. B.; SMITH, A. J.; BROWNE, R. M. Immunoglobulins-producing cells in human odontogenic cysts. **Journal of Oral Pathology**, Copenhagen, v. 16, p. 45-48, 1988.
111. SREN, E. K.; HAAPASALO, M.; RANTA, K.; SALMI, P. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. **International Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 30, p. 91-95, 1997.
112. STASHENKO, P.; JANDINSKI, J. J.; FUJIYOSHI, P.; RYNAR, J.; SOCRANSKY, S. S. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 62, n. 8, p. 504-509, 1991.
113. STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Crit. Ver. Oral Biol. Med.**, n. 9, n. 4, p. 498-521, 1998.
114. STASHENKO, P.; WANG, C. Y.; TANI-ISHII, N.; YU, S. M. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, St. Louis, v. 78, n. 4, p. 494-502, 1994.
115. STASHENKO, P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. **Endodontics and Dental Traumatology**, Copenhagen, v. 6, p. 89-96, 1990.
116. STERN, M. H.; DREIZEN, S.; MACKLEER, B. F.; LEVY, B. M. Antibody-producing cells in human periapical granulomas and cysts. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 18, p. 422-426, 1981.

117. SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, St. Louis, v. 78, n. 4, p. 522-530, 1994.
118. SUZUKI, N.; OKIJI, T.; SUDA, H. Enhanced expression of activation associated molecules on macrophages of heterogeneous populations in expanding periapical lesions in rat molars; **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 67-79, 1999.
119. SUZUKI, T.; KUMAMOTO, H.; OOYA, K.; MOTEGI, K. Expression of inducible nitric oxide synthase and heat shock proteins in periapical inflammatory lesions; **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v. 31, p. 488-493, 2002.
120. SYMONS, A. L.; LEONG, K.; WATERS, M. J.; SEYMOUR, G. J. The effect of growth hormone on root development in the rat mandibular molar. In: biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation. **The Harvard Society for the Advancement of Orthodontics**, Birmingham, v. 22, p. 449-457, 1996.
121. TAKAHASHI, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. **International journal of Endodontics**, London, v. 31, p. 311-325, 1998.
122. TAKEICHI, O.; HAYASHI, M.; TSURUMACHI, T.; OGIHARA, H.; OGISO, B.; SAITO, T. Inducible nitric oxide synthase activity by interferon gamma producing cells in human radicular cysts. **International Journal of Endodontics**, Tokyo, v. 2, n. 32, p. 124-130, 1999.
123. TAKEICHI, O.; HAYASHI, M.; TSURUMACHI, T.; SAITO, T.; SAITO, I. Production of human inducible nitric oxide synthase in radicular cysts. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 24, n. 3, p. 157-160, 1998.

124. TAKEICHI, O.; SAITO, I.; OKAMOTO, Y.; TSURUMACHI, T.; SAITO, T. Cytokine regulation on the synthesis of nitric oxide "in vivo" by choronically infected human polymorphonuclear leucocytes. **Immunology**, v. 93, n. 2, p. 275-280, 1998.
125. TAKEICHI, O.; SAITO, I.; TSURUMACHI, T.; MORO, I.; SAITO, T. Expression of inflammatory cytokine genes "in vivo" by human alveolar bone- derived polymorphonuclear leucocytes isolated from chronically inflammed sites of bone resorption. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v. 58, p. 244-248, 1996.
126. TASHIBANA, H.; KAKUTA, S.; YAGAMI, K.; NAGUMO, M. Effects of cytokines on the production of nitric oxide in a chondrogenic cell line established from human osteogenic sarcoma. **Oral disease**, California, v. 6, p. 303-309, 2000.
127. TERONEN, O.; HIETANEN, J.; LINDQVIST, C.; SALO, T.; SORSA, T.; EKLUND, K. K. Mast cell-derived tryptase in odontogenic cysts. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v.25 p. 376-381, 1996.
128. THIEMERMANN, C. The role of the L-Arginine pathway in circulatory shock. **Advances of Pharmacology**, New York, v. 28, p. 45-79, 1994.
129. TORABINEJAD, M.; EBY, W. C.; NAIDORF, I. J. Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. **Journal of Endodontis**, Baltimore, v. 11, n. 11, p. 479-488, 1985.
130. TORABINEJAD, M.; KEETTERING, J. D. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 11, n. 3, p. 122-125, 1985.
131. TORABINEJAD, M. Mediators of pulpal and periapical pathosis. **Journal of Calification Dental Association**, California, v. 14, n. 12, p. 22-25, 1986.

132. TORABINEJAD, M. Mediators of acute and chronic periradicular lesions. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, St. Louis, v. 78, n. 4, p. 511-21, 1994.
133. TORABINEJAD, M. The role of immunological reaction in apical cyst formation and the fate of epithelial cells after root canal therapy: a theory. **International Journal of Oral Surgery**, Copenhagen, v. 12, p. 14-22, 1983.
134. TYLER, L. W.; MATOSSIAN, K.; TODD, R.; GALLAGHER, G. T.; WHITE, P. R.; WONG, D. T. Eosinophil-derived transforming growth factors (TGF-alpha and TGF-beta 1 in human periradicular lesions. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 25, p. 619 - 624, 1999.
135. UENO, K.; KATAYAMA, T.; MIYAMOTO, T.; MYIAMOTO, T.; KOSHIHARA, Y. Interleukin-4 enhances *in vitro* mineralization in human osteoblast-like cells. **Biochemistry Biophysic Research Communication**, Oxford, v. 189, p. 1521-1526, 1992.
136. URELES, M. S.; JOLANTA, M.; CHRZAN, B. A.; LOUIS, A.; NORTON, D. M. D.; EDWARD, F. A role for TNF in bone resorption of deciduous molars in human beings. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, Copenhagen, v. 118, n. 2, p. 196-202, 2000.
137. VAES, G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. **Clinical Orthopedical**, Philadelphia, v. 231, p. 239-71, 1988.
138. VELLA, A.T.; PEARCE, E. J. CD4+ Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, Th0 like stage. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 148, p. 2283-2290, 1992.
139. XIE, Q.; CHO, H.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R.; SWIDERICK, K.; LEE, T.; DING, A.; TROSO, T.; NATHAN, C. Cloning and characterization of inducible nitric

- oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, Washington, v. 256, p.225-229, 1992.
140. WAHL, S. M.; ALLEN, J. B.; WONG, H. L. Antagonistic and agonistic effects of transforming growth factor- $\beta$  and IL-1 in rheumatoid synovium. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 145, p. 14-19, 1990.
141. WALKER, K. F.; LAPPIN, D. F.; TAKAHASHI, K.; HOPE, J.; MACDONALD, D. G.; KINANE, D. F. Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry. *European Journal of Oral Sciences*, Copenhagen, v. 108, n. 3, p. 195-201, 2000.
142. WANG, C.; STASHENKO, P. Characterization of bone-resorbing activity in human periapical lesions. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v. 19, n. 3, p. 107-111, 1993.
143. WATANABE, K.; TANAKA, Y.; MORIMOTO, Y.; YAHATA, K.; ZEKI, K.; FUJIHIRA, T.; YAMASHITA, U.; ETO, S. Interleukin-4 as a potent inhibitor of bone resorption. *Biochemistry and Biophysical Research Communication*, Oxford, v. 172, p. 1035-1041, 1990.
144. WISE, G. E.; FAN, W. Immunolocalization of transforming growth factor beta in rat molars. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, Copenhagen, v. 20, p. 75-80, 1990.
145. WISE, G. E.; MARKS, S. C. JR.; ZHAO, L. Effect of CSF-1 on in vivo expression of c-fos in the dental follicle during tooth eruption. *European Journal of Oral Science*, Copenhagen, v. 106(suppl. 1), p. 397-400, 1998.
146. WODNAR-FILIPOWICZ, A.; HEUSSER, C. H.; MORONI, C. Production of the haematopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE-mediated activation. *Nature*, London, v. 339, p. 150-152, 1989.

147. YANAGISAWA, S. Pathologic study of periapical lesions 1. Periapical granulomas: clinical, histopathologic and immunohistopathologic studies. **Journal of Oral Pathology**, Copenhagen, v. 9, p. 288-300, 1980.
148. YANG, J.; TYLER, L. W.; DONOFF, R. B.; SONG, B.; TORIO, A. J.; GALLAGHER, T. Salivary EGF regulates eosinophil-derived TGF- $\alpha$  expression in hamster oral wound. **American Journal of Physiology**, London, v. 270, p.191-202, 1996.
149. ZECCHI-ORLANDINI, S., FORMIGLI, L., GIANNELLI, M., MARTINI, M., TONELLI, P., BRANDI, M. L., BERGAMINI, M., ORLANDINI, G. E. Radicular cysts are involved in the recruitment of osteoclast precursors. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v. 25, p. 325-330, 1996.



***ANEXOS:***

## ANEXO I

**Universidade Federal de Uberlândia****COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG  
CEP - 38400-089 ☎ (034) 239 4131 - 235-2078

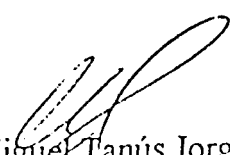
Uberlândia, 03 de dezembro de 2001.

Processo nº 053/2001

**PROJETO DE PESQUISA:** "Determinação da Presença de Óxido Nítrico e Citocinas Inflamatórias (TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) associadas a sua modulação em cistos radiculares humanos".

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Adriano Mota Loyola

O projeto acima identificado, foi aprovado para ser realizado conforme os autores se comprometem.



Prof. Miguel Tanús Jorge  
CEP/UFU

**ANEXO II**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Laboratório de Patologia Bucal

**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Eu,.....

Doc. nº. ...., consinto na coleta de lesão periapical como procedimento necessário à terapêutica normal, e posterior utilização da mesma para realização de pesquisa em diagnóstico laboratorial de lesões císticas, sob orientação do Prof. Dr. Adriano Mota Loyola.

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a investigação.

Será respeitado o caráter confidencial das informações fornecidas, não sendo permitida a minha identificação.

Uberlândia, .....de.....de 200....

.....

Assinatura

## ANEXO III



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Laboratório de Patologia Bucal

## FICHA DE BIÓPSIA PARA LESÕES PERIRADICULARES

CÓDIGO DO CASO : .....

DADOS PESSOAIS DO PACIENTE:

Nome: .....

Idade: ..... Data de Nascimento: ...../...../.....

Endereço: ..... Fone: .....

Prontuário nº: .....

Sexo:  Masculino  FemininoCor:  Leucoderma  Melanoderma

EXAME e HISTÓRIA CLÍNICA :

 Dor  Edema  Eritema Exudação  Purulenta  Hemorrágica História antiga de traumatismo no local História de drenagem no local História de punção prévia no local Uso de antibióticoterapia ? Qual ? .....

(não recomendar o uso de antibiótico ou antiinflamatório antes da coleta)

 Uso de antiinflamatório ? Qual ? ..... Presença de tratamento endodôntico?  Favorável  Não favorável Comprometimento da Lâmina Óssea  Vestibular  Lingual

Observações: .....

CARACTERÍSTICAS DA LESÃO :

Tamanho: .....

Tempo de Lesão:

Localização:

8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8
8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8

Imagem Radiográfica :  Radiolúcida  Radiopaca

Cirurgião

Responsável: .....

... Fone: .....

Diagnóstico Clínico: .....