

AURÉLIA MARTINS GERVÁSIO

MON
43.701.135
Gervásio
Aurélia

**GM-CSF, IFN- γ , IL-3 e IL-6 em CISTOS
RADICULARES HUMANOS**

SISBI/UFU



1000193773

*Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia, para concorrer ao
título de Mestre, pelo Curso de Pós-
graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas.
Área de Concentração: Imunologia.*

Orientador:
Prof. Dr. ADRIANO MOTA LOYOLA

Co-orientador:
Prof. Dr. ERNESTO AKIO TAKETOMI

Universidade Federal de Uberlândia
Minas Gerais - Brasil
Fevereiro - 2000

*“Nós não somos os criadores de nossas idéias;
são elas que nos dão forma... E cada um de nós
carrega a tocha que, no fim do caminho, outro
levará.” (Care G. Jung)*

Dedico esse trabalho ...

Ao meu marido, Glaucion.

*Nos méritos de minhas conquistas,
há muito de sua presença.*

Aos meus filhos, Guilherme e Hugo.

*Souberam compreender os momentos
de minha ausência.*

A Deus.

*Foi minha âncora nos momentos
mais difíceis, permitindo-me
encontrar o equilíbrio necessário
para o término desta etapa.*

e aos professores

Deise Aparecida Oliveira Silva,

Dr. Adriano Mota Loyola e

Dr. Ernesto Akio Taketomi.

*“Aquele que vigia modestamente
algumas ovelhas sob as estrelas, se tem
consciência de seu papel, descobre que
não é apenas um servidor. É uma
sentinela. E cada sentinela é
responsável por todo o império.”*

Saint - Exupéry

Agradecimento Especial

Agradeço aos meus pais, ABDALA e GLORINHA. Renunciando aos seus sonhos, me deram a valiosa oportunidade de estar recebendo o título de Mestre.

AGRADECIMENTOS

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

*Prof. Dr. Adriano Mota Loyola,
Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi,
Prof.a Deise Aparecida Oliveira Silva e
Prof. Dr. Cássio José Alves Souza.*

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

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

Prof. Dr. José Roberto Mineo, Prof. Dr. Joe Sung de Charlottesville (Virginia, EUA), Prof. Dr. Ednaldo Carvalho Guimarães, cirurgiões Drs. Túlio Humberto Spini, Alexandre Vieira Fernandes, Darcey Zanetta Barbosa, Vanessa Cristina Mendes, José Augusto G. P. de Oliveira e Fausto Borges Campos, Prof. Dr. Marcos Duarte, Prof. Dr. Sílvio Favoreto Jr., Prof. Dra. Erika de Arruda Chaves, Dra. Maria Aparecida de Souza, Prof. Jair Pereira da Cunha Júnior, Hélio Elias Costa Júnior, Antônio Thomás Júnior, Max Aor Marques, Luiz Antônio dos Santos, Valdico de Faria e Sr. Sérgio Nogueira da Silva – Pecplan ABS.

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

João Martins Neto, Rosineide Marques Ribas, Andréa Marques S. Pires e Fabiana Martins de Paula, Patrícia Marcolino Teixeira, Elisabeth Oliveira Miranda, Gabriela Lícia S. Ferreira, Guilherme Rosemberg Guimarães Queirós, Maria Aparecida Souza Lage e Mônica Camargo Sopelete,

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, Minas Gerais com parcial auxílio financeiro da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
1- INTRODUÇÃO	01
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
3- PROPOSIÇÃO	27
4- MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 - Casuística	29
4.2 - Coleta das amostras	30
4.3 - Padronização do processamento das amostras	32
4.4 - Processamento de tecidos císticos e controles	37
4.5 - Líquido cístico	43
4.6 - Ensaio imunoenzimático (ELISA) padrão para detecção das citocinas GM-CSF, IFN- γ , IL-3 e IL-6 em tecido e líquido cístico	43
4.7 - Expressão dos resultados	47
4.8 - Análise estatística	48
5- RESULTADOS	49
5.1- Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas	49
5.2- Padronização do processamento das amostras de granulomas	53
5.3- Tecido cístico	57
5.4- Amostras controles	59
5.5- Líquido císticos	61
6- DISCUSSÃO	64
7- CONCLUSÕES	82
ABSTRACT	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXOS	98

RESUMO

Os maiores estímulos para o desenvolvimento dos cistos radiculares, associados aos restos epiteliais de Malassez, são as endotoxinas bacterianas que agem como mitógenos e estímulos para a produção de citocinas. A atuação de determinadas citocinas liberadas pelas células do sistema imunológico tem importante papel no crescimento cístico e conseqüente destruição do tecido ósseo circunvizinho.

O objetivo desse trabalho foi determinar algumas citocinas relacionadas com processo inflamatório e reabsorção óssea: GM-CSF, IFN- γ , IL-3 e IL-6; no líquido e tecido de cistos radiculares humanos, através de técnica imunoenzimática (ELISA).

O limite de detecção dos testes pelo ELISA variaram de 62,5 a 125pg/ml para GM-CSF; de 9,8 a 39,1pg/ml para IFN- γ ; de 250 a 500pg/ml para IL-3 e de 9,4 a 18,8pg/ml para IL-6. Os resultados obtidos nas amostras de líquido cístico foram de 42,8% das lesões, apresentando GM-CSF (66 a 1180pg/ml) e 92,8%, apresentando IL-6 (47 a 4096pg/ml). Não foram detectadas as citocinas IFN- γ e IL-3 em nenhuma amostra. Os resultados obtidos nas amostras de tecido cístico foram de 9,8% das lesões reativas para IFN- γ (53 a 71pg/ml), 28,6% para IL-3 (277 a 713pg/ml), 86,4% para IL-6 (17 a 835pg/ml) e 95,8% para GM-CSF (68 a 496pg/ml).

Com esse estudo, pode-se afirmar que existe a ocorrência das citocinas IFN- γ e IL-3 no tecido de cistos radiculares, apesar de estarem presentes em baixo número de lesões e que estão presentes, ainda, GM-CSF e IL-6 no líquido e tecido dos cistos radiculares humanos. Estas citocinas podem estar participando do processo inflamatório e crescimento cístico, como também, da reabsorção óssea característica no sítio dessas lesões.

1. INTRODUÇÃO

O cisto radicular (Kramer et al., 1992) é uma lesão odontogênica inflamatória periapical, caracterizada pela presença de uma cavidade patológica revestida por epitélio, contendo, no seu interior, material líquido ou semi-sólido.

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, 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. No seu crescimento, vários fatores têm sido implicados, entre os quais: atividade proliferativa epitelial, desenvolvimento de uma pressão hidrostática na cavidade e a reabsorção óssea na periferia da lesão. 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.

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.

Dentre as citocinas identificadas em lesões periapicais e periodontais, nas quais a reabsorção óssea caracteriza a evolução da doença, podemos citar: interleucina-1 (IL-1), IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, interferon-gama (IFN- γ) e fator

de necrose tumoral α (TNF α) (Formigli et al., 1995, Takeichi et al., 1996, Gemmell & Seymour, 1998, Honma et al., 1998, Kabashima et al., 1998). Pretendemos identificar e quantificar as citocinas inflamatórias GM-CSF, IFN- γ , IL-3 e IL-6, em cistos radiculares, que têm sido associadas ao processo de remodelação óssea, procurando contribuir no aprofundamento do conhecimento do processo de crescimento destas lesões.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O cisto radicular é uma das lesões mais comuns dos maxilares (Kramer et al., 1992). É de origem odontogênica e inflamatória, situada na região periapical da raiz do dente. Está caracterizada 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, composto de infiltrado inflamatório, em geral mononuclear, revestida, interiormente, por epitélio

pavimentoso estratificado, não queratinizado, com graus variáveis de organização (Browne, 1992).

Sua ocorrência na espécie humana tem sido relatada desde a pré-história (Salama & Hilmy, 1951; Neiburger, 1977; Shear, 1983), constituindo-se, hoje-em-dia, na lesão cística mais comum nos maxilares (Shear, 1983).

Tem sido considerada uma lesão relativamente freqüente, perfazendo, em alguns estudos, mais de 40% das lesões periapicais verdadeiras (Bhaskar et al., 1966; Lalonde & Luebke, 1968; Stapafore et al., 1990). Estudos com metodologia diagnóstica mais criteriosa têm apontado para menores percentuais de freqüência, que não ultrapassam 15% das patologias periapicais (Nair et al., 1996). Afeta, preferencialmente, os dentes anteriores da maxila de pacientes leucodermas do sexo masculino (Shear, 1983). Embora apresente comportamento benigno, seu crescimento leva à destruição e comprometimento da integridade óssea local. Além disso, pode constituir-se em sede potencial do desenvolvimento de lesões mais agressivas, tais como, o carcinoma epidermóide intra-ósseo (Eversole et al., 1975). 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; Hoenig 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. 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. 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 (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. Os constituintes celulares e os mediadores, 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; Browne, 1992).

Em linhas gerais, o processo inflamatório periapical assume características semelhantes àquele desenvolvido em outros locais do organismo. Os fenômenos irritativos (alterativos) que inicialmente têm lugar no tecido periapical, estão associados à liberação de substâncias antigênicas teciduais e bacterianas (lipopolissacarídeos, ácido lipoteicóico, peptídeoglicanos), originadas no curso da necrose e infecção pulpar (Shafer et al, 1985; Torabinejad, 1986; Browne, 1992; Seltzer & Farber, 1994; Sundqvist, 1994; Kurihara et al., 1995).

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 C₄, D₄, E₄, óxido nítrico), quimiotaxia para células inflamatórias e fagocitose (fibrinopeptídeos, leucotrienos, C5a, C567), bem como aqueles relacionados à fase crônica, da qual os fenômenos imunológicos participam de forma significativa. Neste sentido, ganha realce a participação de diferentes tipos de citocinas no processo de inter-ativação celular, mediação de fenômenos imunológicos celulares e humorais, algumas delas com ação lítica direta ou indireta sobre os tecidos locais (Page, 1991; Torabinejad, 1994; Rubin & Farber, 1999).

As aminas vasoativas como a histamina, liberada principalmente por mastócitos estimulados por antígenos ligados à imunoglobulina IgE, causam dilatação capilar e aumento da permeabilidade vascular. A ativação do fator Hageman (80 kD), no dano tecidual, ativa os sistemas calicreína-cininas, cascata de coagulação e fibrinolítico. As cininas causam quimiotaxia de células inflamatórias e são consideradas como os principais mediadores da dor associada à inflamação. O sistema complemento, quando ativado, libera mediadores da quimiotaxia, fagocitose e da permeabilidade vascular, além de atuar sobre as paredes celulares produzindo sua ruptura. Esse processo causa destruição tecidual, dor e edema. O ácido aracdônico, quando metabolizado pelas vias da

ciclooxigenase e lipoxigenase, produz, respectivamente, prostaglandinas e leucotrienos. As prostaglandinas, particularmente a PGE_2 e a PGI_2 , estão associadas com a permeabilidade vascular e a ocorrência de dor. As atividades biológicas dos leucotrienos incluem efeitos quimiotáticos para neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, aumento da permeabilidade e liberação de enzimas lisossômicas dos neutrófilos polimorfonucleares e dos macrófagos (Torabinejad et al., 1985; Torabinejad & Kettering., 1985; Hoenig et al., 1991; Lerner, 1994; Torabinejad, 1986, 1994).

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 T4 *helper* e T8 supressor. Matsuo et al. (1992) demonstraram, através de técnica imunohistoquímica, em tecidos de granulomas e cistos periapicais humanos, a ocorrência de 50% das células do infiltrado mononuclear, apresentando imunoglobulinas (85% de IgG, 15% de IgA e pouquíssima IgM), 40% de células T (2/3 de

CD4+ ou *helper*, 1/3 de CD8+ ou célula T citotóxica/supressora) e 10% de monócitos ou macrófagos. Outros trabalhos têm identificado os 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. Alavi et al. (1998) têm observado maior proporção de linfócitos T *helper* e B em lesões de dentes não tratados em relação as lesões de dentes tratados endodonticamente. Segundo os autores, a presença destas células falaria a favor da ocorrência de fenômenos imunológicos associados a 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 3,9 células por campo de 250x, em média. Os resultados indicaram a participação tanto da resposta imune celular quanto da humoral na patogênese do cisto radicular. Sugere, todavia, que a presença de marcação acentuada de células IgG positivas e marcação significativa de células CD3 e CD20 positivas, levam a supor que a resposta

humoral esteja predominando, induzida por uma linhagem celular do tipo Th₂.

Silva (1995) encontrou neutrófilos associados ao epitélio cístico. Comenta o autor que a presença de neutrófilos polimorfonucleares estaria relacionada à formação do lúmen cístico e de seu conteúdo, pois são eles que liberam enzimas proteolíticas, causando a lise da matriz celular de células do meio formando exudato. Observa ainda que, dentre as células identificadas, havia uma predominância de macrófagos, células de Langerhans e linfócitos T em cistos sem proliferação epitelial enquanto que o percentual de plasmócitos e neutrófilos era maior no grupo de cistos com proliferação epitelial significativa, sugerindo que estes cistos estivessem em processo de crescimento mais ativo.

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. Nos estudos de Cury et al. (1998) foi notado um percentual de 7,8 a 2,8% de linfócitos CD30⁺ em cistos radiculares com epitélio hiperplásico, estatisticamente maior em relação ao percentual de 2,5 a 1,5%, encontrado no epitélio cístico atrófico. Eles discutem

que, se considerarmos que estes cistos com epitélio hiperplásico estão em estágio ativo de crescimento e que lesões com epitélio atrófico estejam inativas, seus resultados estariam relacionados com o crescimento dos cistos radiculares. Tais autores consideram que os linfócitos Th₂ são caracterizados por alta expressão de glicoproteínas tipo CD30, portanto, sugerem que a resposta imune tipo Th₂ pode estar associada ao crescimento ativo do cisto radicular.

Menor proporção de células IgE positivas tem sido encontrada tanto em cistos como em granulomas dentários (Yanagisawa, 1980; Stern et al., 1981; Matthews & Mason, 1983; Smith et al., 1987). Por outro lado, entre 2% e 5% das células do infiltrado inflamatório são representadas por mastócitos (Pulver et al., 1978; Yanagisawa, 1980; Kontiainen et al., 1986). A presença de mastócitos, juntamente com IgE, indicaria um tipo de hipersensibilidade imediata (Hipersensibilidade tipo I), nas lesões periapicais.

Em 1979, Torabinejad & Kettering detectaram complexos antígeno-anticorpo em 23 das 25 lesões periapicais humanas pesquisadas. Os autores comentam que a produção local de imunoglobulinas, a presença de complexos antígeno-anticorpo e, por conseguinte, a atuação do sistema complemento podem parcialmente explicar a produção da injúria tecidual, através

das reações de hipersensibilidade e o crescimento gradativo das lesões periapicais. Os resultados indicam que as reações imunes poderiam ter importância na patogênese das lesões periapicais inflamatórias.

Em síntese, pode-se notar a presença de antígenos, IgE e mastócitos em lesões periapicais, desencadeando reações imunológicas do Tipo I. A presença de complexos imunes e fragmentos do Sistema Complemento, indicando reações do Tipo II e Tipo III e a ocorrência de diferentes tipos de linfócitos e linfocinas, como fator de ativação de osteoclastos (OAF), sugerindo a participação de reações imunológicas do Tipo IV (Torabinejad, 1986; Ranney, 1991). Na Figura 1 estão representados diagramaticamente, os principais aspectos interativos entre os fenômenos específicos e inespecíficos na mediação da resposta inflamatória.

REAÇÃO INFLAMATÓRIA NÃO ESPECÍFICA

REAÇÃO IMUNOLÓGICA ESPECÍFICA

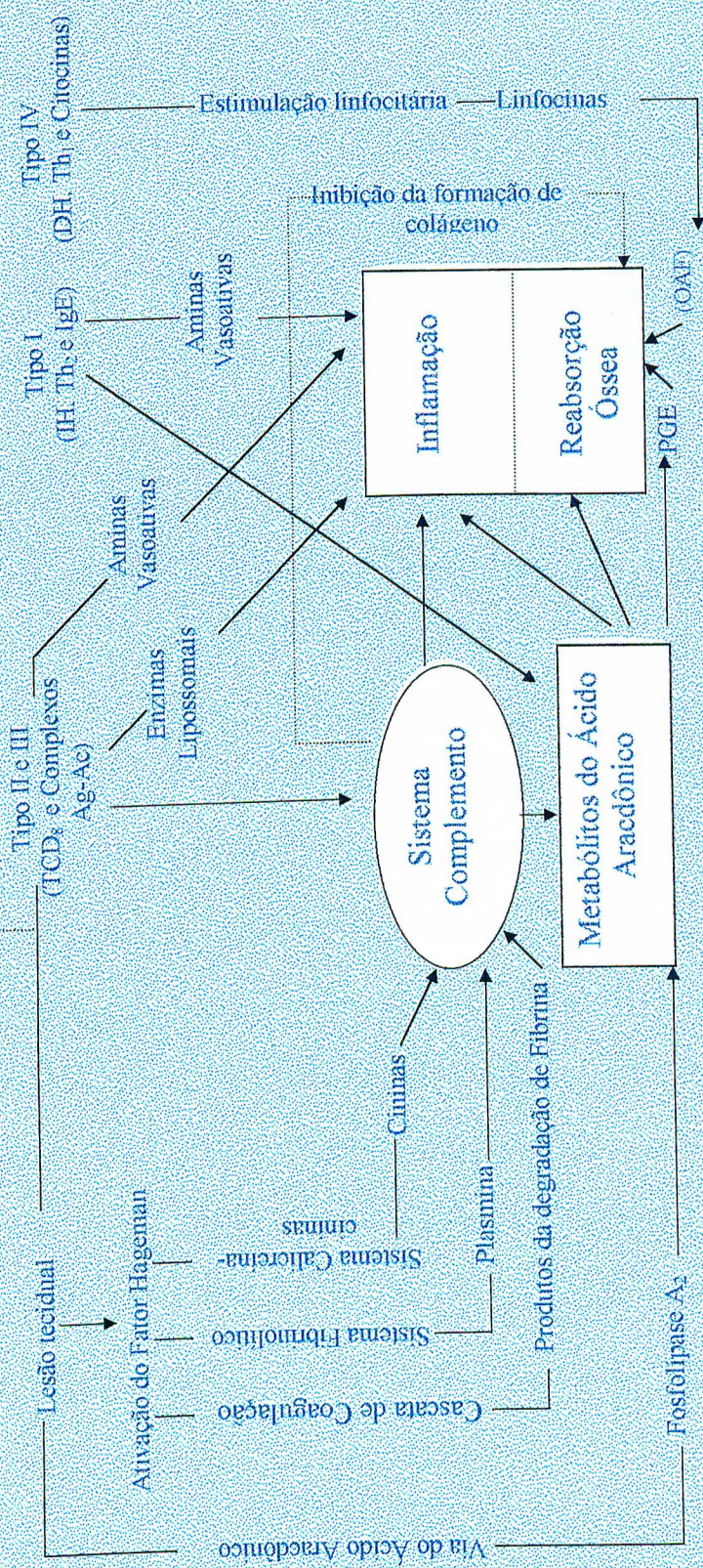


Figura 1. Iniciação e amplificação da inflamação e reabsorção óssea por reações imunológicas inespecíficas e específicas (adaptado de Torabinejad *et al.*, 1985). Abreviações: Ac, anticorpo; Ag, Antígeno; IH, Hipersensibilidade imediata; DH, Hipersensibilidade tardia; Th, Célula T helper; TCD₈, Célula T CD₈⁺ (citotóxica); OAF, Fator de Ativação de Osteoclasto; PGE₂, Prostaglandina E₂

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 da lesão (Stashenko, 1990; Hoenig et al., 1991; Wang & Stashenko, 1993; Formigli et al., 1995; Zecchi-Orlandini et al., 1996).

Os osteoclastos são as células diretamente implicadas na reabsorção óssea e os osteoblastos atuam como reguladores da sua ativação. O que permite esse controle é a presença ou não dos Fatores de Ativação dos Osteoclastos (OAF), descritos originalmente por Horton et al. em 1972, como uma linfocina de reabsorção óssea, produzida por monócitos, e de outras citocinas, através de linfócitos, monócitos ou macrófagos, capazes de interferir na atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Não está claramente definido, contudo, se a expansão cística promoveria a reabsorção óssea ou se a reabsorção óssea facilitaria o crescimento da lesão (Lerner, 1994).

Harvey et al. (1984) observaram, *in vitro*, através de radioimunoensaio, a síntese de grandes quantidades de prostaglandinas, principalmente a PGE₂ e collagenase, em

cistos radiculares. Os produtos solúveis de cultura de células mononucleares do sangue de indivíduos saudáveis, estimuladas pelo mitógeno fitohemaglutinina (PHA), adicionados em cultura de fibroblastos derivados de cistos apicais, aumentaram a síntese das prostaglandinas PGE_2 e $\text{PGF}_2\alpha$ e da prostaciclina 6-Keto- $\text{PGF}_1\alpha$ na razão de 10:1:5. Esta razão foi maior ao comparar com a de 7,5:1:2, encontrada no meio de cultura dos fragmentos dos cistos. Isto sugeriu aos autores que fibroblastos da cápsula cística seriam a principal fonte dos fatores de reabsorção óssea.

Outros mediadores das fases efetoras do sistema imune específico e inespecífico 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 elos 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 (Abbas et al., 1995; Paul, 1998). Em se tratando das lesões periapicais inflamatórias, as citocinas são investigadas,

principalmente quanto à sua participação no processo de reabsorção óssea.

Meghji et al., em 1989, cultivando *in vitro* cápsulas de cistos odontogênicos, constataram, por análise colorimétrica, atividade de reabsorção óssea dada pela liberação de cálcio. Adicionalmente, avaliaram a proliferação de timócitos de camundongos (atividade típica da interleucina 1 - IL-1), através de contagem por cintilação, e a proliferação e síntese de prostaglandina E₂ por fibroblastos e osteoblastos, respectivamente, através do teste de coloração com azul de metileno e radioimunoensaio. Os resultados fizeram os autores sugerirem que a IL-1 (17 kD) poderia ter importante papel na expansão cística por seus efeitos diretos na proliferação fibroblástica e na reabsorção óssea, e pela estimulação da síntese de prostaglandina em fibroblastos estromais da cápsula cística.

A IL-1 possui as formas α e β com mesmo peso molecular, porém somente 26% de seqüências de aminoácidos homólogas (March et al., 1985). A IL-1 é estimuladora das células T e B e atua 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. O principal componente do fator de ativação de osteoclastos (OAF) foi caracterizado como sendo idêntico à monocina IL-1 β (Stashenko, 1990) e a ela estão sendo atribuídos 60% ou mais do total da atividade de reabsorção óssea. A ação de IL-1 α , TNF α (Fator de Necrose Tumoral α), linfotoxinas (TNF β) e as interações sinérgicas entre eles são responsáveis pelo restante da atividade do OAF (Dewhirst et al., 1985). O TNF α e linfotoxinas são, primariamente, mediadores citotóxicos produzidos por macrófagos e linfócitos, respectivamente.

Hoenig et al. (1991) demonstraram IL-1, em quantidades aumentadas no tecido cístico, quando comparadas com amostras de tecido não inflamado. Nesse trabalho também foi observada maior concentração de IL-1 β que IL-1 α . Os autores acreditam que a IL-1, além de estimular os osteoclastos à reabsorção óssea, através da produção de PGE₂ pelos osteoblastos, induziria os osteoblastos a produzirem collagenase, com ação lítica sobre a matriz óssea, favorecendo o recrutamento de células precursoras de osteoclastos.

Bando *et al.* (1993) estudaram, na camada epitelial da parede cística de 12 espécimes de cistos radiculares, a presença de citocinas inflamatórias e quimiotáticas, bem como a presença de receptores de adesão vascular. Todas as amostras mostraram-se positivas para IL-1 α , IL-1 β e IL-6. Células endoteliais vasculares próximas ao epitélio cístico também demonstraram presença de IL-1 α e IL-6 (6 e 8 amostras, respectivamente). Em apenas duas espécimes foram encontrados o fator de necrose tumoral α (TNF α) e IL-8, em macrófagos adjacentes à camada de células epiteliais. Em todas as lesões houve positividade, tanto na camada epitelial da parede dos cistos, como nos capilares próximos ao epitélio, para os receptores de molécula de adesão endotelial para leucócitos (ELAM-1) e molécula de adesão intercelular (ICAM-1). A síntese desses receptores é regulada por IL-1, TNF e lipopolissacarídeos bacterianos. 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 poderia ser uma terapia benéfica para essas lesões.

Em 1994, Lim *et al.* compararam as concentrações de IL-1 em lesões periradiculares humanas sintomáticas e assintomáticas e observaram alto índice de IL-1 β nos dois tipos de lesões, sem diferenças significativas de

concentração, demonstrando ser a IL-1 β importante na patogênese das lesões.

Os osteoclastos são células envolvidas no processo de reabsorção óssea (Loutit, 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*). Formigli et al. (1995) estudaram, do ponto de vista morfológico e bioquímico, o processo osteolítico em cistos radiculares humanos. Numerosas células multinucleadas positivas para TRAP foram identificadas na extremidade de extensões intra-ósseas da cápsula cística e em direto contato com o tecido ósseo. Lacunas de reabsorção foram vistas na superfície óssea por microscopia eletrônica de varredura. Adicionalmente, células positivas para TRAP foram vistas dentro da cápsula cística. Altos níveis de PGE₂ e IL-6 foram detectadas no fluido cístico. Os autores relacionaram a ativação osteoclástica observada ao redor dos cistos radiculares com os altos níveis de IL-6 e PGE₂, pois esses mediadores são potentes estimuladores da reabsorção óssea e sua presença no fluido cístico pode ser uma consequência de processos inflamatórios e imunológicos ocorridos na capsula cística. Os autores

concluíram que a reabsorção óssea ativa pode contribuir para o crescimento destas lesões nos maxilares.

Estudando a presença de citocinas nos processos periapicais, Takeichi et al. (1996) pesquisaram IL-1, IL-6 e TNF no fluido periapical, obtido via canal radicular. Utilizando a técnica imunoenzimática, os autores observaram altas concentrações de IL-1 α , IL-1 β e IL-6, mas não de TNF α . Polimorfonucleares (PMNs) do fluido, isolados por gradiente de Ficoll-Hypaque, analisados através de reação de polimerase em cadeia (PCR), mostraram positividade para a expressão de RNAm para IL-1 α , IL-1 β e TNF α , mas não para IL-6. Os autores sugerem que a IL-6 (26 kD) do exudato periapical pode ser derivada dos fibroblastos, macrófagos, linfócitos T ou osteoblastos presentes ao redor das lesões periapicais. Sugerem ainda que PMNs derivados do osso alveolar podem produzir IL-1 e TNF α nos processos inflamatórios e estar associados com o início do processo inflamatório e com a reabsorção óssea *in vivo*.

Muitos dos efeitos da IL-1 são mediados através da capacidade em aumentar a produção de outras citocinas como o fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF), fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), TNF α , IL-6, IL-8, e membros homólogos das famílias

de quimiocinas, fatores de crescimento derivados de plaquetas e IL-11. A amplificação de efeitos biológicos pela IL-1 é alcançada por sua habilidade em regular a expressão do próprio receptor IL-1, do receptor de IL-2, IFN- γ , IL-3 e GM-CSF, e, conseqüentemente, a ação sinérgica com algumas destas citocinas (Paul, 1998).

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 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α em macrófagos e em queratinócitos da parede epitelial do cisto radicular. Os autores consideraram que a 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. Consideraram, ainda, que a IL-6 exerceria importante papel na diferenciação de células B em plasmócitos e a IL-8 agiria como fator quimiotático para neutrófilos.

A citocina pró-inflamatória interferon- γ (IFN- γ), com 34 kD é produzida por células NK, células T CD8+ e subclasses Th₁ de células T CD4+ (Paul, 1998). Foi identificada por Kabashima et al. em 1998, em células de granulomas

periapicais, assim como também células produzindo óxido nítrico induzido (iNOs). Os autores discutem que as células produzindo IFN- γ e iNOs⁺ levariam à ativação de macrófagos pela indução de NO (fator relaxante endotelial) modulando o grau de inflamação. O IFN- γ inibiria a reabsorção óssea osteoclástica *in vitro* e o aumento da concentração de NO também inibiria a atividade osteoclástica. Porém, a diminuição da concentração de NO estimularia a reabsorção óssea mediada pela IL-1.

Destes trabalhos, observa-se, claramente, que os estudos têm dirigido atenção para o esclarecimento dos mecanismos patogênicos das lesões periapicais, em especial no processo de crescimento destas lesões associado à reabsorção óssea. Neste sentido, outras citocinas com potencial participação nos processos de reabsorção e remodelação óssea, tais como IL-11, fator estimulante de colônia de macrófago (M-CSF, CSF-1), fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e IL-3, poderiam estar presentes, participando, direta ou indiretamente, nesses mecanismos.

Os fatores estimulantes de colônias (CSF) fazem parte de uma ampla classe de fatores de crescimento e diferenciação de células hematopoéticas. Dentre eles, o M-CSF, sintetizado por macrófagos, células endoteliais e fibroblastos (Abbas et al.,

1995), tem efeito nas células do sistema fagocítico mononuclear estimulando a proliferação de precursores de osteoclastos em conjunto com IL-1 ou IL-3 (Torabinejad, 1994). Suda (1995), a partir de um trabalho realizado com progenitores osteoclásticos, considera que o M-CSF seja o fator solúvel mais importante na proliferação, maturação e sobrevivência dos osteoclastos.

O GM-CSF é uma glicoproteína de 22 kD, sintetizada por linfócitos T ativados, macrófagos e fagócitos mononucleares ativados, células endoteliais vasculares e fibroblastos (Abbas et al., 1995). Em estudos com osteoblastos murinos Horowitz et al. (1989) observaram a liberação de GM-CSF, quando essas células eram estimuladas por lipopolissacarídeos bacterianos. Em 1989 Caracciolo & Rovera testaram a possibilidade de proliferação de linhagens de células leucêmicas humanas dependente de fatores de crescimento associando IL-6 com GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-1 α ou IL-3. Na linhagem "AML-193" a combinação de IL-6 com G-CSF, M-CSF, IL-1 α ou IL-3 não demonstrou proliferação melhor que a conseguida, quando essas citocinas foram adicionadas sozinhas, mas foi observado sinergismo da IL-6 com GM-CSF. Esta citocina pode atuar em conjunto com a IL-6, agindo nos processos de reabsorção óssea em áreas inflamadas.

Matsushita et al. (1998) analisaram a presença de várias citocinas no soro de pacientes com periodontite apical e, chegaram a detectar, em um único paciente portador de várias lesões periapicais, 58 pg/ml de GM-CSF (citocina de difícil detecção no soro). Eles discutem que o GM-CSF poderia estar associado à etiologia da periodontite apical refratária desse paciente submetido a tratamento agressivo.

A IL-3, um monômero de 20 a 26 kD derivado de linfócitos T CD4⁺ (Abbas et al., 1995), estudada por Barton & Mayer (1989), em cultura de células de medula óssea da tíbia e fêmur de camundongos, mostrou causar diferenciação das células precursoras tipo osteoclastos. Assim como o GM-CSF, a IL-3 pode ser produzida por células com perfil Th₁ e Th₂ (Mosmann & Coffman, 1989). Esta citocina tem sido implicada na reabsorção óssea que ocorre em doenças inflamatórias como artrite reumatóide e periodontite (Yoshie et al., 1987; Barton & Mayer, 1989).

Membro da família da IL-6, a IL-11 é uma citocina derivada de células estromais da medula óssea (Neddermann et al., 1996; Liu et al., 1996). Sua ação parece estar associada à estimulação de progenitores hematopoéticos humanos, também, com efeito sinérgico a outros fatores de crescimento hematopoético como CSFs e IL-3 (Einat et al., 1996).

Produzida pelos osteoblastos, podem ter ação pleiotrópica na remodelação óssea, inibindo a atividade osteoblástica ou estimulando o desenvolvimento osteoblástico. (Morris et al., 1996).

O osso não é um tecido estático, mas em contínuo processo de remodelação fisiológica. Um modelo da patogenia do processo osteolítico nas lesões periapicais tem proposto que as citocinas participariam, de um lado, no recrutamento, diferenciação e ativação de osteoclastos; e, de outro, na ação inibitória sobre peptídeos de matriz óssea, associados à indução da neoformação óssea (Stashenko, 1990).

Em resumo, a remodelação óssea é um processo complexo regulado por hormônios sistêmicos e fatores locais. A síntese, a 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. PROPOSIÇÃO

- Identificar e quantificar, comparativamente, a presença das citocinas GM-CSF, IFN γ , IL-3 e IL-6, no líquido e tecido de cistos periapicais de humanos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A determinação e quantificação da presença de citocinas no tecido e líquido de cistos radiculares foi realizada através da técnica imunoenzimática (ELISA). Para tanto, estarão descritos nas linhas seguintes, o número e tipo de amostras utilizadas, critérios de coleta e seleção das mesmas, a padronização do processamento das amostras de tecido, os reagentes necessários para a realização da técnica, bem como, sua seqüência.

Todo procedimento, desde a coleta das amostras até a

obtenção dos resultados do ensaio imunoenzimático, foi realizado de acordo com as medidas de biossegurança em laboratórios (Chaves-Borges & Mineo, 1997).

O projeto de pesquisa foi desenvolvido sob prévia análise e aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa [CONEP (Anexo I)].

4.1. Casuística

Foram utilizados 24 amostras de cistos radiculares, extraídos cirurgicamente, dentre os quais 14 contendo líquido na cavidade cística e 10, sem líquido. 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 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 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 às cirurgias parendodônticas no Hospital Odontológico da Universidade

Federal de Uberlândia, em clínicas particulares de Uberlândia e Itumbiara (GO). Após a remoção cirúrgica, as amostras foram selecionadas com diagnóstico específico de cisto radicular, através do exame anátomo patológico, realizado no Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Uberlândia, segundo os critérios estabelecidos pela OMS (Kramer et al., 1992).

Adicionalmente, foi constituído um grupo de 26 pacientes com indicação de cirurgia para extração de 3º molares hígidos inclusos, para obtenção de um pool de tecidos pulpaes em que a inflamação seria um evento improvável. Estes tecidos foram utilizados como controle negativo das amostras de tecido.

4.2. Coleta das Amostras

A coleta das amostras foi realizada no período de junho de 1997 a junho de 1999. Dentre os 24 cistos radiculares, observou-se uma variação no tamanho das amostras de 0,5 a 4,0cm de diâmetro.

Das lesões, foram coletados o líquido cístico por meio de punção aspirativa e fragmentos teciduais "frescos" da seguinte forma:

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 possível. As amostras nas quais estavam presentes sangue ou secreção purulenta, 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°C , até o momento da realização dos ensaios imunoenzimáticos.
3. Remoção de um ou mais fragmentos de tecido cístico, que foram devidamente acondicionados em tubos do tipo *ependorf* (Biolog, Brasil) e armazenados a -70°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 inclusos 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.

Os elementos dentais utilizados para a extração de tecido pulpar foram frisados na porção cervical sob refrigeração,

com disco de carborundum, imediatamente após a cirurgia, para obtenção de um guia de fratura, e congelados a -70°C . Os dentes previamente armazenados foram mergulhados em nitrogênio líquido e fraturados na região do guia realizado, com auxílio de um cinzel e martelo cirúrgicos. Os tecidos pulparem foram colhidos com cureta odontológica, e recortados em conjunto formando um pool. Foram, em seguida, aliquotados em vials com 0,06g de tecido cada. As alíquotas foram congeladas a -70°C e processadas no momento do ensaio.

Todas as amostras foram devidamente etiquetadas e identificadas para melhor controle dos dados (Anexo IV).

4.3. Padronização do Processamento das amostras

Para a quantificação de citocinas no tecido cístico pelo ELISA, houve a necessidade de transformar o mesmo em um homogeneizado líquido, permitindo o uso da técnica escolhida. Nesse intuito, foram utilizadas amostras de granulomas para serem submetidas a diferentes métodos de processamento, com o objetivo de avaliar a obtenção do homogeneizado e a ocorrência de perdas possíveis protéicas no decorrer do processamento. Cada método de processamento foi realizado com um pool de 6 granulomas.

A metodologia empregada seguiu parâmetros previamente descritos (Hoenig et al., 1991; Stashenko et al., 1991; Meghji, et al., 1996; Gemmell & Seymour, 1998; Enriquez & Riggs, 1998), com algumas modificações, objetivando-se verificar possíveis interferências na detecção do antígeno pesquisado. Foram testadas as seguintes variáveis do processamento: maceração do tecido em solução salina, dissolução do tecido em diferentes combinações com soluções de digestão, uso de detergente, inibidores de proteases, incubações com alternância de temperatura e sequência de ciclos de sonicação. Essas variáveis estão detalhadas nos seguintes procedimentos:

A. Fragmentos de granuloma foram recortados com bisturi (Becton Dickinson, USA), posteriormente pesados e diluídos na proporção 1:10 (0,1g de tecido em 1ml de diluente) em solução salina tamponada com fosfato 0,01M, pH 7,2 (PBS) e albumina de soro bovino (BSA - Sigma Chemical Co., USA) a 10%, contendo ou não inibidores de proteases [50 µg/ml de Leupeptina, 1,6mM de PMSF (fluoreto fenil-metil-sulfonil) e 10µg/ml de Aprotinina - Sigma Chemical Co, USA]. Interferon-gama humana recombinante (rhIFN-γ - R&D Systems, USA) foi adicionado nas amostras (1,25ng/ml) para verificação dos níveis de recuperação da citocina durante

o processamento. As amostras foram maceradas, nos respectivos recipientes com auxílio de instrumento de metal cromado adaptado com extremidade ajustada ao fundo do tubo de armazenamento, com imersão prévia em nitrogênio líquido. Foram realizados, então, três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido (-196°C) e descongelamento em banho-maria (37°C), para lise de membranas celulares e liberação do conteúdo citoplasmático. Daí, seguiram-se 6 ciclos de sonicação, por 30 segundos cada, em recipiente com gelo, seguidos de observações microscópica, para avaliação do grau de integridade celular encontrado. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 2000g, por 10 minutos, a 4°C , para separação dos sobrenadantes que foram coletados e armazenados a 4°C , em tempo não superior a 24 horas, até a realização dos ensaios.

B. Neste procedimento, os fragmentos de granulomas foram recortados como no procedimento A, diluídos em um meio designado neste trabalho como "meio básico", contendo 10mM de tampão HEPES (sal sódico - ácido N-[hidroxietil] piperazino-N'-[2-etanosulfônico]) em meio RPMI (com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio) 1640 (Gibco BRL, USA) com 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina (Gibco BRL, USA) e BSA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Foram adicionados 2ng/mL de rhGM-CSF, 5ng/mL

de rhIFN- γ , e 1,2ng/mL de rhIL-6 (R&D Systems, USA), 500U/ml de Colagenase D (Boehringer Mannheim, Germany) e detergente Zwittergent (100 μ g/ml - Calbiochem, USA), segundo esquema demonstrado na Tabela 1. A incubação dos fragmentos foi realizada com agitação durante 90 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados inibidores de proteases (50 μ g/ml de Leupeptina, 1,6mM de PMSF e 10 μ g/ml de Aprotinina), mantendo-se sempre a proporção de 0,1g de tecido para cada 1ml de diluente (1:10). Após homogeneização com pipeta Pasteur, foi realizado um ciclo de sonicação de 30 segundos, em banho de gelo, seguido pela observação da viabilidade celular ao microscópio óptico. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 2000g por 10 minutos, a 4°C, com subsequente coleta do sobrenadante e armazenamento a 4°C até a realização dos ensaios.

Tabela 1. Esquema do processamento das amostras de granulomas, de acordo com o procedimento do item B.

<i>Tecido</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>Meio básico (μl)</i>	<i>GM-CSF (μl)</i>	<i>IFN-γ (μl)</i>	<i>IL-6 (μl)</i>	<i>Colagenase (μl)</i>	<i>Detergente (μl)</i>	<i>Inibidores de Proteases (μl)*</i>
1	0,05	300	50	50	50	50	-	50
2	0,05	300	50	50	50	-	50	50
3	0,05	250	50	50	50	50	50	50
4	0,05	300	50	50	50	50	-	-
5	0,05	300	50	50	50	-	50	-
6	0,05	250	50	50	50	50	50	-

●.....● Incubação durante 90 minutos a 37°C, sob agitação.

* Antes de acrescentar os inibidores de proteases nas amostras 1, 2 e 3, foram retirados 50μl do homogenizado para manter a diluição na proporção de 1:10.

C. Fragmentos de granulomas foram processados como no procedimento B, dividindo-se o processamento em duas etapas, conforme demonstrado na Tabela 2: Etapa I, sem a presença do detergente, usando ou não a colagenase, acrescido de meio básico e de citocinas incluindo a rhIL-3 (4ng/mL - R&D Systems, USA) durante 45 minutos a 37°C, sob agitação. Após homogeneização com pipeta Pasteur, as amostras foram submetidas à centrifugação a 10000g por 5 minutos, a 4°C, com subsequente coleta do sobrenadante e acondicionamento em gelo para posterior dosagem das citocinas; a Etapa II, foi realizada no precipitado resultante da primeira fase, acrescentando-se o meio básico, as citocinas, o detergente Zwittergent (100μg/ml) e os inibidores de proteases, mantendo-se sempre a

proporção inicial (1:10) da amostra. Após constante agitação de 45 minutos a 37°C, o processamento foi concluído como no item B.

Tabela 2. Esquema do processamento das amostras de acordo com o procedimento do item C.

	<i>Tecido</i>	<i>Peso</i> (g)	<i>Meio</i> <i>básico</i> (μ l)	<i>GM-CSF</i> (μ l)	<i>IFN-γ</i> (μ l)	<i>IL-3</i> (μ l)	<i>IL-6</i> (μ l)	<i>Colagenase</i> (μ l)	<i>Detergente</i> (μ l)	<i>Inibidores</i> <i>de proteases</i> (μ l)
Etapa I	1	0,05	300	50	50	50	50	-	-	-
	2	0,05	250	50	50	50	50	50	-	-
Etapa II	1	0,05	200	50	50	50	50	-	50	50
	2	0,05	200	50	50	50	50	-	50	50

4.4. Processamento de tecidos císticos e controles

O processamento dos tecidos císticos foi realizado de acordo com os resultados obtidos nos testes de padronização do processamento de tecidos realizados nos granulomas. Após o descongelamento das amostras, os tecidos císticos foram recortados com auxílio de um bisturi, dividindo cada amostra cística em duas alíquotas com 0,06g cada, em tubos tipo eppendorf, sendo a primeira alíquota origem de duas, conforme esquema demonstrado na Figura 2:

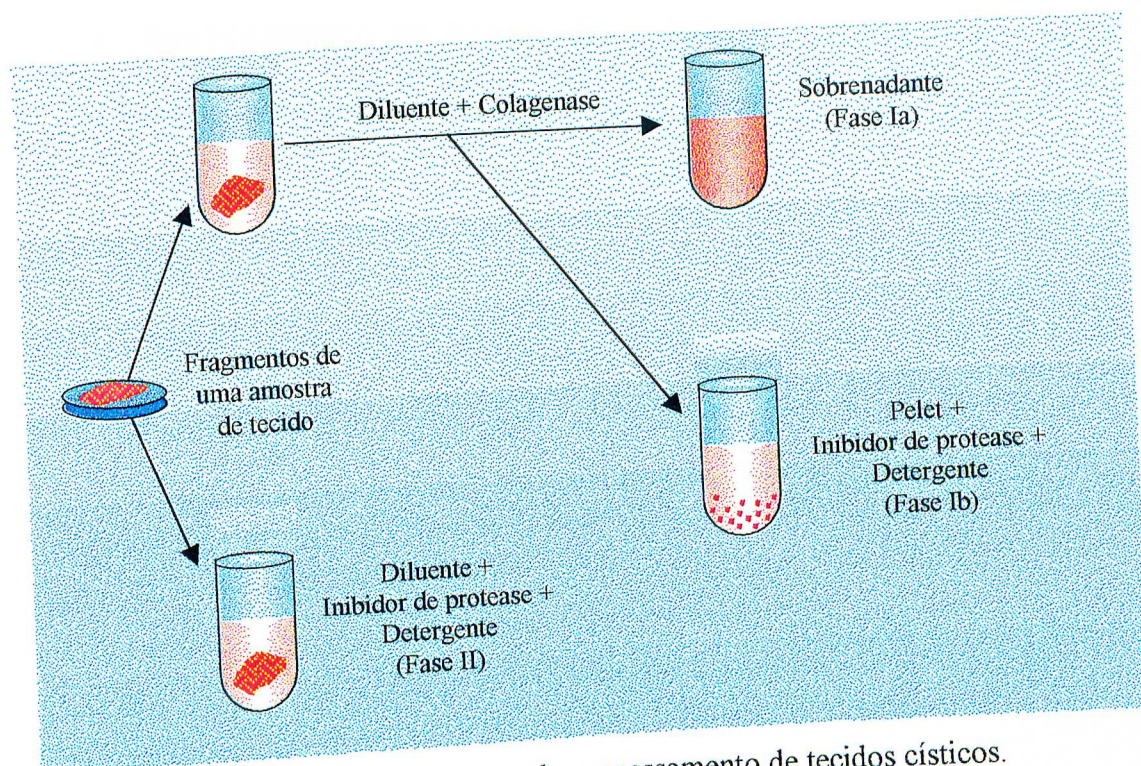


Figura 2. Esquema das fases do processamento de tecidos císticos.

Para cada alíquota foram realizadas diferentes fases de processamento, como descrito:

Alíquota nº 1:

Fase I: Subdividida em duas fases: Ia e Ib

Fase Ia

- Adição de meio básico consistindo de 10mM de tampão HEPES em meio RPMI 1640 com gentamicina (40µg/ml) e BSA (100µg/ml), na proporção de 1ml para cada 0,1g de tecido cístico (1:10);
- Adição de Colagenase D (400U/ml);
- Incubação de 45 minutos a 37°C sob agitação constante;

- Resfriamento em banho de gelo;
- Homogeneização com pipeta *Pasteur*;
- Centrifugação das amostras a 10000g por 5 minutos a 4°C;
- Coleta do sobrenadante e acondicionamento em banho de gelo até a dosagem de citocinas (amostra da "Fase Ia").

Fase Ib

- Adição de meio básico, detergente *Zwittergent* (100µg/ml) e inibidores de proteases ao sedimento originado da alíquota 1;
- Incubação de 45 minutos a 37°C sob agitação constante;
- Resfriamento em banho de gelo;
- Realização de 1 ciclo de 30 segundos de sonicação, utilizando um sonotrodo (ponta catenoidal) adaptado (Anexo IV) ao aparelho de ultra-som (*desruptor de células - Thorton, Brasil*);
- Centrifugação das amostras a 2000g por 10 minutos a 4°C;
- Coleta do sobrenadante e acondicionamento em banho de gelo até a análise de citocinas (amostra da "Fase Ib").

Alíquota nº 2:**Fase II**

- Adição do meio básico, detergente *Zwittergent* (100µg/ml) e inibidores de proteases, mantendo sempre a proporção 1:10 (1ml dessa mistura para cada 0,1g de tecido);
- Incubação de 90 minutos a 37°C sob agitação constante;
- Resfriamento em banho de gelo;
- Realização de 1 ciclo de 30 segundos de sonicação, como anteriormente descrito;
- Centrifugação das amostras a 2000g por 10 minutos a 4°C;
- Coleta do sobrenadante (amostra da "Fase II") e acondicionamento em banho de gelo até a análise de citocinas.

Além das amostras dos cistos, foram testadas paralelamente, amostras de granulomas, processadas da mesma forma que os cistos, onde foram acrescentadas concentrações conhecidas de *rhGM-CSF*, *rhIFN-γ*, *rhIL-3* e *rhIL-6* e então consideradas como controles positivos, para avaliar cada fase do processamento bem em relação à perda protéica.

O processamento dos tecidos pulparez utilizados como controle negativo foi similar ao das amostras císticas. A Tabela 3 demonstra o esquema de diluição das amostras de tecido cístico e dos controles positivos e negativos.

Tabela 3. Esquema de diluição das amostras de tecido cístico, controles negativos e positivos.

Tecido	Meio		Colagenase	Citocinas* (μ l)	Aliquota (μ l)	Origem	Meio		Detergente (μ l)	Inibidores de Proteases (μ l)	Citocinas* (μ l)
	Aliquota (g)	Peso (g)					básico (μ l)	básico (μ l)			
X	X I	0,06	540	60		X Ia Sobrenadante					
						X Ib Sedimento		480	60	60	
	X II	0,06						480	60	60	
Controle negativo	C- I	0,06	540	60		C- Ia Sobrenadante					
						C- Ib Sedimento		480	60	60	
	C- II	0,06						480	60	60	
Controle positivo	C+ I	0,06	300	60	240	C+ Ia Sobrenadante					
						C+ Ib Sedimento		240	60	60	240
	C+ II	0,06						240	60	60	240

●.....● Incubação durante 45 minutos a 37°C, sob agitação, ●.....● Incubação durante 90 minutos a 37°C, sob agitação. A amostra X dá origem às alíquotas X I e X II. A alíquota X I origina X Ia e X Ib. Esse processo se repete para todas as amostras, inclusive para os tecidos controles negativo (C-) e positivo (C+). * volume total de citocinas recombinantes acrescentadas (60 μ l de cada citocina *rhGM-CSF*, *rhIFN- γ* , *rhIL-3* e *rhIL-6*).

4.5. Líquido cístico

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

4.6. Ensaio imunoenzimático (ELISA) padrão para detecção das citocinas GM-CSF, IFN- γ , IL-3 e IL-6 em tecido e líquido cístico

As amostras de tecido e líquido císticos bem como os controles foram analisadas para detecção das citocinas GM-CSF, IFN- γ , IL-3 e IL-6 por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*) tipo sandwich. O ELISA tem como princípio a formação do complexo antígeno-anticorpo (Ag-Ac). Num primeiro momento, ocorre a interação entre um anticorpo específico (anticorpo de captura), adicionado a uma placa de 96 poços, com um antígeno contido na amostra testada. Em uma segunda etapa, ocorre a identificação do complexo Ag-Ac, através de um anticorpo específico ao antígeno pesquisado, conjugado a uma enzima (anticorpo de detecção). Em seguida, adiciona-se o substrato com uma solução cromógena para a visualização dos resultados. O grau de reatividade do ensaio é analisado pela intensidade

da coloração e determinado através dos valores da absorbância em leitor de ELISA para microplacas (Figura 3).

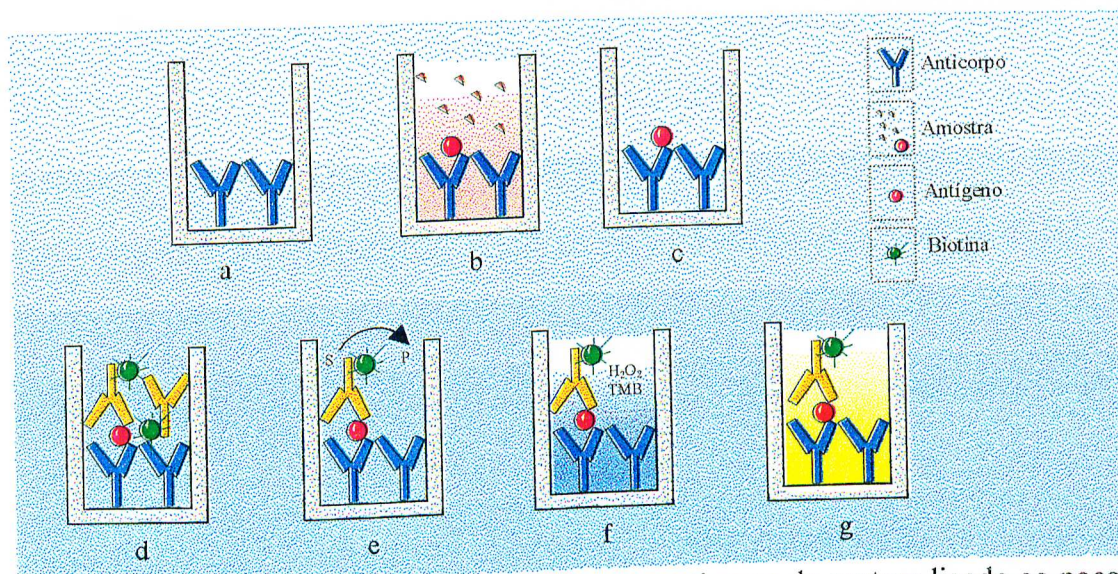


Figura 3. Esquema do ensaio imunoenzimático. a: anticorpo de captura ligado ao poço da placa, b: adição da amostra, c: processo de lavagem, permanecendo o anticorpo ligado ao antígeno pesquisado d: adição do anticorpo de detecção (secundário biotinizado), e: adição do conjugado estreptavidina (S)-peroxidase (P), f: revelação da reação realizada pela adição do substrato enzimático (TMB) e H_2O_2 , g: adição do ácido H_2SO_4 parando a reação (adaptado de Aragão & Ribeiro, 1998).

Neste experimento, os testes foram realizados segundo protocolos recomendados pelo fabricante dos anticorpos (R&D Systems, USA), com algumas modificações. Microplacas de poliestireno de alta avidez (Corning Laboratories Inc., USA), foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura: anticorpo policlonal anti-GM-CSF (AF-215-NA - $2\mu\text{g/ml}$); anticorpo monoclonal (mAb) anti-IFN- γ (MAB285 - $4\mu\text{g/ml}$); mAb anti-IL-3 (MAB203 - $8\mu\text{g/ml}$) e mAb anti-IL-6

(MAB206 - 8µg/ml) diluídos em PBS. As placas foram incubadas por 18 horas, a temperatura ambiente, em câmara úmida.

Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes em PBS com adição de Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e, subsequente, bloqueadas com solução de PBS adicionada de BSA a 1%, por 1 hora, em temperatura ambiente. Novamente, as placas foram submetidas a três ciclos de lavagens com PBS-T e seguiu-se a adição das amostras, em duplicata, não diluídas para IFN-γ e IL-3 e não diluídas e diluídas a 1:5 para GM-CSF e IL-6. Paralelamente, foram realizadas curvas padrões, em duplicata, utilizando-se para cada citocina pesquisada, a respectiva citocina humana recombinante, em diluições duplas seriadas em PBS-T + BSA 1% para o ensaio destinado às amostras de líquido cístico, ou em meio básico (10mM tampão HEPES em meio RPMI 1640 com gentamicina (40µg/ml) e 100µg/ml de BSA), para as amostras de tecidos císticos. A concentração inicial de cada curva foi de 8ng/ml para GM-CSF e IL-3, 10ng/ml para IFN-γ e 2,4ng/ml para IL-6. Após incubação por 18 horas, em câmara úmida, a 4°C, as placas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-T, seguindo-se a adição dos anticorpos policlonais secundários biotinilados (produzidos em cabra) anti-GM-CSF, anti-IFN-γ, anti-IL-3 e anti-IL-6 humanas, nas concentrações de 800, 200, 2000 e 200ng/ml em PBS-T + BSA 0,1%,

respectivamente. As microplacas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente, em câmara úmida. Procedeu-se a novas lavagens como anteriormente descrito e adicionou-se o conjugado estreptavidina-peroxidase (*Sigma Chemical Co., USA*) na diluição de 1:1000 em PBS-T + BSA 0,1% por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a última lavagem das placas com PBS-T por 3 vezes, adicionou-se o substrato enzimático consistindo de tetrametilbenzidina-TMB (*Sigma Chemical Co., USA*) em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 4,5 e 0,006% de H_2O_2 . A reação foi interrompida pela adição de H_2SO_4 2N. A leitura foi realizada em leitor de microplacas ELISA (*Titertek Multiskan Plus MK II - Flow Laboratories, USA*) com filtros de 450nm e 570nm, subtraindo-se o valor da absorbância obtido com o filtro de 450nm daquele obtido com o filtro de 570nm, para corrigir as imperfeições ópticas da placa. Em todas as reações realizadas para os tecidos císticos foram inclusas amostras de granuloma onde foram adicionadas concentrações conhecidas das citocinas pesquisadas, servindo como controle positivo e a amostra de tecido pulpar como controles negativo. Para os ensaios com líquido cístico, o próprio diluente da reação serviu como controle negativo. Além dos controles positivo e negativo para garantir a especificidade de cada teste, foi calculado o coeficiente de variação inter e intra-ensaio, para avaliar a reprodutibilidade dos mesmos. Um esquema detalhado da reação está representado no Anexo V.

4.7. Expressão dos resultados

Os níveis de reatividade das citocinas foram expressos como uma relação entre a concentração protéica e o peso do fragmento estudado. Sabendo-se que cada 0,1 grama de tecido foi convertido em 1ml de sobrenadante, os valores de absorbância obtidos foram convertidos em pg/ml, representando uma concentração relacionada à cada 0,1g de tecido. Os valores da absorbância de cada teste foram convertidos a partir dos valores de absorbância das respectivas curvas padrões, utilizando-se o software *Microplate Manager 4.0* (Bio-Rad Laboratories, Inc.). O limiar de reatividade (*cut off*) das reações de ELISA foi determinado pelo limite de detecção de cada citocina em cada teste.

Calculou-se um fator de correção da concentração encontrada para cada citocina, a partir das amostras controle positivo, para avaliar cada fase do processamento, em relação à perda protéica. No entanto, este fator não foi aplicado nos resultados finais de concentração de citocinas obtidas nas amostras de tecidos císticos, uma vez que tal fator pode ser correlacionado, somente, à citocina exogenamente acrescentada nas amostras controle positivo, refletindo a influência dos diferentes procedimentos somente sobre a proteína exógena.

4.8. Análise Estatística

Para analisar a reprodutibilidade dos testes foram calculados os coeficientes de variação inter e intra-ensaio, considerando, como bons, os coeficientes menores que 20%, de acordo com o fabricante dos anticorpos. Os cálculos foram realizados utilizando-se o software *GraphPad Prism*.

Para comparar as porcentagens positivas entre os diferentes processamentos de tecido, através do teste de hipóteses para diferenças entre proporções (Teste Z), considerando significativos todos resultados com $p < 0,05$, foi utilizado o *Software Bio Statistic for Windows*.

O grau de concordância dos resultados de reatividade entre as citocinas encontradas no tecido e líquido cístico e a correlação dos níveis encontrados entre elas foram calculados, respectivamente, pelos testes de correlação de Spearman e Pearson pelo programa *Microsoft Excel*. O intervalo de confiança determinado foi de 0,7 a 1,0 ou -0,7 a -0,1 com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas

O limite de detecção encontrado para cada citocina variou de 62,5 a 125pg/ml para GM-CSF; de 9,8 a 39,1pg/ml para IFN- γ ; de 250 a 500pg/ml para IL-3 e de 9,4 a 18,8pg/ml para IL-6. As variações das curvas padrões obtidas com as citocinas humanas recombinantes GM-CSF, IFN- γ , IL-3 e IL-6 foram analisadas intra- e inter-ensaios. Os coeficientes de

variação intra-ensaio foram: 7,8 para GM-CSF; 9,3 para IFN- γ ; 6,2 para IL-3 e 9,4 para IL-6. Os coeficientes de variação inter-ensaio foram: 18,9 para GM-CSF; 13,9 para IFN- γ ; 13,6 para IL-3 e 15,8 para IL-6. A representação das curvas de cada ensaio para cada citocina estão demonstradas na Figura 4 e a média entre as curvas e os desvios padrões respectivos a cada concentração de citocinas estão representados na Figura 5.

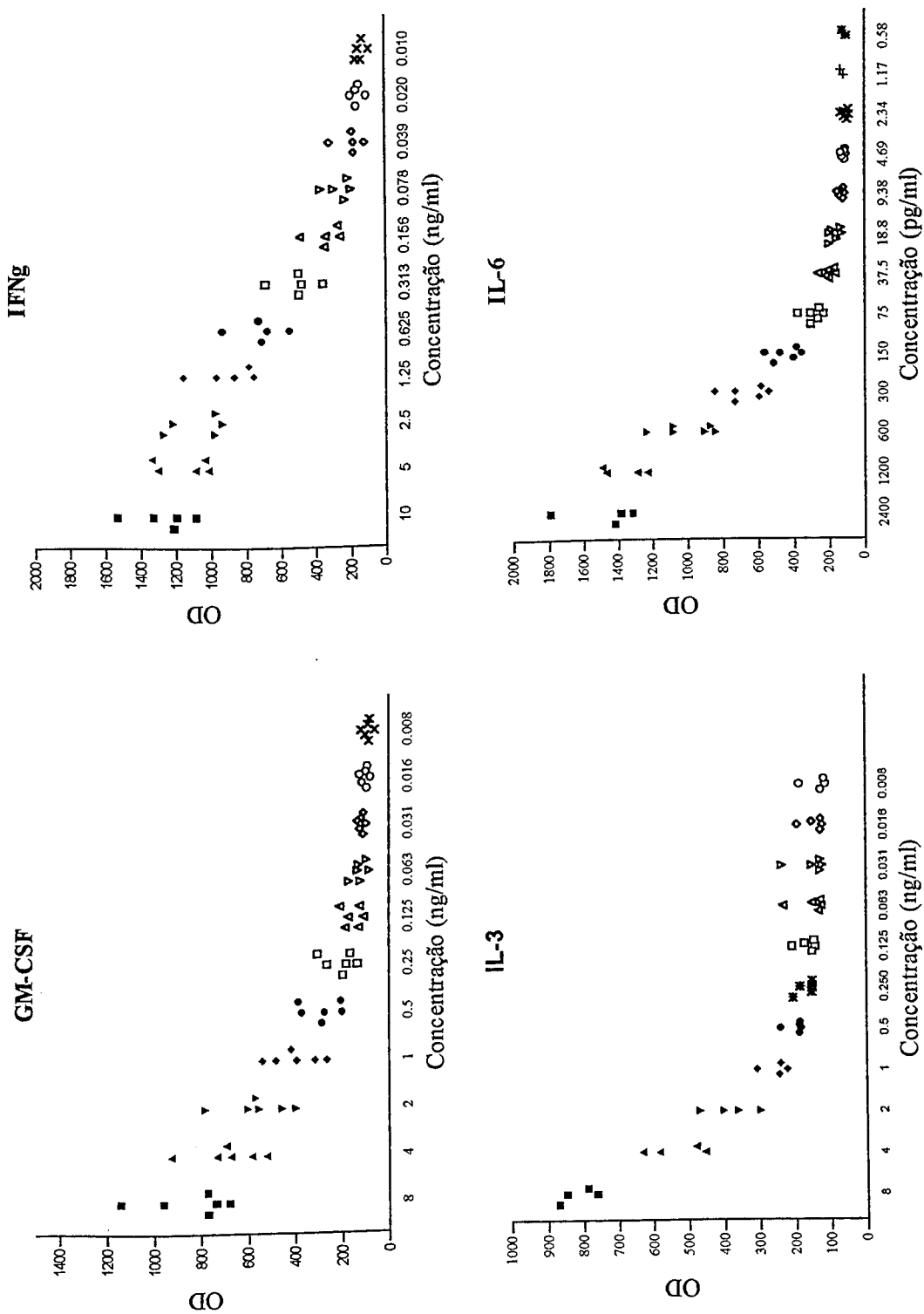


Figura 4. Curvas padrão das citocinas GM-CSF, IFN- γ , IL-3 e IL-6 obtidas por ELISA. Os dados representam os valores da concentração de citocinas a partir da densidade óptica (OD), em 5 experimentos independentes.

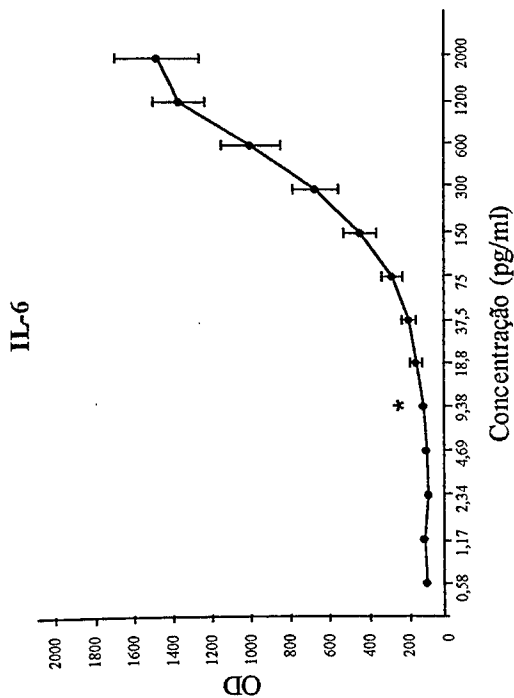
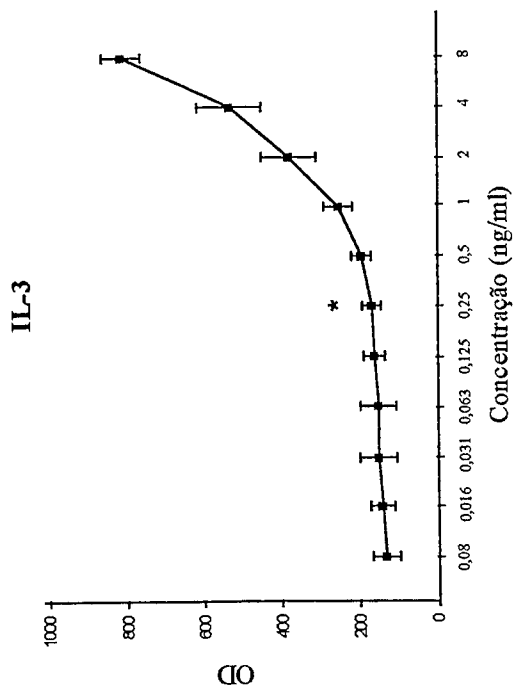
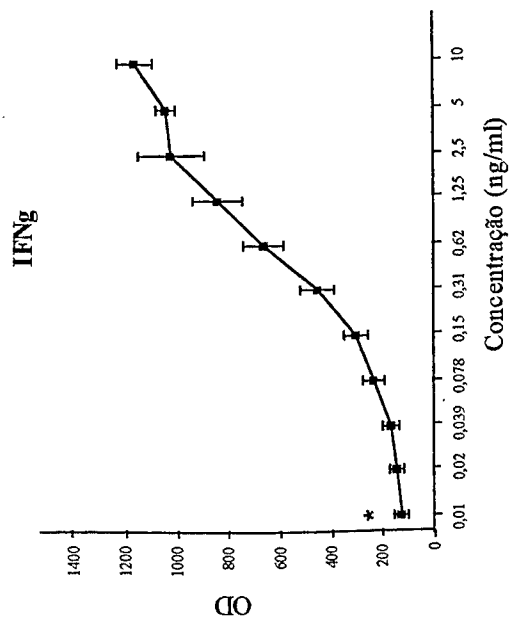
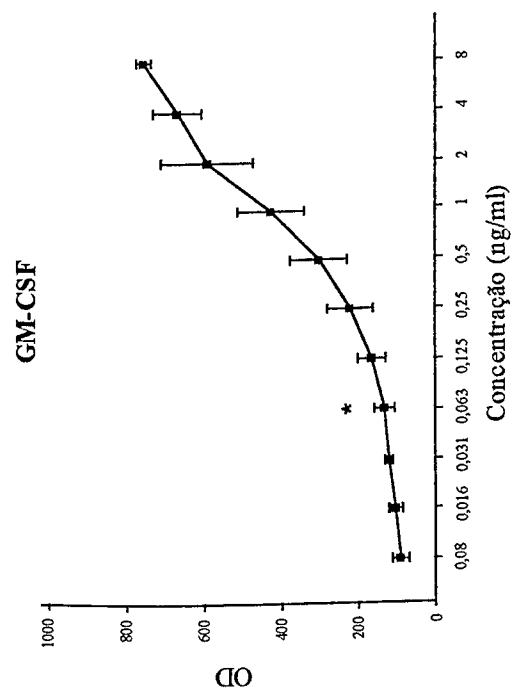


Figura 5. Média das curvas padrão das citocinas GM-CSF (A), IFN- γ (B), IL-3 (C) e IL-6 (D) obtidas por ELISA. Os dados representam a média e os desvios padrões de cada concentração de citocina obtidos em 5 experimentos independentes. * representa o menor limite de detecção dentre os 5 experimentos.

5.2. Padronização do processamento das amostras de granulomas

O procedimento "A", em que foi utilizado o PBS-BSA a 10% como diluente das amostras de granulomas, na proporção de 1:10, contendo rhIFN- γ e acrescentando ou não inibidores de proteases, demonstrou uma perda protéica de 86,0% nas amostras sem inibidores e de 81,4% nas amostras com inibidores de proteases (Tabela 4), quando comparada à concentração de citocina adicionada (exógena). Além dessa perda, observou-se a perda tecidual durante a maceração do tecido. Após a sonicação, a observação ao microscópio óptico demonstrou ausência de células íntegras.

Tabela 4. Níveis de rhIFN- γ (ng/ml) e porcentagem da perda protéica durante o processamento de amostras de granulomas humanos, de acordo com a presença ou não dos inibidores de proteases.

Amostras	RhIFN- γ adicionada (ng/ml)	RhIFN- γ detectada (ng/ml)	Perda protéica (%)
Com inibidores	1,25	0,233	81,4
Sem inibidores	1,25	0,175	86

O procedimento "B", no qual foi utilizado meio básico acrescido ou não de collagenase e/ou detergente, resultou em perdas protéicas discriminadas na tabela 5. A digestão do tecido no meio com collagenase ou com collagenase e detergente

demonstrou ser operacional e visualmente mais prática e eficiente que a maceração. No entanto, pôde-se observar que a presença da collagenase foi prejudicial para todas as citocinas analisadas, apesar de digerir melhor os fragmentos teciduais. O uso de detergente isoladamente não mostrou uma boa digestão dos fragmentos, porém, foi bom para a detecção de GM-CSF e IL-6 acrescentados. A observação ao microscópio óptico, após um único ciclo de sonicação, demonstrou a ausência de células viáveis.

Tabela 5. Níveis de citocinas (ng/ml) e porcentagem da perda protéica durante o processamento de amostras de granulomas humanos, de acordo com a presença ou não de collagenase, detergente e inibidores de proteases.

Tecido	IP	Citocinas*					
		GM-CSF		IFN- γ		IL-6	
		Níveis (ng/ml)	Perda Protéica (%)	Níveis (ng/ml)	Perda Protéica (%)	Níveis (ng/ml)	Perda Protéica (%)
Col.	+	0,058	97,1	0	100	0,003	99,7
	-	0,062	96,9	0	100	0	100
Det.	+	2,704	0	0	100	0,942	21,5
	-	2,340	0	0	100	0,977	18,6
Col. e Det.	+	0,053	97,3	0	100	0,004	99,7
	-	0,068	96,6	0	100	0,003	99,7

* Quantidade de citocina adicionada: *rh*GM-CSF (2ng/ml); *rh*IFN- γ (5ng/ml); *rh*IL-6 (1,2ng/ml); Col = com collagenase; Det = com detergente; IP = Inibidores de Proteases; + = presença de IP; - = ausência de IP.

No procedimento "C", cujo processamento foi dividido em duas etapas, foram obtidos os níveis de citocinas demonstrados na Tabela 6. Esses resultados demonstraram que, durante a "Etapa I", ao usar a collagenase, houve perda protéica de 92,7% para rhGM-CSF, 100% para rhIFN- γ , 88,0% para rhIL-3 e 90,8% para rhIL-6. Nas amostras em que não foi adicionada a collagenase, houve perda protéica de 48,1% para rhGM-CSF, 100% para rhIFN- γ , 28% para rhIL-3 e 0% para rhIL-6. Na "Etapa II", quando houve a adição do detergente e inibidores de proteases no sedimento resultante da etapa I, ocorreu perda protéica para rhIFN- γ de 85,6% na amostra tratada com collagenase na primeira etapa e de 80,8% naquela sem collagenase, mostrando-se altamente sensível ao processamento. Para as demais citocinas não houve uma perda protéica considerável na etapa II. Esses resultados revelaram grande interferência da collagenase para todas as citocinas analisadas e importante ação dos detergente e inibidores de proteases. A Figura 6 representa os níveis de citocinas detectados em relação à concentração de citocina adicionada no início do processamento.

Tabela 6. Níveis de citocinas (ng/ml) e porcentagem da perda protéica em amostras de granulomas humanos sujeitas ao processamento com ou sem collagenase acrescido posteriormente de detergente e inibidores de proteases.

Etapa		Citocinas*							
		GM-CSF		IFN- γ		IL-3		IL-6	
		Níveis (ng/ml)	Perda Protéica (%)	Níveis (ng/ml)	Perda Protéica (%)	Níveis (ng/ml)	Perda Protéica (%)	Níveis (ng/ml)	Perda Protéica (%)
Col -	I	2,08	0	ND	100	2,88	28	1,74	0
	II	2,69	0	0,96	80,8	3,93	1,75	NA	0
Col +	I	0,29	85,5	ND	100	0,48	88	0,11	90,8
	II	2,29	0	0,72	85,6	5,01	0	1,52	0

Etapa I = amostras com ou sem collagenase, sem detergente e inibidores de proteases; Col - = amostra sem collagenase, Col + = amostra com collagenase; Etapa II = Sedimento da etapa I com detergente e inibidores de proteases. ND = Nível não detectado; NA = Nível acima do maior valor da curva padrão; * Quantidade de citocina adicionada: rhGM-CSF (2ng/ml); rhIFN- γ (5ng/ml); rhIL-3 (4ng/ml); rhIL-6 (1,2ng/ml).

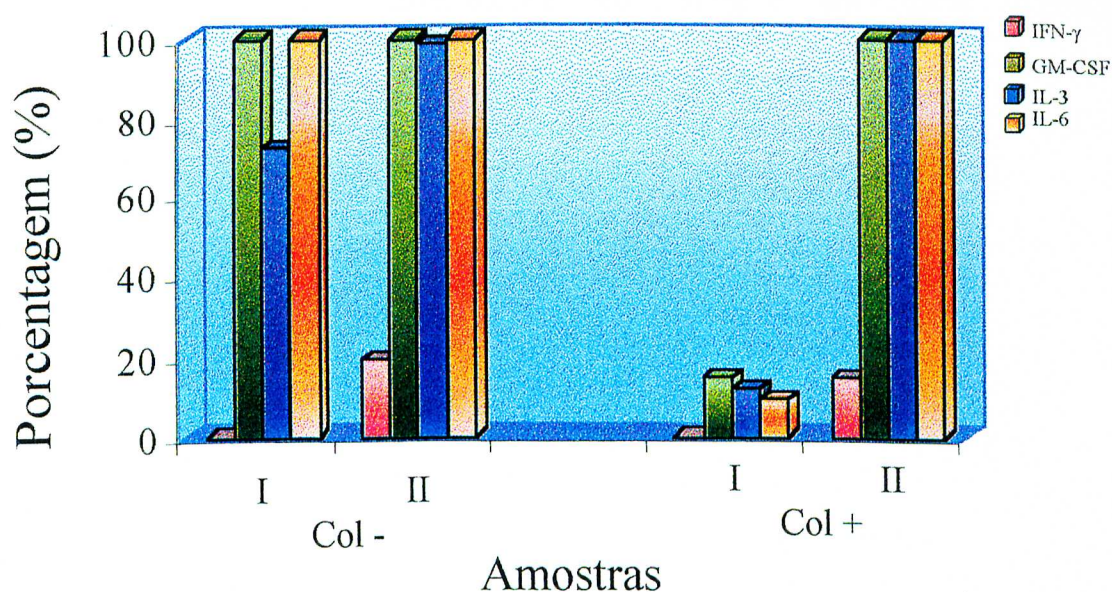


Figura 6. Porcentagem de reatividade em relação à concentração de recombinante acrescentada, nas amostras de granulomas, submetidas a duas etapas de processamento. Na Etapa I (I) sem (Col -) ou com (Col +) collagenase e, na Etapa II, realizada no sedimento da Etapa I (Col - ou Col +), usando detergente e inibidores de proteases (II).

5.3. Tecido cístico

Foram analisadas 24 amostras de tecido de cistos radiculares, dos quais 20 foram testados para a detecção de IFN- γ , 21 para IL-3, 24 para GM-CSF e 22 para IL-6, de acordo com o processamento da "Fase II". Essa variação ocorreu devido à diferença no tamanho das lesões, não tendo, algumas, o peso suficiente para serem analisadas por todos os testes. Assim, para rhIFN- γ e rhIL-3 só foram testadas as amostras submetidas ao processamento da fase II. Nesta fase, os níveis variaram de 68 a 496,3pg/ml para GM-CSF, de 53 a 71pg/ml para IFN- γ , de 277 a 713pg/ml para IL-3 e de 17 a 835pg/ml para IL-6. A figura 7 demonstra os níveis de cada citocina detectados nas Fases Ia, Ib e II em cada amostra.

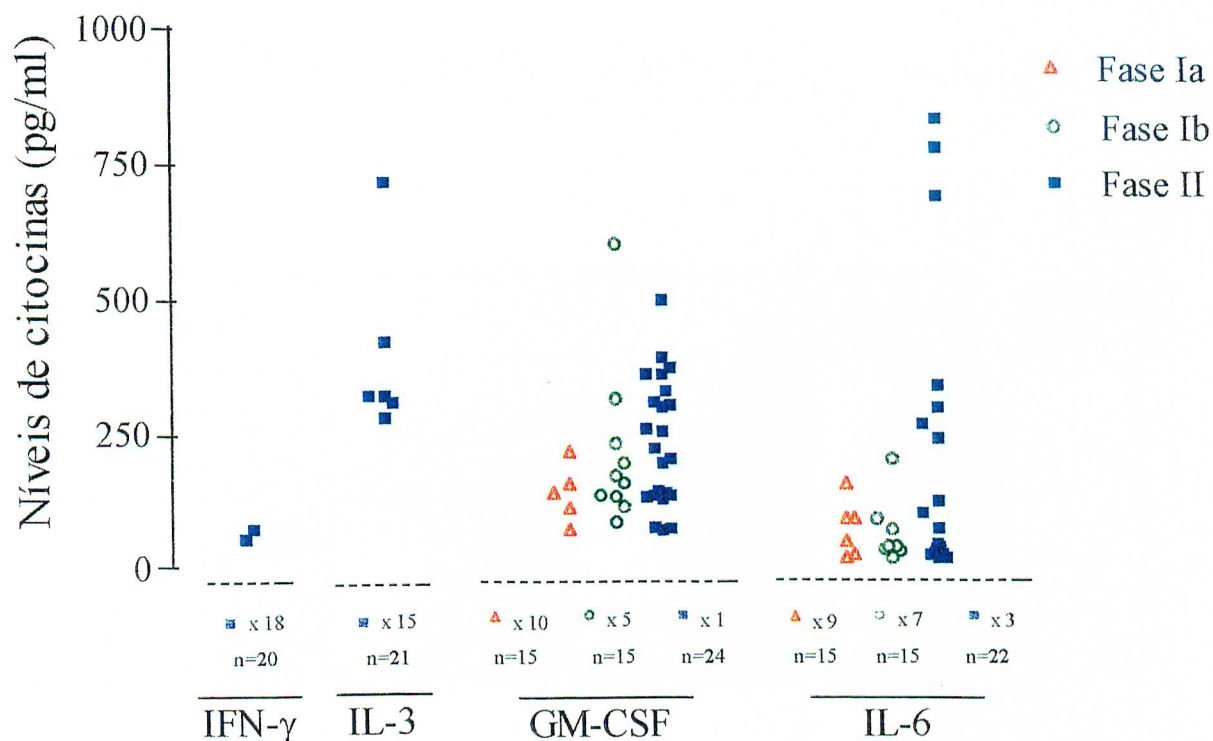


Figura 7. Níveis de IFN- γ , IL-3, GM-CSF e IL-6 detectados em cistos radiculares humanos submetidos às Fases Ia, Ib e II. Os valores mostrados abaixo da linha tracejada representam o número de amostras cujos níveis de citocinas não alcançaram o limite de detecção do ELISA correspondente.

Ao comparar os resultados obtidos nas Fases Ia, Ib e II do processamento das amostras testadas para GM-CSF e IL-6, foi observada maior quantidade de amostras reativas e com altos níveis de citocinas na Fase II do processamento ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente, entre as Fases Ib e II). Os resultados obtidos entre as Fases Ia e Ib não demonstraram diferenças significativas para nenhuma das citocinas. Na Figura 8, está representado o percentual de reatividade de 15 amostras analisadas nas Fases Ia e Ib para GM-CSF e IL-6, de

24 amostras analisadas na Fase II para GM-CSF e de 22 amostras analisadas na Fase II para IL-6.

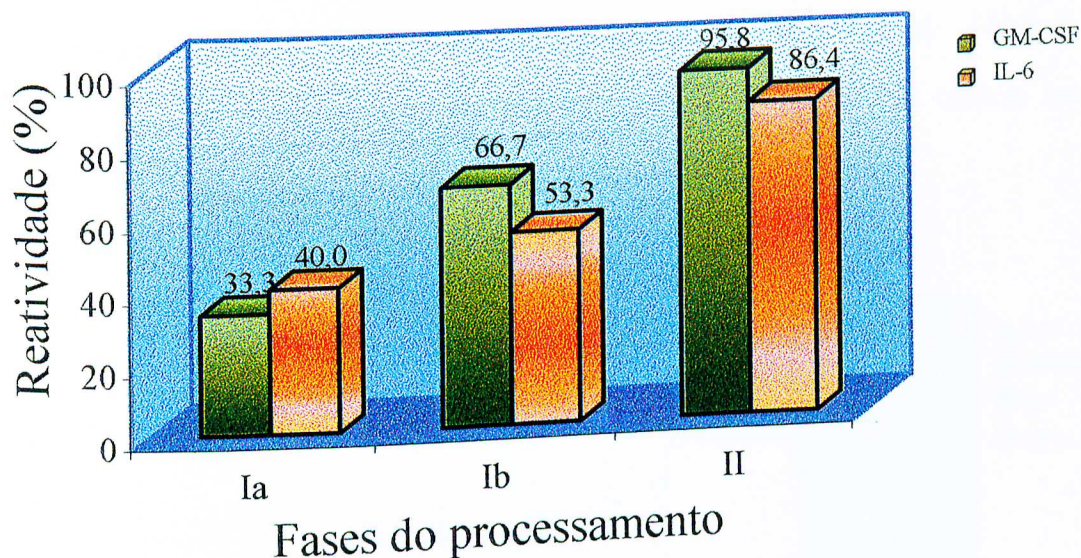


Figura 8. Porcentagem de reatividade das amostras de tecidos de cistos radiculares testadas para GM-CSF e IL-6 em suas diferentes fases de processamento: Ia (sobrenadante da Fase I com uso de collagenase), Ib (sedimento da Fase I com detergente e inibidores de proteases) e II (Fase II sem uso de collagenase, com detergente e inibidores de proteases).

5.4. Amostras controles

Em relação às amostras controle positivo testadas, pôde-se observar em todos os ensaios realizados na fase II do processamento uma perda protéica, em média, de 32% para GM-CSF e IL-3, de 92% para IFN- γ e nenhuma perda para IL-6. Essa perda representou um fator de correção de 1,6 para GM-CSF e IL-3, 16,1 para IFN- γ e 1 para IL-6 (Figura 9). A perda

protéica observada para a *rhIFN- γ* foi a mais crítica entre todas as citocinas.

Nas amostras de tecido pulpar consideradas como controle negativo, não foram detectadas as citocinas *IFN- γ* , *IL-3* e *IL-6*. Porém, níveis de *GM-CSF* foram detectados em todos os

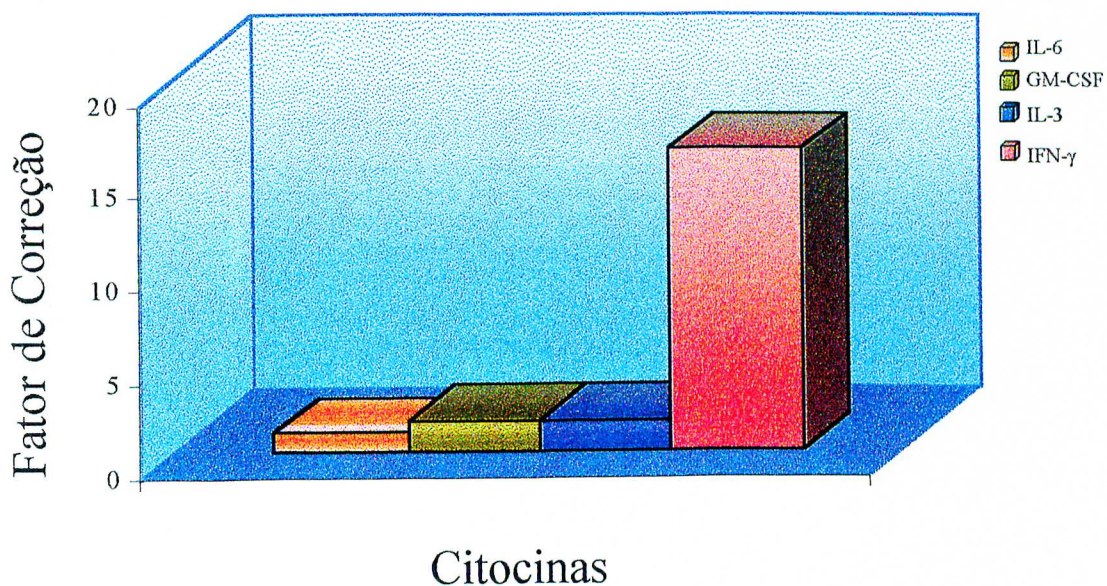


Figura 9. Média dos fatores de correção das amostras controle positivo para *GM-CSF*, *IFN- γ* , *IL-3* e *IL-6*.

ensaios (111, 113 e 105pg/ml), embora próximos ao limite de detecção (62,5pg/ml).

5.5. Líquidos císticos

Entre as 14 amostras de líquido cístico analisadas, foram detectados níveis de citocinas variando de 47,2 a 4096pg/ml para IL-6 em 13 amostras (92,8%) e de 66 a 1180pg/ml para GM-CSF em 6 amostras (42,8%). IL-3 e IFN- γ não foram detectadas em nenhuma amostra analisada, considerando o limite de detecção de cada ensaio. Os níveis reativos das citocinas GM-CSF e IL-6, detectados nas amostras de líquido cístico estão representados na Figura 10.

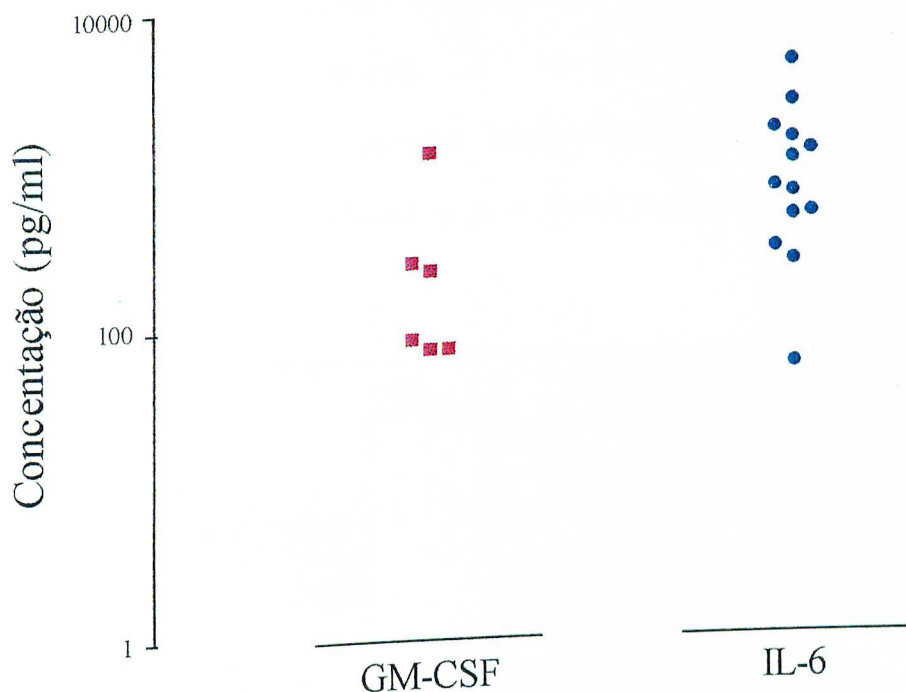


Figura 10. Níveis reativos de GM-CSF e IL-6 em líquidos císticos.

A porcentagem de reatividade de amostras de líquido e tecido císticos submetidas ao processamento da Fase II para

as citocinas GM-CSF, IFN- γ , IL-3 e IL-6 está representada na Figura 11 e a Tabela 7 discrimina a reatividade de cada amostra. Pôde-se observar nas amostras de líquido cístico maior número de amostras positivas para IL-6 (92,8%) que para GM-CSF (42,8%) com diferença significativa ($p = 0,008$) e nenhuma amostra positiva para IFN- γ e IL-3. Nas amostras de tecido, o percentual de positividade foi baixo para IL-3 (28,6%) e menor ainda para IFN- γ (9,8%). Diferentemente do líquido, foi detectado, no tecido cístico, maior quantidade de amostras positivas para GM-CSF (95,8%) que IL-6 (86,4%), porém sem diferenças significativas. Os percentuais de reatividade no líquido e tecido císticos representam diferenças estatisticamente significativas somente para GM-CSF e IL-3 com $p = 0,0007$ e $p = 0,03$ respectivamente.

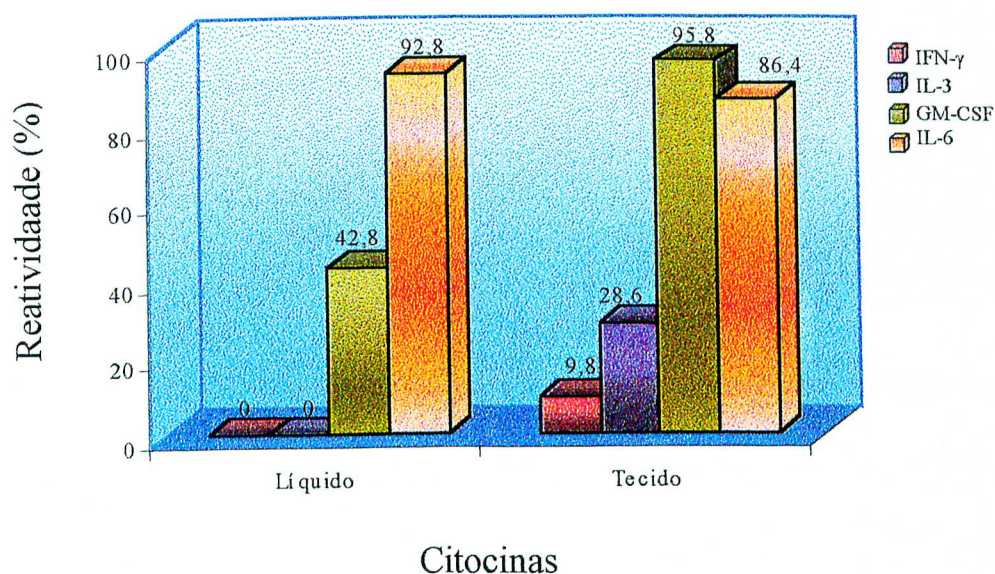


Figura 11. Porcentagem de positividade para GM-CSF, IFN- γ , IL-3 e IL-6 das amostras de líquido e tecido (Fase II) de cistos radiculares humanos.

Tabela 7. Distribuição das amostras de líquido e tecido císticos, reativas e não reativas para as citocinas GM-CSF, IFN- γ , IL-3 e IL-6.

Amostras	GM-CSF		IFN- γ		IL-3		IL-6	
	Liq.	Tec.	Liq.	Tec.	Liq.	Tec.	Liq.	Tec.
1	●	●	○	○	○	○	●	●
2	○	●	○	○	○	○	●	●
3	○	●	○	○	○	○	●	●
4	○	○	○	○	○	○	●	○
5	●	●	○	○	○	●	●	●
6	○	●	○	●	○	●	○	●
7	●	●	○	○	○	○	●	●
8	○	●	○	○	○	○	●	●
9	○	●	○	○	○	○	●	●
10	○	●	○	○	○	○	●	●
11	●	●	○	○	○	○	●	●
12	●	●	○	○	○	○	●	●
13	○	●	○	○	○	○	●	●
14	●	●	○	-	○	●	●	-
15*	-	●	-	-	-	-	-	●
16	-	●	-	○	-	●	-	●
17	-	●	-	●	-	●	-	●
18	-	●	-	-	-	-	-	○
19	-	●	-	○	-	○	-	○
20	-	●	-	-	-	-	-	-
21	-	●	-	○	-	○	-	●
22	-	●	-	○	-	○	-	●
23	-	●	-	○	-	●	-	●
24	-	●	-	○	-	○	-	●

*As amostras císticas de número 15 a 24 não apresentavam líquido em suas cavidades.
○ não reativo ● reativo - não realizado Liq. amostra de líquido Tec. amostra de tecido

Os níveis de GM-CSF, IFN- γ , IL-3 e IL-6 demonstraram que, de acordo com a análise de correlação de "Pearson", não existe correlação entre eles e, de acordo com o teste de correlação de "Spearman", nenhuma concordância.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho objetivou a detecção das citocinas GM-CSF, IFN- γ , IL-3 e IL-6 em 24 cistos radiculares humanos, através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Para tanto, foram consideradas 14 lesões com amostras de tecido e líquido e 10 lesões das quais foram obtidos apenas fragmentos teciduais. Os resultados evidenciaram, nas amostras de líquido cístico, um percentual de 42,8% das lesões apresentando GM-CSF (66 a 1180pg/ml), 92,8% reativas para IL-6 (47 a 4096pg/ml). Não foram identificados níveis reativos para IFN- γ e IL-3. Os

resultados obtidos nas amostras de tecido cístico foram de 9,8% das lesões reativas para IFN- γ (53 a 71pg/ml), 28,6% para IL-3 (277 a 713pg/ml), 86,4% para IL-6 (17 a 835pg/ml) e 95,8% para GM-CSF (68 a 496pg/ml). Não observamos uma concordância de positividade para as diferentes citocinas pesquisadas entre as amostras de tecido e líquido císticos. Da mesma forma, não pudemos identificar qualquer associação significativa entre os níveis de reatividade das citocinas pesquisadas.

A opção pela utilização do ELISA, neste trabalho, foi feita considerando a possibilidade de identificarmos, por um mesmo método, as citocinas que admitidamente, estariam presentes nas células e dispersas pelo tecido cístico, bem como aquelas presentes no líquido cístico. Adicionalmente, este método permitiu a quantificação das citocinas, através 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 o ELISA é realizado em placas com amostras no estado líquido, houve, inicialmente, a necessidade de promover a extração das citocinas pesquisadas dos tecidos císticos colhidos.

Uma preocupação presente durante a elaboração do protocolo de pesquisa foi a de evitar possíveis perdas protéicas durante a manipulação do tecido cístico. Teoricamente, a obtenção da amostra líquida com os antígenos teciduais (citocinas), seria alcançada através da manipulação dos fragmentos objetivando a dissociação tecidual e a ruptura celular.

Idealmente, as amostras de tecido, bem como as do líquido cístico, deveriam ser coletadas a partir de uma abordagem cirúrgica, relativamente atraumática, e no menor espaço de tempo possível, seguido, de um acondicionamento adequado, que favorecesse uma satisfatória preservação do tecido. A observação destes cuidados importaria na obtenção de amostras ótimas para o ensaio dias ou meses após o processamento tecidual. Todavia, não houve oportunidade de encontrar, na literatura consultada, maiores informações sobre uma metodologia que atendesse, amplamente, aos objetivos expostos.

A propósito, Hoenig et al. (1991), pesquisando IL-1 em cistos radiculares através do ELISA, utilizou um protocolo de processamento dos tecidos císticos prevendo, inicialmente, a suspensão de fragmentos teciduais em PBS, seguido de sonicação e ciclos de congelamento e descongelamento. Assim,

após cada ciclo mencionado (5 no total), os autores coletavam o sobrenadante e promoviam a dosagem da citocina. O resultado final foi dado pela soma das dosagens realizadas em cada um dos 5 ciclos previstos. Segundo os autores, estes procedimentos evitariam a degradação protéica que naturalmente ocorreria durante os ciclos de congelamento e descongelamento. Contudo, não fizeram menção a nenhuma forma de controle do processamento desenvolvido, colocando em dúvida, a qualidade dos dados obtidos.

Procurando uma melhor praticidade no processamento, menor tempo de exposição das amostras a temperatura ambiente, maior rendimento e menor perda protéica, foram testadas, em amostras de granulomas acrescidas de concentrações conhecidas de citocinas recombinantes, algumas variáveis como: uso de soluções para dissociação tecidual como EGTA [ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid] e/ou tripsina, trituração das amostras previamente congeladas em nitrogênio líquido com grau e pistilo, e variação no tempo de incubação das amostras em diferentes misturas de digestão (H₂O e/ou tripsina e/ou EGTA, PBS com BSA a 1% e inibidores de proteases, dentre outras). Embora não demonstrados, os resultados destes testes foram insatisfatórios. Tanto o EGTA como a tripsina, com ou sem incubação overnight, promoveram uma boa dissociação tecidual sem, contudo, favorecer a

detecção das citocinas em níveis aceitáveis. A trituração manual com grau e pistilo foi eficiente na dissociação tecidual e na ruptura celular. Contudo, perdeu em praticidade, favorecendo uma perda considerável das amostras em tamanho e volume, visualmente constatados, que interfeririam, significativamente, no rendimento final do sobrenadante.

O uso da collagenase também tem sido considerada objetivando melhorar a dissociação tecidual, tanto em procedimentos clássicos de cultura de células (Gemmel & Seymour, 1998) como na facilitação da extração de citocinas (Stashenko et al., 1991). Na primeira proposta, a collagenase facilitaria a desagregação tecidual, liberando um maior número de células viáveis para cultivo. Estas células, num segundo momento, seriam expostas a antígenos bacterianos, e as citocinas daí secretadas seriam mensuradas no sobrenadante da cultura. Nestes casos, a collagenase não parece ter interferido com o resultado final da concentração de citocinas, já que estas apareceriam no sobrenadante da cultura após a lavagem da collagenase acrescentada.

Por outro lado, Stashenko et al. (1991), analisando tecidos gengivais de pacientes com doença periodontal, por ensaio imunoenzimático, detectaram altos níveis de IL1 β , TNF α

e IL1 α . Segundo os autores, o extrato tecidual para este experimento foi obtido com uma mistura de digestão, contendo collagenase. Entretanto, não foi encontrada nenhuma menção à possibilidade de interferência deste processamento com o resultado final da concentração protéica expressa.

No presente experimento, pudemos observar, à semelhança dos autores mencionados, que a collagenase contribui significativamente para uma melhor dissociação tecidual. Não obstante, as amostras testadas com adição da collagenase resultaram em uma perda protéica final da ordem de 85,5 a 100% (Tabela 6).

Além da collagenase, Stashenko et al. (1991) utilizaram na mistura de digestão o detergente Zwittergent. Esse detergente é zwitteriônico, ou seja, possui cargas aniônicas e catiônicas podendo interagir com as próprias proteínas, com capacidade de solubilizar a membrana das células, sem promover a formação de agregados protéicos insolúveis. O uso desse detergente colaborou com a lise celular e liberação das citocinas intracelulares tanto para o trabalho de Stashenko et al. (1991) como no presente experimento, resultando um percentual de perda protéica nulo ou quase nulo para GM-CSF e IL-3, de 21,5% para IL-6 e de 80,8 a 100% para IFN- γ (tabelas

5 e 6). Esses percentuais, excluindo os do IFN- γ , foram considerados razoáveis ao compará-los com a ação da colagenase.

Tem sido observado o uso de inibidores de proteases (leupeptina, aprotinina e PMSF) para a conservação de proteínas na obtenção de extratos antigênicos (Scott et al., 1987; Enriquez & Riggs, 1998; Souza, 1998). Desta forma, os inibidores foram utilizados no presente experimento para garantir uma melhor conservação das citocinas durante o processamento tecidual. O uso desses inibidores de proteases juntamente com o detergente (Fase II realizada nos tecidos císticos) foi satisfatório na detecção das citocinas, exceção feita para IFN- γ . Todos os processamentos testados não foram ideais para a detecção desta citocina. Pelo fato de o IFN- γ ser uma citocina altamente sensível a esses processamentos, seria aconselhável um estudo mais apurado desta metodologia, procurando pesquisar outros tipos de inibidores de proteases, além dos utilizados, mais eficazes na inibição da proteólise.

Pôde-se observar nas Tabelas 5 e 6 que algumas amostras, nas quais foram adicionados detergente e/ou inibidores de proteases na ausência de colagenase, mostraram-se com níveis de citocinas (GM-CSF, IL-3 e IL-6) superiores às aquelas

concentrações previamente adicionadas. Esses achados poderiam ser explicados, pela presença de resquícios das citocinas recombinantes acrescentadas na primeira etapa do processamento, ou pela existência de concentrações detectáveis nos granulomas previamente ao acréscimo mencionado.

Não obstante a detecção de níveis reativos de citocinas nas amostras aqui testadas, é prudente considerar que estes níveis podem não refletir a real concentração presente nas amostras. Neste sentido, deve-se salientar as próprias limitações do teste ELISA empregado, cujo resultado positivo ou negativo para determinada amostra, está associado ao limite de detecção de cada teste. Como exemplo do exposto, citamos os resultados dos testes para IL-3, cujos valores foram limitados a concentrações acima de 250pg/ml, consideravelmente altas quando comparadas àquela indicada pelo fabricante (30pg/ml). Possivelmente, o percentual de amostras de tecido cístico positivas para IL-3 (28,6%) poderia ser maior se o limite de detecção do teste fosse melhorado. Entretanto, não foi possível reproduzir, em nenhum dos ensaios desenvolvidos, o limite de detecção referido pelo fabricante (Anexo VI). Assim, admitimos para discussão, como resultados positivos, apenas os níveis reativos situados acima daqueles determinados pelo limite de detecção dos

nossos ensaios. Isto não significa, necessariamente, que não haja presença de uma determinada citocina na amostra testada, mesmo que em concentrações mínimas, quando os resultados estiverem abaixo do limite de detecção previsto.

Mesmo que seja prudente ter estas considerações em mente na análise dos resultados, julgamos que nossos achados refletem aqueles da literatura, obtidos por metodologia diversa daquela aqui empregada. Kabashima et al. (1998) observaram uma expressão, aparentemente baixa, de células positivas para IFN- γ (3,1% das células mononucleares) em granulomas periapicais. Nossos resultados sugerem ausência ou uma concentração baixa de IFN γ nas amostras examinadas (tecido e líquido cístico), refletindo, possivelmente, na média, o fenômeno comumente percebido nas lesões císticas estabelecidas. Da mesma forma, pode-se considerar os resultados para IL-6, cuja expressão imunohistoquímica tem sido identificada como significativa e acentuada nas lesões periapicais (Bando et al., 1993; Formigli et al., 1995). Achados semelhantes foram confirmados em estudos utilizando ELISA, PCR (Takeichi et al., 1996) e hibridização *in situ* (Honma et al., 1998). Da mesma forma, os resultados aqui encontrados, mostram uma marcante presença de IL-6, tanto nas amostras teciduais como no conteúdo cístico.

Não obstante as considerações aqui discutidas quanto às limitações metodológicas, pertinentes ao processamento tecidual, ao próprio teste, e o cuidado na interpretação dos resultados, vale salientar que os coeficientes de variação inter e intra-ensaios para cada citocina testada, ficaram abaixo do limite da variação, considerado aceitável pelo fabricante -menor que 20%-, constatando-se, desta forma, boa reprodutibilidade dos ensaios.

Vencidas essas considerações preliminares, é importante salientar que as citocinas são mediadores protéicos, tanto da imunidade natural como da 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 (Th - *T helper*), à produção de diferentes citocinas. A subpopulação Th₁ é importante indutora das reações de hipersensibilidade do tipo tardio, mediada por células, e as principais citocinas envolvidas nesse tipo de resposta são IL-12, IL-2, IFN- γ e TNF. Th₂ é outra subpopulação de linfócitos que produz IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e baixos níveis de TNF e são mais importantes para a imunidade humoral (figura 12). Postula-se

que a ativação preferencial de tais subpopulações pode ser responsável pelos diferentes aspectos clínico-patológicos de algumas doenças (Mosmann & Coffman, 1989; Coffman & Mosmann, 1991; Romagnani, 1991; Scott & Kaufmann, 1991; Abbas, 1995; Fujihashi *et al.*, 1996; Mosmann & Sad, 1996; Kabashima *et al.*, 1998; Takahashi, 1998).

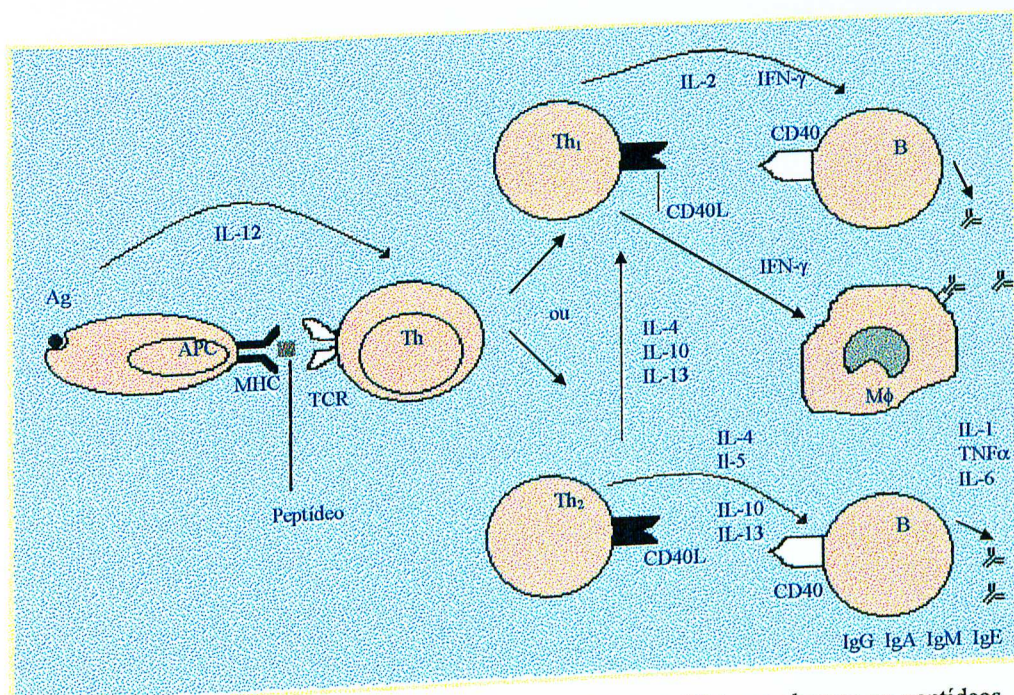


Figura 12. Resposta imune Th₁ ou Th₂. As células T helper (Th) reconhecem os peptídeos apresentados pelo Complexo Principal de histocompatibilidade (MHC) das células apresentadoras de antígeno (APC). A produção de IL-12 pela APC promove o desenvolvimento de células Th₁ que ativam macrófagos. As células Th₂ produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13; responsáveis pela produção de anticorpos (IgG, IgA, IgM e IgE). Abreviações: Ag. antígeno; B. célula B; IFN-γ. Interferon γ; IL. Interleucina; Mφ. macrófago; T. célula T; TCR. receptor de célula T; Th. T *helper*; (adaptado de Takahashi, 1998).

Hoenig *et al.* (1991), em pesquisa com cistos radiculares, sustentam a teoria da importância de mediadores solúveis, induzindo processos de reabsorção das células ósseas como prostaglandina E₂ e leucotrienos e que a reabsorção óssea pode ser inibida, apenas parcialmente, por adição de

inibidores de cicloxigenase e lipoxigenase, indicando que outros mediadores podem contribuir para a atividade de reabsorção óssea encontrada nos cistos dentais.

O presente estudo mostra resultados com ausência de IFN- γ no líquido e um percentual de reatividade não significativo (9,8%) nos tecidos dos cistos radiculares. Isso poderia indicar que o perfil Th₁, representado pelo IFN- γ , não seria a principal característica da resposta inflamatória nas amostras císticas estudadas.

Roberts e colaboradores, em 1997, pesquisando em tecido gengival com periodontite a presença de várias citocinas por RT-PCR (*reverse-transcription polymerase chain-reaction*), dentre elas o IFN- γ , não detectaram RNAm para IFN- γ em nenhum dos tecidos. Os autores comentam que essa ausência pode ser própria dos efeitos provocados pela técnica de extração utilizada ou pela possibilidade de as células T presentes nas biópsias das lesões periodontais não estarem ativadas por antígenos específicos.

Kabashima et al. (1998) identificaram positividade para IFN- γ em 3,1% das células mononucleares em granulomas periapicais. Além disso, encontraram um percentual médio de

1,1% de células positivas para IL-1 e óxido nítrico sintetase induzível (iNOS). Os autores discutem que as células, produzindo IFN- γ , levariam à ativação de macrófagos pela indução de óxido nítrico (fator relaxante endotelial), modulando o grau de inflamação. Tem sido relatado que o óxido nítrico em altas concentrações suprime a reabsorção óssea; em contraste, em baixas concentrações, estimula a reabsorção óssea mediada por IL-1 (Rauston et al., 1994, 1995). Neste sentido, as baixas concentrações de IFN- γ encontradas, poderiam estar favorecendo a indução de reabsorção. Esses resultados são compatíveis com os achados de Lacey et al. (1995). Esses autores observaram que, em cultura de células da medula óssea (macrófagos) de camundongos, a presença de IFN- γ exercia um papel inibitório na formação de células osteoclásticas.

Ao contrário do IFN- γ , a IL-6 demonstrou-se presente em 92,8 e 86,4% das amostras de líquido e tecido, respectivamente, confirmando os achados de outros autores (Bando et al., 1993; Formigli et al., 1995; Meghji, et al., 1996; Euler et al., 1998; Homma, et. al., 1998). Bando et al. (1993), constataram IL-1 e IL-6 na parede de células epiteliais císticas e células endoteliais vasculares. Os autores comentam que o crescimento do cisto radicular está

relacionado com o processo autócrino de estimulação da proliferação das células epiteliais císticas pela IL-1 e IL-6 e com a atividade osteolítica dessas mesmas citocinas causando a reabsorção óssea. Da mesma forma, Meghji et al. (1996) sugeriram que a destruição progressiva do osso depende do crescimento celular e da sua capacidade de reabsorção óssea. Esse crescimento pode também estar envolvido com a interação do epitélio e a cápsula fibrosa cística. Formigli et al., em 1995, detectaram altos níveis de IL-6 no fluido cístico, relacionando-os com a ativação osteoclástica observada ao redor dos cistos radiculares.

Os níveis de IL-6 obtidos no líquido dos cistos radiculares, nesse trabalho, foram de 47,2 a 4095,8pg/ml; superiores aos encontrados por Formigli et al. em 1995 (48,08 a 92,46pg/ml). No tecido, os níveis variaram de 17 a 835pg/ml em relação à cada 0,1 grama de tecido. A presença dos altos níveis de IL-6 poderiam reforçar a suspeita de que esteja ocorrendo uma resposta inflamatória com tendência ao perfil tipo Th₂, nessas amostras estudadas.

Deve ser dada importância à presença de IL-3 no tecido cístico (28,6%), pois até então, não havia sido pesquisada nos cistos radiculares. Sua presença talvez possa confirmar sua participação na proliferação de precursores de

osteoclastos, bem como, sua implicação na reabsorção óssea que ocorre em doenças inflamatórias como a artrite reumatóide. Barton & Mayer (1989) comentam que, pelo fato de a IL-3 ser produzida por linfócitos T ativados e ter elevado o número de osteoclastos em cultura de células da medula óssea, os linfócitos T exerceriam um papel indireto na reabsorção óssea ocorrida neste tipo de doença.

Assim como a IL-3, o GM-CSF também não havia sido pesquisado nas lesões císticas radiculares humanas. Myint et al. (1999) analisaram o efeito dessas duas citocinas em camundongos com osteopetrose injetando diariamente 5ng de GM-CSF e/ou 100ng de IL-3 murina recombinante e verificaram que o número de células TRAP positivas (tartrate-resistant acid phosphatase) aumentou. Os autores sugeriram que os fatores GM-CSF e IL-3 induzem o desenvolvimento de osteoclastos. No presente trabalho, os resultados foram significativos para GM-CSF no líquido e tecido dos cistos (42,8 e 86,4%, respectivamente). A presença de IL-3 e GM-CSF nos cistos poderia ser devido à produção por células inflamatórias locais e linfócitos Th₂.

Alguns autores, como foi dito anteriormente, acreditam no sinergismo entre GM-CSF e IL-6 (Caracciolo & Rovera, 1989) e GM-CSF e IL-3 (Einat et al., 1996) relacionado com o estímulo

à reabsorção óssea. Horwood et al., em 1998, relacionaram a IL-18 com a inibição da formação de osteoclastos, quando mediada por GM-CSF. Desta forma, qual seria a atuação do GM-CSF nas lesões radiculares? Será que a ação do GM-CSF estaria na dependência do sinergismo com outras citocinas na definição do tipo de resposta exercida no microambiente? GM-CSF com IL-6 ou IL-3 induziria a reabsorção óssea e GM-CSF com IL-18 inibiria a reabsorção? Os níveis de GM-CSF detectados no líquido (66 a 1180pg/ml) e tecido císticos (68 a 496,3pg/ml), no atual experimento, estariam sendo liberados de células com perfil Th₁ ou Th₂? Estariam estimulando a reabsorção óssea ou participando da modulação óssea inibindo a osteoclastogênese? Por outro lado, pode-se perguntar ainda: O GM-CSF atuaria no homem como atua nos modelos experimentais utilizados nas recentes pesquisas (Einat et al., 1996; Horwood et al., 1998; Myint et al., 1999)? Neste experimento, foi demonstrada a sua presença em cistos radiculares, cujo crescimento, de alguma forma, está associado à reabsorção óssea local. Entretanto, em função da variabilidade dos achados, não nos é possível, de forma definitiva, identificar seu papel nas lesões estudadas.

As sugestões de Silva (1995) e Cury et al. (1998), a respeito da predominância de uma resposta inflamatória de perfil Th₂ nos cistos radiculares em desenvolvimento (com proliferação epitelial), poderiam ser reforçadas com os

resultados apresentados nesta investigação. Presença marcante de GM-CSF e IL-6 e razoável quantidade de amostras contendo IL-3 (predominantemente perfil Th₂) e uma mínima quantidade de amostras com IFN- γ (perfil Th₁).

A identificação dos tipos celulares apresentando essas citocinas nas lesões estudadas poderiam ter sido realizados para melhor esclarecimento do quadro sugerido. Este procedimento, entretanto, não foi realizado em função da exigüidade do material colhido cirurgicamente.

Surpreendentemente, o pool de tecidos pulpare (controle negativo) mostrou-se negativo para todas as citocinas, exceção ao GM-CSF (com média de 109,5pg/ml entre os ensaios). Porém, as concentrações encontradas situavam-se próximas ao limite de detecção. Não foi possível encontrar na literatura uma explicação para estes achados. Pouco se conhece da presença de citocinas inflamatórias no ambiente tecidual associado aos dentes inclusos. Talvez, a interação entre os tecidos do folículo dentário (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 et al., 1997; Wise et al., 1998; Grier et al., 1998). A presença de

reabsorção óssea fisiológica associada à erupção dentária poderia justificar esses resultados. Outro aspecto que poderia, como sugestão, explicar a detecção de GM-CSF no "controle negativo" 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. Além disso, os níveis encontrados nas amostras císticas foram em 87% dos casos duas vezes superiores ao limite de detecção, atenuando maiores dificuldades na diferenciação das amostras positivas. Estes achados mereceriam melhor investigação.

A aplicação dos resultados deste trabalho frente às lesões radiculares é meramente laboratorial, pois a produção ou ação excessiva de citocinas pode levar à lesão tecidual. A administração de citocinas ou seus inibidores é uma aproximação potente para modificar respostas biológicas associadas com doenças, porém os desafios são muitos. O domínio do conhecimento sobre a ação das citocinas *in vitro* impõe um desafio permanente ao entendimento sobre suas complexas interações nos sistemas *in vivo*. É necessário descobrir o caminho mais eficaz para o uso das citocinas e substâncias antagônicas sem prejuízos biológicos e morais aos seres vivos, em especial aos humanos.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com esse trabalho levam às seguintes conclusões:

- O processamento dos tecidos realizados com uso de detergente e inibidores de proteases e ausência de colagenase (Fase II) demonstrou ser mais adequado para a detecção de GM-CSF, IL-3 e IL-6. Para pesquisa de

IFN- γ por ensaio imunoenzimático, esse processamento não foi adequado e deverá ser revisto.

- O IFN- γ e a IL-3 não foram detectados no líquido, porém, foram detectados em pequeno número de amostras de tecido dos cistos radiculares, de maneira significativa para IL-3, de acordo com o limite de detecção de cada teste.
- O limite de detecção do ELISA para IL-3 foi alto em relação ao mencionado pelo fabricante. O protocolo realizado para IL-3 deverá ser aprimorado para futuros experimentos.
- A citocina IL-6 e o fator GM-CSF estão presentes no tecido de cistos radiculares humanos na maioria das amostras testadas.
- A citocina IL-6 está presente no líquido de cistos radiculares humanos na maioria das amostras testadas e

o fator GM-CSF também está presente porém em menor número de amostras.

- As citocinas GM-CSF, IL-3 e IL-6 podem estar participando do processo de reabsorção óssea nos cistos radiculares em fase de crescimento.

ABSTRACT

The major stimuli for the development of the radicular cysts associated to Mallassez'epithelial remnants, are the bacterial endotoxin that act as mitogen and stimulus for the cytokine production. The cytokines released by the immune system cells have an important role in the cystic growth and consequent destruction of the surrounding bone tissue.

The aim of this work was to determine the levels of GM-CSF, IFN- γ , IL-3 and IL-6 cytokines related to the inflammatory process and the bone resorption in the liquid and tissue of the human radicular cysts by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The detection limit of ELISAs for cytokines varied from 62.5 to 125 pg/ml for GM-CSF; 9.8 to 39.1 pg/ml for IFN- γ ; 250 to 500 pg/ml for IL-3 and from 9.4 to 18.8 pg/ml for IL-6. Concerning the cystic liquid samples, in 42.8% of the lesions was found GM-CSF (66 to 1180 pg/ml) and in 92.8% was detected IL-6 (47 to 4096 pg/ml). No IFN- γ and IL-3 were detected in any samples. For the cystic tissue samples, the results obtained were: 9.8% of the lesions for IFN- γ (53 to 71 pg/ml); 28.6% for IL-3 (277 to 713 pg/ml); 86.4% for IL-6 (17 to 835 pg/ml) and 95.8% for GM-CSF (68 to 496 pg/ml).

We may conclude that the IFN- γ and IL-3 cytokines are present in the tissue of radicular cysts, even though, in low number of lesions. In addition are also found GM-CSF and IL-6 in the liquid and the tissue of the human radicular cysts. These cytokines may be participating of the inflammatory process and cystic growth, as well as, of the bone resorption that are characteristic features of that lesions.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 2. ed. Rio de Janeiro: RevinteR, 1995. 469 p.
- 02 ALAVI, A. M., GULABIVALA, K., SPEIGHT, P. M. Quantitative analysis of lymphocytes and their subsets in periapical lesions. **Int. Endod. J.**, Baltimore, v. 31, p.233-241, 1998.
- 03 ARAGÃO, F. J. L., RIBEIRO, S. G. Detecção de proteínas pela técnica ELISA. In: BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. 309 p.
- 04 BANDO, Y., HENDERSON, B., MEGHJI, S., POOLE, S., HARRIS, M. Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 22, p. 221-227, 1993.

- 05 BARTON, B. E., MAYER, R. IL-3 induces differentiation of bone marrow precursor cells to osteoclast-like cells. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 143, p. 3211-3216, 1989.
- 06 BHASKAR, S. N. Periapical lesions - types, incidence and clinical features. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 21, p. 657-671, 1966.
- 07 BROWNE, R. M. **Investigative pathology of odontogenic cysts**. Boston: Crc, 1992. 253 p.
- 08 CARACCILO, D., CLARK, S. C., ROVERA, G. Human interleukin-6 supports granulocytic differentiation of hematopoietic progenitor cells and acts synergistically with GM-CSF. **Blood**, Duluth, v. 73, p. 666-670, 1989.
- 09 CHAVES-BORGES, F. A., MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança em laboratórios**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 1997. 56 p.
- 10 COFFMAN, R. L., MOSMANN, T. R. CD4⁺ T-cell subsets: regulation of differentiation and function **Res. Immunol.**, v. 142, p. 7-9, 1991.
- 11 CURY, V. C. F., SETTE, P. S., SILVA, J. V., ARAÚJO, V. C., GOMEZ, R. S. Immunohistochemical study of apical periodontal cysts. **J. Endod.**, Baltimore, v. 24, n. 1, p. 36-37, 1998.
- 12 DEWHIRST, F. E., STASHENKO, P., MOLE, J. E., TSURUMACHI, T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identify with interleukin 1 β . **J. Immunol.**, Baltimore, v. 135, p. 2562-2568, 1985.
- 13 EINAT, M., NAGLER, A., AMIEL, A., FEJGIN, M. D., RUDI, A., KASHMAN, Y., FABIAN, I. Synergistic effects of interleukin-11 with other growth factors on the expansion of hematopoietic progenitors from normal individuals and chronic myeloid leukemia patients resistant to treatment with cytosine arabinoside or eilatin. **Leuk. Res.**, Oxford, v. 20, p.751-759, 1996.

- 14 ENRIQUEZ, F. J., RIGGS, M. W. Role of immunoglobulin a monoclonal antibodies against p23 in controlling murine *Cryptosporidium parvum* infection. **Infect. Immun.**, Washington, v. 66, n. 9, p. 4469-4473, 1998.
- 15 EVERSOLE, L. R., SABES, W. R., SHELDON R. Agressive growth and neoplastic potential of odontogenic cysts. **Cancer**, Philadelphia, v.35, p. 270-282, 1975.
- 16 EULER, G. J., MILLER, G. A., HUTTER, J. W., D'ALESSANDRO, M. M. Interleukin-6 in neutrophils from peripheral blood and inflammatory periradicular tissues. **J. Endod.**, Baltimore, v. 24, n. 7, p. 480-484, 1998.
- 17 FAVUS, M. J. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1996. 477 p.
- 18 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. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 24, p. 216-220, 1995.
- 19 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. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 103, n. 3, p. 422-428, 1996.
- 20 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. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v.17, p. 84-90, 1988.
- 21 GEMMELL, E., SEYMOUR, G. J. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 77, n. 1, p. 16-26, 1998.

- 22 GRIER, R. L. 4th, ZHAO, L., ADAMS, C. E., WISE, G. E., Secretion of CSF-1 and its inhibition in rat dental follicle cells: implications for tooth eruption. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 106, n. 3, p. 808-815, 1998.
- 23 HARVEY, W., GUAT-CHEN, F., GORDON, D., MEGHJI, S., EVANS, A., HARRIS, M. Evidence for fibroblasts as the major source of prostacyclin and prostaglandin synthesis in dental cyst in man. **Archs. Oral Biol.**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 223-229, 1984.
- 24 HOENIG, 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.
- 25 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. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 27, p. 399-404, 1998.
- 26 HOROWITZ, M. C., COLEMAN, D. L., RYABY, J. T., EINHOR, T. A. Osteotropic agents induce the differential secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by the osteoblast cell line MC3T3-E1. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v. 4, p. 911-921, 1989.
- 27 HORTON, J. E., RAIZ, L. G., SIMMONS, H. A., OPPENHEIM, J. J., MERGENHAGEN, S. E. Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leucocytes. **Science**, Washington, v. 177, p. 793-795, 1972.

- 28 HORWOOD, N. J., UDAGAWA, N., ELLIOTT, J., GRAIL, D., OKAMURA, H., KURIMOTO, M., DUNN, A. R., MARTIN, T. J., GILLESPIE, M. T. Interleukin 18 inhibits osteoclast formation via T cell production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 101, n. 3, p. 595-603, 1998.
- 29 KABASHIMA, H., NAGATA, K., MAEDA, K., IJIMA, T. Interferon- γ -producing cells and inducible nitric oxide synthase-producing cells in periapical granulomas. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 27, p. 95-100, 1998.
- 30 KONTIAINEN, S., RANTA, H., LAUTENSCHLAGER, I. Cells infiltrating human periapical inflammatory lesions. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 15, n. 10, p. 544-546, 1986.
- 31 KRAMER, I. R. H., PINDBORG, J. J., SHEAR, M. **Histological typing of odontogenic tumors**. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
- 32 KURIHARA, H., KOBAYASHI, Y., FRANCISCO, I. A., ISOSHIMA, O., NAGAI, A., MURAYAMA, Y. A microbiological and immunological study of endodontic-periodontic lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v. 21, n. 12, p. 617-621, 1995.
- 33 LACEY, D. L., ERDMANN, J. M., TEITELBAUM, S. L., TAN, H., OHARA, J., SHIOI, A. Interleukin 4, interferon- γ , and prostaglandin E impact the osteoclastic cell-forming potential of murine bone marrow macrophages. **Endocrinol.**, Bethesda, v. 136, p. 2367-2376, 1995.
- 34 LALONDE, E. R., LUEBKE, R. G. The frequency and distribution of periapical cysts and granulomas. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 25, n. 6, p. 861-868, 1968.
- 35 LERNER, U. H. Regulation of bone metabolism by the kallikrein-kinin system, the coagulation cascade, and the acute-phase reactants. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 78, n. 4, p. 481-493, 1994.

- 36 LIM, G. C., TORABINEJAD, M., KETTERING, J., LINKHARDT, T. A., FINKELMAN, R. D. Interleukin 1 β in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v.20, n. 5, p. 225-227, 1994.
- 37 LIU, Q., DU, X. X., SCHINDEL, D. T., YANG, Z. X., RESCORLA, F. J., WILLIAMS, D. A., GROSFELD, J. L. Trophic effects of interleukin-11 in rats with experimental short bowel syndrome. **J. Pediatr. Surg.**, New York, v. 31, n. 8, p. 1047-1050, 1996.
- 38 LOUIT, J. F., NISBET, N. W. The origin of osteoclasts. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 161, p. 193-203, 1982.
- 39 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.
- 40 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. **J. Endod.**, Baltimore, v. 18, n. 10, p. 497-500, 1992.
- 41 MATSUSHITA, K., TAJIMA, T., TOMITA, K., ABEYAMA, K., MARUYAMA, I., TAKADA, H., NAGAOKA, S. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses against possible causative bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. **J. Endod.**, Baltimore, v. 24, n. 12, p. 817-821, 1998.
- 42 MATTHEWS, J. B., MASON, G. I. Immunoglobulin producing cells in human periapical granulomas. **Br. J. Oral Surg.**, Philadelphia, v. 21, p. 192-197, 1983.
- 43 MEGHJI, S., HARVEY, W., HARRIS, M. Interleukin 1 like activity in cystic lesions of the jaw. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 27, p. 1-11, 1989.

- 44 MEGHJI, S., QURESHI, W., HENDERSON, B., HARRIS, M. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 41, n. 6, p. 523-531, 1996.
- 45 MYINT, Y. Y., MIYAKAWA, K., NAITO, M., SHULTZ, L. D., OIKE, Y., YAMAMURA, K., TAKAHASHI, K. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 correct osteopetrosis in mice with osteopetrosis mutation. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 154, n. 2, p. 553-566, 1999.
- 46 MORRIS, J. C., NEBEN, S., BENNETT, F., FINNERTY, H., LONG, A., BEIER, D. R., KOVACIC, S., McCOY, J. M., DiBLASIO-SMITH, E., LaVALLIE, E. R., CARUSO, A., CALVETTI, J., MORRIS, G., WEICH, N., PAUL, S. R., CROSIER, P. S., TURNER, K. J., WOOD, C. R. Molecular cloning and characterization of murine interleukin-11. **Exp. Hematol.**, Charlottesville, v. 24, p. 1369-1376, 1996.
- 47 MOSMANN, T. R., COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 145-173, 1989.
- 48 MOSMANN, T. R., SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, v. 17, p. 138-146, 1996.
- 49 NAIR, R., PAJAROLA, G., SCHROEDER, H. E. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 81, p. 93-102, 1996.
- 50 NEDDERMANN, P., GRAZIANI, R., CILIBERTO, G., PAONESSA, G. Functional expression of soluble human interleukin-11 (IL-11) receptor alpha and stoichiometry of in vitro IL-11 receptor complexes with gp130. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, n. 48, p. 30986-30991, 1996.

- 51 NEIBURGER, E. J. A mandibular cystlike lesion in a prehistoric american indian. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 43, n. 4, p. 528-529, 1977.
- 52 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 Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 58, n. 2, p. 160-165, 1984.
- 53 PAGE, R. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v.26, p.230-242, 1991.
- 54 PAUL, W. E. **Fundamental of immunology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1998. 1589 p.
- 55 PULVER, W. H., TAUBMAN, M. A., SMITH, D. J. Immune components in human dental periapical lesions. **Acta. Oral Biol.**, v. 23, n. 6, p. 435-443, 1978.
- 56 QUE, B. G., WISE, G. E. Conony-stimulating factor-1 and monocyte chemotactic protein-1 chemotaxis for monocytes in the rat dental follicle. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 42, n. 12, p. 855-860, 1997.
- 57 RANNEY, R. R. Immunologic mechanisms off pathogenesis in periodontal diseases: An assessment. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 26, p. 243-254, 1991.
- 58 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. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v. 10, p 1040-1049, 1995.
- 59 RAUSTON, S. H., TOOD, D., HELFRICH, M.H., BENJAMIN, N. GRABOWSKI, P. S. Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. **Endocrinol.**, Bethesda , v. 135, p 330-336, 1994.

- 60 ROBERTS, F. A., McCAFFERY, K. A., MICHALEK, S.M. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 76, n. 12, p. 1833-1839, 1997.
- 61 ROMAGNANI, S. Human T_h1 and T_h2 subsets: doubt no more. **Immunol. Today**, Barking, v. 12, n. 8, p.256-257, 1991.
- 62 RUBIN, E., FARBER, J. L. **Pathology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1999. 1664 p.
- 63 SALAMA, N., HILMY, A. An ancient Egyptian skull and a mandible showing cysts. **Br. Dent. J.**, London, v. 90, p. 17-18, 1951.
- 64 SCOTT, P., KAUFMANN, S.H.E. The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. **Immunol. Today**, v. 12, n. 10, p.346-348, 1991.
- 65 SCOTT, P., PEARCE, E., NATOVITZ, P., SHEAR, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 139, p.221-227, 1987.
- 66 SELTZER, S, FARBER, P. A. Microbiologic factors in endodontology. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 78, n. 5, p. 634-645, 1994.
- 67 SHAFER, W. G., HINE, M. K., LEVY, B. M. **Patologia bucal**, 4. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985. 837 p.
- 68 SHEAR, M. **Cysts of the oral regions**. 2. ed. London: Wright. PSG, 1983. 218 p.
- 69 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).

- 70 SMITH, G., MATTHEWS, J. B., SMITH, A. J., BROWNE, R. M. Immunoglobulins-producing cells in human odontogenic cysts. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 16, p. 45-48, 1987.
- 71 SMITH, G., SMITH, A. J., BROWNE, R. M. Histochemical studies on glicosaminoglycans of odontogenic cysts. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 17, p. 55-59, 1988.
- 72 SOUZA, M. A., *Lectina KM de **Artocarpus integrifolia** induz produção de interleucina-12 e proteção contra a infecção por **Leishmania major***. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, 1998. 134 p. (Tese, Doutorado).
- 73 STAPAFORÉ, C. M., Jr. GRIFFIN, J. A., KEYES, G. G., WEARDEN, S., SKIDMORE, A. E. Periapical biopsy report: analysis over a 10 year period. **J. Endod.**, Baltimore, v. 16, n. 5, p. 239-241, 1990.
- 74 STASHENKO, P., JANDINSKI, J. J., FUJIYOSHI, P., RYNAR, J., SOCRANSKY, S. S. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 62, n. 8, p. 504-509, 1991.
- 75 STASHENKO, P., WANG, C. Y., TANI-ISHII, N., YU, S. M. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 78, n. 4, p. 494-502, 1994.
- 76 STASHENKO, P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 6, p. 89-96, 1990.
- 77 STERN, M. H., DREIZEN, S., MACKLEER, B. F., LEVY, B. M. Antibody-producing cells in human periapical granulomas and cysts. **J. Endod.**, Baltimore, v. 18, p. 422-426, 1981.

- 78 SUDA, T., UDAGAWA, N., NAKAMURA, I., MIYAURA, C., TAKAHASHI, N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. **Bone**, New York, v. 17(suppl. 2), p. 87s-91s, 1995.
- 79 SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 78, n. 4, p. 522-530, 1994.
- 80 TAKAHASHI, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. **Int. Endod. J.**, London, v. 31, p. 311-325, 1998.
- 81 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 inflamed sites of bone resorption. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v. 58, p. 244-248, 1996.
- 82 TORABINEJAD, M., EBY, W. C., NAIDORF, I. J. Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v. 11, n. 11, p. 479-488, 1985.
- 83 TORABINEJAD, M., KEETTERING, J. D. Detection of immune complexes in human periapical lesions by anticomplement immunofluorescence technique. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 48, n. 3, p. 256-261, 1979.
- 84 TORABINEJAD, M., KEETTERING, J. D. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v. 11, n. 3, p. 122-125, 1985.
- 85 TORABINEJAD, M. Mediators of acute and chronic periradicular lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 78, n. 4, p. 511-21, 1994.

- 86 TORABINEJAD, M. Mediators of pulpal and periapical pathosis. **J. Calif. Dent. Assoc.**, California, v. 14, n. 12, p. 22-25, 1986.
- 87 TORABINEJAD, M. The role of immunological reaction in apical cyst formation and the fate of epithelial cells after root canal therapy: a theory. **Int. J. Oral Surg.**, Copenhagen, v. 12, p. 14-22, 1983.
- 88 WANG, C., STASHENKO, P. Characterization of bone-resorbing activity in human periapical lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v. 19, n. 3, p. 107-111, 1993.
- 89 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. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 106(suppl. 1), p. 397-400, 1998.
- 90 YANAGISAWA, S. Pathologic study of periapical lesions 1. Periapical granulomas: clinical, histopathologic and immunohistopathologic studies. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 9, p. 288-300, 1980.
- 91 YOSHIE, H., TAUBMAN, M. A., OLSON, C. L., EBERSOLE, J. L., SMITH, D. J. Periodontal bone loss and immune characteristics after adoptive transfer of *Actinobacillus*-sensitized T cells to rats. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 22, p. 499-505, 1987.
- 92 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. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 25, p. 325-330, 1996.

ANEXOS



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

AVALIAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA: Informações relativas ao Projeto de Pesquisa Intitulada "Determinação das Citocinas IL-3, IL-6 e 6M - CSF em cistos radiculares humanos".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola
Laboratório de Imunologia

ANÁLISE DOS ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA:

1 - Em respeito à Resolução 156/96 item III:

- adequada aos objetivos científicos propostos;
- fundamentada em bibliografia adequada;
- metodologia bem definida;
- procedimentos pela colheita de material de estudo fazendo parte da terapêutica proposta, sem riscos para o indivíduo.

2 -- Item IV:

- Consentimento livre e esclarecido anexo
- Esclarecimento e informação ao indivíduo da pesquisa do resultado histopatológico.
- Obs.: O Comitê de Pesquisa solicitará do pesquisador consentimento emitido em duas vias, sendo uma com o pesquisador e outra com o indivíduo da pesquisa.

3 - Item VI:

- Folha de rosto preenchida adequadamente;
- Descrição detalhada e ordenada do projeto de pesquisa;
- Orçamento financeiro detalhado;
- Destino dos resultados definidos;
- Curriculum Vitae dos pesquisadores.

CONCLUSÃO:

Estamos de acordo com a aprovação do projeto.

Uberlândia 24 de junho de 1998

Margarita
Profª Margarita Garotti

ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia
Laboratório de Patologia Bucal

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu,.....
Doc. nº.,consinto na colheita 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 199....

.....
Assinatura

PRONTUÁRIO:

DADOS PESSOAIS

NOME:

PROFISSÃO:

COR:

ENDEREÇO:

IDADE:

SEXO:

C.D. RESPONSÁVEL

NOME:

C.R.O.:

ENDEREÇO:

FONE:

CLÍNICA:

OBSERVAÇÕES:

DIAGNÓSTICO CLÍNICO:

FICHA DE BIÓPSIA

CARACTERES FÍSICOS DA LESÃO:

LOCALIZAÇÃO:

FORMA:

COR:

CONSISTÊNCIA:

INSERÇÃO:

MOBILIDADE:

TAMANHO:

OUTROS SINAIS:

HISTÓRIA CLÍNICA DA LESÃO:

TEMPO DE LESÃO:

SINTOMAS:

É PRIMITIVA?

O. LESÕES ASSOCIADAS:

NÓDULOS LINFÁTICOS:

FATORES ETIOLÓGICOS:

LESÕES INTRA-ÓSSEAS:

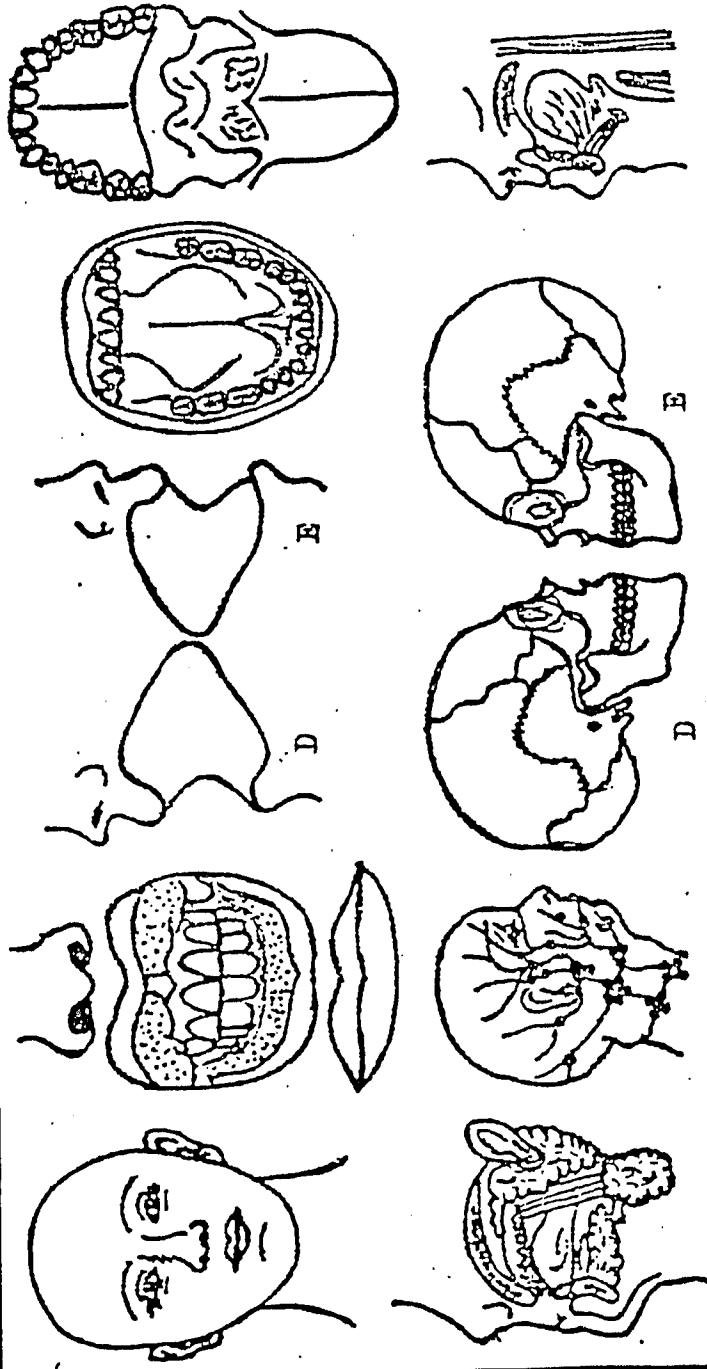
LIMITES:

RADIOOPACIDADE:

Assinalar nos esquemas o local da lesão:

CLÍNICO

EXAME



ANEXO IV

Projeto do Sonotrodo

Gervásio, Aurélia M.; Duarte, Marcus A. V.

Justificativa

Para auxiliar a sonicação de pequena quantidade de amostra acondicionada em tubos tipo “*eppendorf*”, surgiu a necessidade de adaptar uma micropona catenoidal (sonotrodo) ao aparelho de ultrassom (sonicador) que apresentasse uma extremidade mais fina que a original (Thornton, SP).

Metodologia

No projeto do sonotrodo foi utilizado o pacote comercial de elementos finitos ANSYS 5.2, uma vez que a condição necessária para o bom funcionamento de um sonotrodo implica na possibilidade de sintonizar a frequência de oscilação do cristal piezoelétrico do ultrassom com uma das frequências naturais do sonotrodo, ou seja, nas frequências em que as vibrações do sonotrodo são máximas.

Via de regra, a frequência de excitação básica de um ultrassom é de 20 kHz podendo ser ajustada em ± 5 kHz. Para construção do modelo matemático via elementos finitos, o elemento utilizado foi um sólido estrutural assimétrico de três e quatro nós com dois graus de liberdade por nó (PLANE 42).

O material utilizado foi o titânio (mesmo material da peça original), tendo como propriedades físicas: módulo de Young de 102 Gpa, densidade de 4850 kg/m^3 e razão de Poisson de 0,19. A opção de solução foi a Análise Modal, sendo que as frequências naturais, e respectivos modos próprios de vibração, foram obtidas via expansão em subespaço, modelo de massas concentradas, com vinte vetores ortogonais extras.

A partir do modelo original, a geometria e as dimensões do sonotrodo foram variadas até o momento em que foi obtido um formato que atendesse

às especificidades do trabalho e que possuísse pelo menos uma frequência natural entre 15 e 25 kHz.

Teste de eficiência

Foi utilizado uma amostra de meio de cultura contendo células viáveis. Analisou-se a presença das células com auxílio do azul tripan e da visualização ao microscópio óptico. A amostra foi sonicada realizando 5 ciclos de 30 segundos e posteriormente visualizada ao microscópio para certificar da destruição de todas as células.

Resultados

A geometria final encontrada para o sonotrodo comparada ao modelo original está demonstrada na figura 1. Um modelo de elementos finitos com 530 elementos e 650 nós, para o qual foram calculadas as cinco primeiras frequências resultando em: 11437, 24866, 38414, 51044 e 63480 Hz.

Ao submeter a amostra de 50 μ l de células acondicionados em um tubo tipo "eppendorf" ao sonicador, observou-se o rompimento de todas as células existentes na amostra.

Conclusão

O resultado foi altamente satisfatório, pois nos permite a sonicação de volumes pequenos, o que é muito importante quando se trabalha com uma quantidade escassa de amostra.

Agradecimentos

Agradecemos ao Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Uberlândia, através do Sr. Luiz Antônio dos Santos e do técnico mecânico Valdico de Faria, que colaboraram na confecção do sonotrodo.

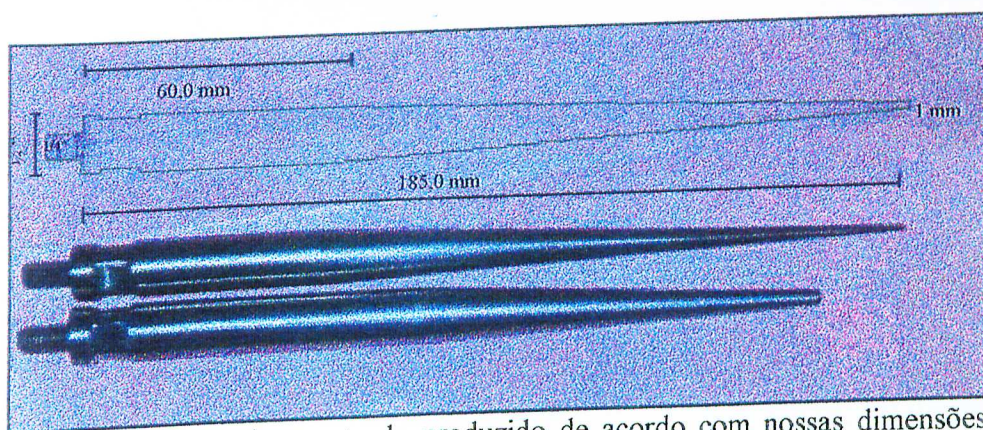


Figura 1: Modelo do sonotrodo produzido de acordo com nossas dimensões comparado com o modelo original do fabricante "Thornton" - SP.

ANEXO V

Data: ____/____/____

ELISA para detecção de IL-3, IFN- γ , GM-CSF e IL-6

PLACA I

2x diluente

Desprezar
50 μ l

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
IL-3	A		↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘		Curva padrão
IL-3	B													
amostra	C													Fase 2
amostra	D													
IFN- γ	E		↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘		Curva padrão
IFN- γ	F													
amostra	G													Fase 2
amostra	H													

PLACA II

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
GM-CSF	A		↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘		Curva padrão
GM-CSF	B													
amostra	C													Fase 1a
amostra	D													
amostra	E													Fase 1b
amostra	F													
amostra	G													Fase 2
amostra	H													

PLACA III

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
IL-6	A		↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘		Curva padrão
IL-6	B													
amostra	C													Fase 1a
amostra	D													
amostra	E													Fase 1b
amostra	F													
amostra	G													Fase 2
amostra	H													

↘ Indica diluição seriada (de um poço para o outro)



ANEXO VI

Monoclonal Anti-human IL-3 Antibody

ORDERING INFORMATION

Catalog Number: MAB203

Clone: 4806.1

Lot Number: HB02

Size: 500 µg

Formulation: 0.2 µm filtered solution in PBS

Storage: -20° C

Reconstitution: sterile PBS

Specificity: rhIL-3

Immunogen: *E. coli*-derived rhIL-3

Ig class: mouse IgG₁

Applications: Neutralization of bioactivity
Western blot
ELISA

Preparation

This antibody was produced from a murine hybridoma elicited from a mouse immunized with purified, *E. coli*-derived, recombinant human interleukin 3 (rhIL-3). The IgG fraction of ascites fluid was purified by Protein A affinity chromatography.

Formulation

Lyophilized from a 0.2 µm filtered solution in phosphate-buffered saline (PBS).

Endotoxin Level

< 10 ng per 1 mg of the antibody as determined by the LAL method.

Reconstitution

Reconstitute with sterile PBS. If 1 mL of PBS is used, the antibody concentration will be 500 µg/mL.

Storage

Lyophilized samples are stable for greater than six months when held at -20° C to -70° C. Upon reconstitution, the antibody can be stored at 2° - 4° C for at least 1 month without detectable loss of activity. Reconstituted antibody can also be aliquotted and stored frozen at -20° C to -70° C for at least six months without detectable loss of activity. **Avoid repeated freeze-thaw cycles.**

Specificity

This antibody has been selected for its ability to neutralize the biological activity of rhIL-3. The antibody will not neutralize the biological activity of rmlL-3. In direct ELISA and western blot analysis, this antibody exhibits no cross-reactivity with rmlL-3. When immobilized on a microplate, this antibody will capture both recombinant as well as natural human IL-3.

Neutralization of Human IL-3 Bioactivity

The exact concentration of antibody required to neutralize rhIL-3 activity is dependent on the cytokine concentration, cell type, growth conditions and the type of activity studied. To provide a guideline, R&D Systems has determined the neutralization dose for this antibody under a specific set of conditions. The **Neutralization Dose₅₀ (ND₅₀)** for this antibody is defined as that concentration of antibody required to yield one-half maximal inhibition of the cytokine activity on a responsive cell line, when that cytokine is present at a concentration just high enough to elicit a maximum response.

As shown in figures 1 and 2 on the next page, the ND₅₀ for this lot of anti-human IL-3 antibody was determined to be approximately 0.03 - 0.08 µg/mL in the presence of 1.25 ng/mL of rhIL-3, using the TF-1 cell line. The specific conditions are described in the figure legends.

Additional Applications

For direct ELISAs, the antibody can be used at 0.5 - 1.0 µg/mL with the appropriate secondary reagents to detect human IL-3. The detection limit for rhIL-3 is approximately 0.3 ng/well.

For western blot analysis, the antibody can be used at 1 - 2 µg/mL with the appropriate secondary reagents to detect human IL-3. The detection limit for rhIL-3 is approximately 1 ng/lane and 5 ng/lane under non-reducing and reducing conditions, respectively.

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

MAB203 1 of 2

FU-00011192-2

R&D Systems, Inc.
1-800-343-7475

2/19/99