

Mariana Perini Zendron

Imunoexpressão de células dendríticas CD1a+ e CD83+ em cistos e tumores odontogênicos

Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a conclusão do Curso de Graduação em Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Rogério de Oliveira Gondak
Coorientadora: Dr.^a Ana Guadalupe Cuellar

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zendron, Mariana Perini

Imunoexpressão de células dendríticas CD1a+ e CD83+ em cistos e tumores odontogênicos / Mariana Perini Zendron ; orientador, Rogério de Oliveira Gondak, coorientadora, Ana Guadalupe Cuellar, 2018.
22 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Cistos odontogênicos. 3. Tumores odontogênicos. 4. Células dendríticas. 5. Imuno-histoquímica. I. Gondak, Rogério de Oliveira. II. Cuellar, Ana Guadalupe. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Odontologia. IV. Título.

Mariana Perini Zendron

Imunoexpressão de células dendríticas CD1a+ e CD83+ em cistos e tumores odontogênicos

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 22 de maio de 2018.

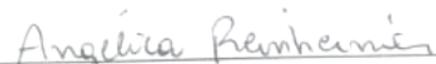
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Rogério de Oliveira Gondak
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Felipe Perozzo Daltoé
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina



Dr.ª Angelita Reinheimer
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado a Deus e Meishu-Sama e às pessoas que estiveram sempre ao meu lado, me oferecendo oportunidades de crescimento e aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Meishu-Sama pela proteção e calma nos momentos de ansiedade e preocupação.

À minha família por me nortear sempre para as atitudes éticas, especialmente à minha mãe, pelo apoio incondicional e disponibilidade de ouvir relatos do trabalho que nem sempre gostava. Obrigada ao meu pai pela troca de experiências.

Ao meu namorado, Fernando, obrigada por me apoiar, entender e sempre estar à disposição para qualquer ajuda.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, funcionários e servidores por terem proporcionado experiências maravilhosas, além de auxiliar na lapidação do meu caráter.

Agradeço o meu Orientador, Rogério de Oliveira Gondak, que desde sempre foi muito ético e correto, além de me ajudar em todos os momentos. E a minha Orientadora Ana Guadalupe Cuellar, que me ensinou com muita paciência e sempre esteve disposta a ajudar. Obrigada pelo carinho e atenção de vocês dois.

Aos professores da graduação reconheço e agradeço profundamente a presença e a orientação. Obrigada pelos sábios conselhos, eles ficarão guardados com muito carinho.

Agradeço às amigas e aos amigos, que apesar de serem todos especiais e contribuírem em alguma parte de quem eu sou hoje, sempre se disponibilizaram para ajudar onde fosse preciso.

“Que na vida cotidiana suscitemos esperança no coração das pessoas com quem lidamos, tendo por lema proceder com amor e gentileza pois a nossa felicidade depende de fazermos os outros felizes”
(Meishu-Sama, 1949)

RESUMO

As células dendríticas (CDs) são células apresentadoras de antígenos que iniciam e modulam as respostas imunes. Alterações inflamatórias e tumorais nos maxilares podem interferir na geração, maturação, função e sobrevivência das CDs. O objetivo deste estudo foi quantificar a população de CDs em cistos e tumores odontogênicos de quatro grupos distintos: cisto radicular (CR), cisto dentífero (CDg), ceratocisto odontogênico (CO) e ameloblastoma unicístico (AU). Os anticorpos CD1a e CD83 foram utilizados para identificar e quantificar CDs por imuno-histoquímica em cortes histológicos de peças cirúrgicas de quarenta e um pacientes: cistos radiculares (Grupo 1, n = 10), cistos dentíferos (Grupo 2, n = 10), ceratocistos odontogênicos (Grupo 3, n = 10) e ameloblastomas unicísticos (Grupo 4, n = 11). Os resultados foram obtidos como células positivas por área de epitélio de revestimento cístico/tumoral e tecido conjuntivo subepitelial (capsular). Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e a comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (Anova), seguida de um teste *post-hoc* de Tukey. O software estatístico SPSS versão 23.0 foi utilizado para as análises e o valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O grupo CR apresentou maior densidade de células CD1a + no tecido conjuntivo em comparação ao ameloblastoma unicístico ($P = 0,021$) enquanto CR e CDg apresentaram maior densidade de células CD83+ do que o grupo AU ($P = 0,017$ e $P = 0,040$, respectivamente). Não houve diferenças significativas entre a densidade de CDs CD1a+ e CD83+ no tecido epitelial de revestimento entre os grupos avaliados. Portanto, concluímos que a diferença na população de CDs no tecido conjuntivo pode ser influenciada pelo infiltrado inflamatório e pelo comportamento clínico distinto dessas lesões.

Palavras-chave: Cistos odontogênicos; Tumores odontogênicos; Células dendríticas; Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are antigen-presenting cells that initiate and modulate the immune responses. Inflammatory and tumoral changes in the jaws may interfere with the generation, maturation, function, and survival of DCs. The aim of this study was to quantify the population of DCs in odontogenic tumors and oral cysts from four distinct groups: radicular cyst (RC), dentigerous cyst (DgC), odontogenic keratocyst (OK) and unicystic ameloblastoma (UA). CD1a and CD83 antibodies were used to identify and quantify DCs by immunohistochemistry in histological sections of surgical specimens from forty-one patients: radicular cysts (Group 1, $n = 10$), dentigerous cysts (Group 2, $n = 10$), odontogenic keratocysts (Group 3, $n = 10$), and unicystic ameloblastomas (Group 4, $n = 11$). The results were obtained as positive cells per area of lining epithelium and subepithelial connective tissue. Values were expressed as mean \pm standard deviation (SD) and the comparison between groups was performed by analysis of variance (Anova), followed by a post-hoc Tukey test. For the analyzes a statistical software SPSS version 23.0 was used and a value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. The RC group had a higher density of CD1a+ cells in the connective tissue compared to unicystic ameloblastoma group ($P = 0.021$). RC and DgC had higher density of CD83+ cells than UA group ($P = 0.017$ and $P = 0.040$, respectively). There were no significant differences of CD1a+ and CD83+ DCs in the epithelial tissue among groups. Therefore, the differences in the DCs population in the connective tissue may be influenced by the inflammatory infiltrate and distinct clinical behavior of these lesions.

Keywords: Odontogenic cysts; Odontogenic tumors; Dendritic cells; Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Células dendríticas CD1a+ e CD83+ no tecido epitelial de revestimento e tecido conjuntivo subepitelial capsular nos cistos radiculares e cistos dentígeros.....	41
Figura 2 – Células dendríticas CD1a+ e CD83+ no tecido epitelial de revestimento e tecido conjuntivo subepitelial capsular nos ceratocistos odontogênicos e ameloblastomas unicísticos.....	42
Figura 3 – Análise comparativa das CDs CD1a+ e CD83+ nos grupos estudados.....	43
Figura 4 – Características histológicas das lesões estudadas (H&E, 40x).....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Achados clínicos e imuno-histoquímicos nos grupos estudados	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPA, APC - Célula apresentadora de antígeno, *Antigenpresentingcell*

AU, UA – Ameloblastomaunicístico, *Unicysticameloblastoma*

CD, DC - Célula dendrítica, *Dendriticcell*

DgC, CDg - Cisto dentífero, *Dentigerouscyst*

H&E - Hematoxilina & eosina

iCD, iDC - Células dendríticas imaturas, *Immaturedendriticcells*

IL - Interleucina

mCD, mDC - Células dendríticas maduras, *Mature dendriticcells*

CO, OK – Ceratocistoodontogênicos, *Odontogenicceratocyst*

LO, OL - Lesões odontogênicas, *Odontogeniclesions*

CR, RC - Cisto radicular, *Radicularcyst*

TNF - Fator de necrose tumoral

LISTA DE SÍMBOLOS

\pm - Mais ou menos

P – significância estatística

$<$ - Menor

$>$ - Maior

- Número

μ - Micrômetro

$^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

mm^2 - milímetro quadrado

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO GERAL.....	14
1.1 OBJETIVOS.....	16
<i>Objetivo geral.....</i>	16
<i>Objetivos específicos.....</i>	16
2ARTIGO.....	19
Introdução.....	20
Materiais e métodos.....	21
<i>Amostra.....</i>	21
<i>Dados clínicos.....</i>	21
<i>Processamento de tecidos.....</i>	21
<i>Imuno-histoquímica.....</i>	21
<i>Análise microscópica.....</i>	22
<i>Análise estatística.....</i>	22
Resultados.....	22
<i>Amostra.....</i>	22
<i>Resultados microscópicos.....</i>	23
<i>Quantificação das células dendríticas.....</i>	24
Discussão.....	25
Conclusão.....	28
Agradecimentos.....	28
Referências.....	28
REFERÊNCIAS GERAIS.....	31
APÊNDICE A – Metodologia Expandida.....	34
ANEXO 1– Ata de Aprovação.....	38
ANEXO 2– Aprovação do Comitê de Ética.....	39

1 INTRODUÇÃO GERAL

As lesões odontogênicas císticas inflamatórias têm origem em um desequilíbrio do sistema estomatognático que proporciona necrose do elemento dental, em decorrência de um agente invasor, acarretando lesão dos tecidos internos dentais, ou trauma externo, quando a necrose instalada for asséptica. Já as lesões odontogênicas císticas de desenvolvimento resultam de um desequilíbrio das estruturas que circundam o elemento dental, seja na sua origem, ou posteriormente (Neville, 2009).

As lesões odontogênicas císticas e tumorais têm alta prevalência na população brasileira. Segundo estudo de Jaeger e colaboradores (2017) realizado na Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG) e Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-Minas), o cisto radicular foi o cisto odontogênico mais frequente, com 2594 casos (65,85%), seguido do cisto dentígero com 978 casos (24,82%) e ceratocistoodontogênico com 268 casos (6,80%). No estudo de Nalabolu e colaboradores, (2017), na Escola de Odontologia de Vishnu, Índia, a variante unicística do ameloblastoma foi o tumor odontogênico mais prevalente, com 38 casos, representando 23,6%.

O ameloblastoma unicístico (AU) é uma neoplasia epitelial de origem odontogênica, podendo apresentar-se como variante luminal, intraluminal ou mural. O cisto radicular (CR) é oriundo dos restos epiteliais de Malassez no ligamento periodontal de um dente não vital (El-Naggar et al., 2017). Já o cisto dentígero (CDg) tem origem odontogênica devido ao acúmulo de fluido entre o epitélio reduzido do órgão do esmalte do folículo dental e a coroa de um dente incluso. O ceratocisto odontogênico (CO) tem sua origem nos remanescentes da lâmina dental que proliferam devido a mutações genéticas (El-Naggar et al., 2017).

O desequilíbrio, tanto inflamatório quanto do desenvolvimento, aflora mecanismos de resposta no corpo do hospedeiro. As células que irão responder a uma agressão são específicas para cada local, tendo em vista que cada tipo tecidual tem uma exigência imunológica distinta. Na mucosa oral, uma das principais células apresentadoras de antígenos são as células dendríticas (CDs). As CDs são originadas de precursores mielóides e linfóides e desempenham um papel essencial na criação e regulação da resposta imune inata e adquirida, incluindo a imunidade antitumoral (Garg et al., 2013).

As CDs são identificadas principalmente por testes imunohistoquímicos, utilizando marcadores específicos, como proteína S100 e anticorpos CD1a, CD207, CD208 e CD83 (Cao; Lee; Lu, 2005; Séguier et al., 2003). Estes anticorpos possibilitam identificar as CDs em diferentes estágios de maturação celular (Banchereau et al., 2000). As CDs no epitélio de revestimento encontram-se imaturas, em um estado de inativação. Quando ativadas em resposta a estímulos antigênicos, as CDs secretam citocinas pró-inflamatórias e migram para os linfonodos de drenagem, tornando-se maduras e ativadas (Merad et al., 2008).

Segundo Séguier e colaboradores (2003) os imunomarcadores para uma célula dendrítica imatura (iCDs) são CD1a e CD207, enquanto que para Banchereau e colaboradores (2000) e para Cao e colaboradores (2005), os marcadores de células dendríticas maduras (mCDs) são CD83 e CD208. O estudo de Matos et al. (2013), através de marcadores imuno-histoquímicos específicos para as mCDs e iCDs, analisou a distribuição dessas células em algumas lesões císticas odontogênicas, tais como cistos radiculares, cistos dentígeros e ceratocisto odontogênico e concluíram que a distribuição dessas CDs podem ser fenotipicamente heterogênea, o que sugere que além de uma interação das CDs com o sistema imune, existe uma relação com a manutenção e a diferenciação tecidual durante o desenvolvimento das lesões císticas odontogênicas.

A participação de CDs em tumores malignos também tem sido analisada como no estudo de Tsujitani e colaboradores (1987), que revelou que o número de CDs influencia diretamente o prognóstico de carcinomas gástricos. Devido a escassa literatura sobre o papel das CDs em lesões císticas e tumorais dos ossos gnáticos, o presente estudo pretende avaliar quantitativamente a população de CDs em quatro grupos distintos de pacientes: portadores de cistos radiculares, cistos dentígeros, ceratocistos odontogênicos e ameloblastomas unicísticos.

1.1OBJETIVOS

1.1.1Objetivo geral

O presente estudo pretende avaliar quantitativamente a população de CDs em quatro grupos distintos de pacientes: portadores de cistos radiculares (Grupo 1, n=10), cistos dentígeros (Grupo 2, n=10), ceratocistos odontogênicos (Grupo 3, n=10) e ameloblastomas unicísticos (Grupo 4, n=11).

1.1.2Objetivos específicos

a-) Revisar as lesões císticas e tumorais de acordo com os critérios da OMS (2017);

b-) Identificar e quantificar, por meio de reações imuno-histoquímicas, as CDs imaturas e maduras imunomarcadas respectivamente pelos anticorpos CD1a e CD83 em lesões císticas e tumorais dos maxilares;

c-) Correlacionar os achados clínicos dos pacientes com os achados microscópicos.

3. ARTIGO

Imunoexpressão de células dendríticas CD1a+ e CD83+ em cistos e tumores odontogênicos

Artigo a ser submetido à revista:

Journal of Oral Pathology & Medicine

Imunoexpressão de células dendríticas CD1a+ e CD83+ em cistos e tumores odontogênicos

Zendron¹, MP; Gondak², RO

-
1. Mariana Perini Zendron. Graduate student of Dental School, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil
 2. Rogério de Oliveira Gondak, DDS, MSc, PhD. Department of Pathology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil.

2ARTIGO

RESUMO

Objetivos: Quantificar a população de células dendríticas (CDs) em cistos e tumores odontogênicos de quatro grupos distintos: cisto radicular (CR), cisto dentífero (CDg), ceratocisto odontogênico (CO) e ameloblastoma unicístico (AU).

Métodos: Os anticorpos CD1a e CD83 foram utilizados para identificar e quantificar CDs por imunohistoquímica em cortes histológicos de peças cirúrgicas de quarenta e um pacientes: cistos radiculares (Grupo 1, $n = 10$), cistos dentíferos (Grupo 2, $n = 10$), ceratocistos odontogênicos (Grupo 3, $n = 10$) e ameloblastomas unicísticos (Grupo 4, $n = 11$).

Resultados: Os resultados foram expressos como células positivas por área de epitélio de revestimento cístico/tumoral e tecido conjuntivo subepitelial (capsular). Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e a comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (Anova), seguida de um teste *post-hoc* de Tukey. O *software* estatístico SPSS versão 23.0 foi utilizado para as análises e o valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O grupo CR apresentou maior densidade de células CD1a + no tecido conjuntivo capsular em comparação ao ameloblastoma unicístico ($P = 0,021$) enquanto CR e CDg apresentaram maior densidade de células CD83+ do que grupo AU ($P = 0,017$ e $P = 0,040$, respectivamente). Não houve diferenças significativas entre os grupos quando o tecido epitelial de revestimento foi avaliado com ambos os anticorpos.

Conclusão : Conclui-se que a diferença na população de CDs no tecido conjuntivo pode ser influenciada pelo infiltrado inflamatório e pelo comportamento clínico distinto dessas lesões.

Palavras-chave: Cistos odontogênicos; Tumores odontogênicos; Células dendríticas; Imunohistoquímica.

Introdução

Os cistos radiculares (CR) têm origem inflamatória e se localizam no ápice de dentes com necrose pulpar¹. Sua origem epitelial é proveniente dos restos epiteliais de Malassez, que proliferam sob estímulos inflamatórios e dão origem ao epitélio cístico². O ceratocisto odontogênico (CO)³ é uma lesão importante, considerando sua recidiva após a remoção cirúrgica e seu comportamento com rápido crescimento, além de promover invasão do tecido ósseo⁴. Seu crescimento ocorre devido a proliferação de células da lâmina dental, as quais se multiplicam devido à mutações genéticas (PTCH1)⁵. El-Naggar et al. (2017)⁵ afirmaram que, apesar de sua origem não ser totalmente esclarecida, o acúmulo de fluídos entre o epitélio reduzido do órgão do esmalte do folículo dental associado a coroa de um dente não erupcionado é a patogenia do cisto dentífero (CDg). O ameloblastoma unicístico (AU) é considerado um tumor benigno originário do epitélio odontogênico e do órgão reduzido do esmalte⁶ podendo apresentar proliferação luminal, intraluminal e mural, sendo a última variante considerada com pior prognóstico e necessitar de tratamento mais invasivo⁵.

Alterações na estrutura tecidual das lesões odontogênicas resultam em resposta inflamatória local mediada pelas células apresentadoras de antígenos (CPA), uma vez que as células dendríticas⁷ desempenham um papel único e essencial nesse ciclo, ativando os linfócitos B e T através de diferentes mecanismos⁸. As CDs são classificadas como imaturas (iCDs)⁹ e CDs maduras (mCDs)^{10,11}.

As iCDs têm expressão do anticorpo CD1a em sua superfície e podem ser identificados no epitélio cístico/tumoral odontogênico. Essas células são responsáveis pela fagocitose e processamento dos antígenos, enquanto as mCDs são imunomarcadas com o anticorpo CD83 e têm o papel de ativar os linfócitos B e T¹⁰. As CDs também são encontradas em COs e CDgs e têm sido relacionadas não apenas com a resposta imune local, mas também com diferenciação e proliferação do tecido epitelial¹².

O objetivo deste estudo foi identificar e quantificar mCDs e iCDs no parênquima e estroma de CR, CDg, CO e AU bem como, correlacionar essa densidade com as diferentes alterações patológicas nestes grupos.

Materiais e métodos

Esta pesquisa tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina (CEP-UFSC) em convênio com o Conselho Nacional de Saúde # 42095715.1.0000.0121(Anexo A).

Amostra

Cistos e tumores odontogênicos biopsiados em 41 pacientes foram utilizados para o estudo. As amostras foram coletadas entre 2006 e 2017 no Laboratório de Patologia Oral da Universidade Federal de Santa Catarina. Em 10 pacientes, o diagnóstico foi CR, 10 eram CDgs, 10 eram CO e 11 eram AU.

Dados clínicos

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos a partir dos prontuários e exames anatomopatológicos. Pacientes com outras neoplasias, doenças autoimunes ou imunossupressão foram excluídos do estudo.

Processamento de tecidos

Três cortes transversais das amostras das lesões estudadas (CRs, CDgs, COs e AUs) foram obtidas, incluídas em parafina com seções de 3 µm de espessura. As lâminas foram submetidas à coloração de hematoxilina e eosina (H & E) e reações de imuno-histoquímica.

Imuno-histoquímica

Reações IH foram realizadas para identificar CDs imaturas e maduras, respetivamente, através da expressão dos anticorpos monoclonais CD1a (010, 1: 100; Dako, Carpinteria, CA) e CD83 (1H4b, 1:80; Novocastra, Newcastle, UK). Posteriormente à incubação dos anticorpos primários, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário (EnVision+System-HRPLabeled Polymer Anti-Rabbit; Dako, Carpinteria, CA) durante 60 min à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram tratados com substrato cromogênico durante 4 min (K3468, DAB, Califórnia, EUA). As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Carazzi. Controles negativos foram realizados para cada reação, omitindo os anticorpos primários.

Análise Microscópica

A quantificação das CDs imaturas e maduras foi realizada utilizando um microscópio de luz (Carl Zeiss, Berlim, Alemanha) com uma ocular x40. As células positivas foram contabilizadas para cada um dos dois anticorpos em cinco campos sequenciados no revestimento epitelial e cinco campos sequenciados no tecido conjuntivo subepitelial capsular de cistos e tumores odontogênicos utilizando o software NIH ImageJ 1.51j8 (National Institutes of Health, Maryland, EUA). Os resultados foram expressos como células positivas por área de epitélio de revestimento ou tecido conjuntivo subepitelial da cápsula cística/tumoral (células/mm²).

Análise Estatística

Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e a comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (Anova), seguida de um teste *post-hoc* de Tukey. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O software estatístico SPSS versão 23.0 foi utilizado para as análises.

Resultados

Amostra

Houve um predomínio do sexo feminino nos grupos estudados (5M: 5F, 4M: 6F e 3M: 7F para CR, CDg e CO, respectivamente). No grupo AU a proporção de gênero foi de 3 homens e 8 mulheres. Em todos os grupos, a maior incidência das lesões foi na mandíbula posterior. Quando comparamos a idade, os cistos odontogênicos apresentaram a média de incidência próxima ao AUs, com predomínio entre a 2^a e 4^a décadas de vida. Dados adicionais referentes à idade e sexo dos pacientes são mostrados na Tabela 1.

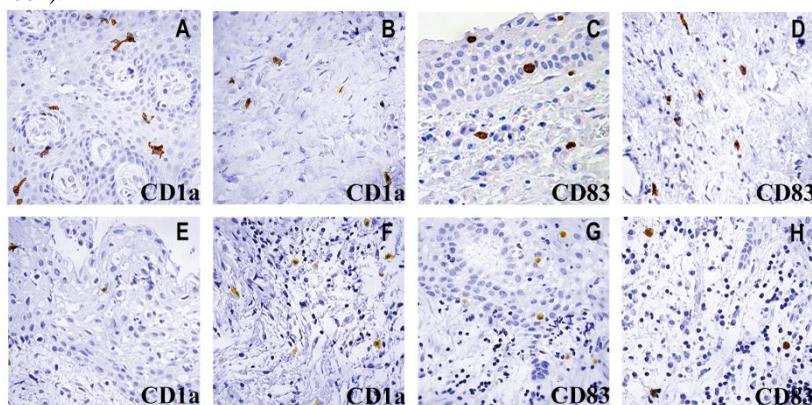
Tabela 1. Achados clínicos e imunohistoquímicos nos grupos estudados: idade (média±desvio padrão), relação homem:mulher, células CD1a+ no revestimento epitelial e no tecido conjuntivo subepitelial capsular, células CD83+ no revestimento epitelial e no tecido conjuntivo subepitelial capsular.

Grupo	Idade (Anos)	Sexo (M:F)	CD1a+ Epitélio Revestimento	CD1a+ Conjuntivo Subepitelial	CD83+ Epitélio Revestimento	CD83+ Conjuntivo Subepitelial
Cisto radicular (n=10)	47,7 ± 14,1	5M:5F	45,2 ± 39,7	174,9 ± 131	36,5 ± 22,9	173,8 ± 123,7
Cisto dentígero (n=10)	23,2 ± 13,4	4M:6F	45,7 ± 52,5	151,1 ± 122,9	35,5 ± 40,6	60,3 ± 61,1
Ceratocistodontogênico (n=10)	34,2 ± 15,7	3M:7F	15,5 ± 10,5	89,5 ± 76,2	12,6 ± 15,2	67,9 ± 103,8
Ameloblastom aunicístico (n=11)	30 ± 14,8	3M:8F	39,2 ± 37	36,1 ± 34	17,8 ± 16	45,7 ± 34,1

Resultados microscópicos

Em todos os grupos, as células CD1a + apresentavam múltiplas extensões dendríticas localizadas principalmente na camada suprabasal do epitélio. As células CD83 + tinham morfologia ovóide com menos extensões dendríticas e localizadas em maior número no tecido conjuntivo subepitelial capsular, como pode ser observado nas Figuras 1 e 2.

Figura 1. A,B Células dendríticas CD1a+ no tecido epitelial de revestimento e tecido conjuntivo subepitelial capsular em cistos radiculares, respectivamente. C,D Células dendríticas CD83+ no tecido epitelial de revestimento e tecido conjuntivo subepitelial capsular em cistos radiculares, respectivamente. E,F Células dendríticas CD1a+ no tecido epitelial de revestimento e tecido conjuntivo subepitelial capsular em cistos dentígeros, respectivamente. G,H Células dendríticas CD83+ no tecido epitelial de revestimento e tecido conjuntivo subepitelial capsular em cistos dentígeros, respectivamente (aumento 400x).

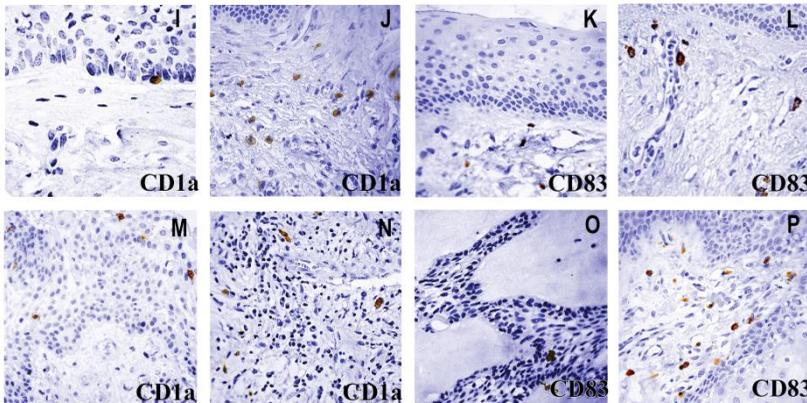


Quantificação de células dendríticas

Células CD1a+

Maior número de CDs foi encontrado em CRs e CDgs, seguido de menor densidade em AUs e COs. A densidade média de células CDa+ no tecido conjuntivo subepitelial capsular no grupo AU foi significativamente menor do que CR ($P = 0,021$). A densidade das células CD1a+ no revestimento epitelial não foi estatisticamente relevante ($P > 0,337$) entre todos os grupos estudados.

Figura 2. A,B Células dendríticas CD1a+ no tecido epitelial de revestimento e tecido conjuntivo subepitelial capsular em ceratocistos odontogênicos, respectivamente. C,D Células dendríticas CD83+ no tecido epitelial de revestimento e tecido conjuntivo subepitelial capsular em ceratocistos odontogênicos, respectivamente. E,F Células dendríticas CD1a+ no tecido epitelial de revestimento e tecido conjuntivo subepitelial capsular em ameloblastomas unicísticos, respectivamente. G,H Células dendríticas CD83+ no tecido epitelial de revestimento e tecido conjuntivo subepitelial capsular em ameloblastomas unicísticos, respectivamente (aumento 400x).

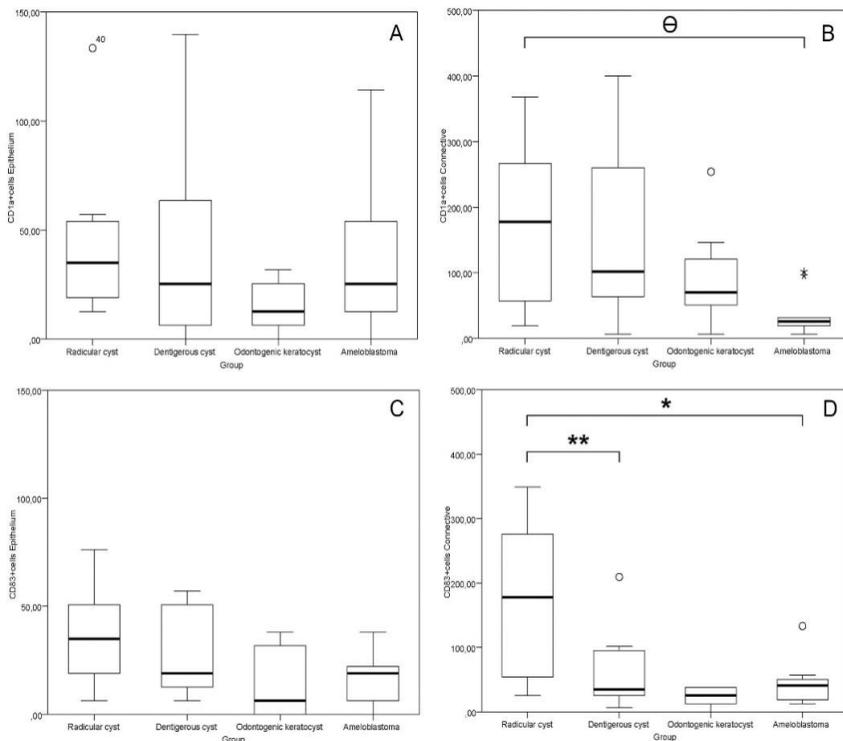


Células CD83+

Foi observado que similarmente à densidade no anticorpo CD1a, a contagem de células foi similar em CRs e CDgs, e menor em AUs e COs. A densidade média de células CD83+ no tecido conjuntivo subepitelial capsular do grupo CR foi significativamente maior do que os grupos CDg e AU ($P = 0,040$ e $P = 0,017$, respectivamente). A densidade de células CD83+ no revestimento do epitélio não teve

diferença estatística significativa ($P > 0,213$) entre os diferentes grupos. Dados adicionais são mostrados na Tabela 1 e Figura 3.

Figura 3. Análise comparativa do número de células CD1a+ e CD83+ entre os grupos estudados. A. CDs CD1a+ no tecido epitelial de revestimento. B. CDs CD1a+ no tecido conjuntivo subepitelial capsular; $\Theta P = 0,021$. C. CDs CD83+ no tecido epitelial de revestimento. D. CDs CD83+ no tecido conjuntivo subepitelial capsular; $*P = 0,040$ e $**P = 0,017$.



Discussão

As CDs são amplamente distribuídas no sangue, órgãos linfóides, membranas mucosas e pele representando uma família de células que apresentam antígenos capazes de interagir com os linfócitos T e B e modular suas respostas¹³⁻¹⁵. As CDs desempenham um papel essencial na criação e regulação da resposta imune inata e adquirida, incluindo a imunidade antitumoral^{15, 16}

Em nosso estudo, evidenciamos que a distribuição das CDs foi maior no tecido conjuntivo capsular do que no tecido epitelial nos grupos estudados. A presença de iCDs foi maior no tecido conjuntivo de CRs, seguida por CDgs, COs e AUs. Nossos achados concordam com Matos et al., 2013¹², em que células CD1a+ foram identificadas em maior número no tecido conjuntivo de CRs, CDgs e COs. Além disso, quando observamos a densidade de mCDs, o mesmo estudo¹³ assemelha-se aos nossos achados, ou seja, as células CD83+ foram encontradas principalmente no tecido conjuntivo capsular dos grupos analisados. Entretanto, os CRs apresentaram a maior quantidade de CD83+ quando comparados aos demais grupos.

De acordo com Gemmell et al., 2002¹⁷, a densidade das células CD83+ era consideravelmente maior que as células CD1a+ no tecido conjuntivo dos tecidos com doença periodontal humana. Em concordância com Matos e colaboradores, 2013¹² e Gemmell e colaboradores, 2002¹⁷, nosso estudo mostrou que na maioria dos grupos estudados (CRs, CDgs e COs), embora não tenha havido diferença estatística, a densidade de células CD1a+ foi maior no tecido conjuntivo subepitelial capsular do que no epitélio de revestimento cístico da população estudada. Revelamos que a densidade de CDs CD1a+ no tecido conjuntivo de CRs foi significativamente maior quando comparada a AUs ($P = 0,021$). Da mesma forma, os CRs apresentaram maior densidade de células CD83+ no epitélio de revestimento cístico quando comparados aos pacientes com AUs e CDgs ($P = 0,04$ e $P = 0,017$, respectivamente).

A maior densidade de CDs nos cistos radiculares em comparação aos outros cistos e tumores estudados pode estar relacionada aos mediadores inflamatórios envolvidos. Santos e colaboradores, em 2007¹⁴, observaram que as células dendríticas estavam presentes principalmente em lesões que apresentavam infiltrado inflamatório intenso ou moderado, como cistos radiculares e granulomas dentais. Esses mediadores inflamatórios como interleucina1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e prostaglandina E2, são comumente encontrados em lesões periapicais¹⁸ responsáveis pela estimulação da maturação das células dendríticas¹⁰. No processo de envelhecimento ocorre um aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6¹⁹, que culmina com uma maior ativação das CDs²⁰⁻²². Entretanto, o aumento da ativação das CDs não significa que haverá maior efetividade no processo de apresentação do antígeno, ao contrário, ocorre uma mudança na capacidade de captação do antígeno²³. Cruchley e colaboradores em

1994²⁴mostraram que o aumento na densidade de CDs pode estar relacionado ao fato dos idosos serem mais suscetíveis ao desenvolvimento de doenças na mucosa bucal, contudo, na maioria das vezes, a densidade de CDs diminui com o processo de envelhecimento. Contudo, o nosso estudo não revelou interferência da variação de idade na densidade de CDs tanto maduras como imaturas. Quando analisamos o epitélio de revestimento cístico de AUs e COs, a presença de CDs CD83+ foi menor do que em CRs e CDgs. Esse achado pode ser explicado pelo fato de essas lesões odontogênicas (AUs e COs) não terem um infiltrado inflamatório relevante¹⁹. A baixa taxa de células dendríticas pode estar relacionada ao comportamento localmente invasivo de algumas lesões odontogênicas, como a AU⁷. Com a menor secreção de estímulos quimiotáticos ou a inibição desses estímulos quimiotáticos pelas células metaplásicas, as CDs seriam incapazes de completar ou mesmo realizar a apresentação de antígenos. Quanto aos CDgs, são cistos odontogênicos originados do folículo pericoronário e, portanto, são considerados como cistos de desenvolvimento. Por essa razão, assim como a AUs, não há associação inflamatória, a menos que a lesão seja secundariamente infectada²⁵. Em nosso estudo, a densidade de CDs nos CDgs foi consideravelmente menor do que a encontrada nos CRs quando avaliadas as células CD83+ no tecido conjuntivo subepitelial capsular. No revestimento epitelial cístico, no entanto, a quantidade de CDs CD1a+ foi similar ($45,2 \pm 39,7$ e $45,7 \pm 52,5$ para CRs e CDgs, respectivamente), o que concorda com Banchereau (1998)⁸ que afirma que a presença de mediadores inflamatórios favorece a maturação das CDs. A densidade de células CD83+ no epitélio de revestimento do grupo CO foi semelhante ao grupo de AUs, embora não tenha sido estatisticamente significativa. Isso pode acontecer devido à semelhança de origem dos AUs e COs, que são lesões de desenvolvimento, com pouco infiltrado inflamatório adjunto²⁶, com comportamento agressivo e alta taxa de recorrência²⁷. Segundo o estudo de Wu et al. (2013)²⁸, embora as CDs geralmente não sejam encontradas na cápsula cística, elas são descobertas em maior número quando o tecido conjuntivo dessas lesões tem um processo inflamatório. O prognóstico dessas lesões odontogênicas é diverso, entretanto, a relação de números de células dendríticas pode influenciar positivamente para uma melhor resolução das lesões. Segundo Matos et al. (2013)¹², as CDs são importantes apresentadoras de antígenos, e cistos radiculares com maior número de células dendríticas geralmente apresentam melhor prognóstico. Quando as CDs são observadas em grande número nas diferentes lesões odontogênicas, isso indica um

melhor prognóstico ⁷. Além disso, essa relação das CDs com prognóstico também tem sido mostrado em tumores malignos como o carcinoma gástrico²⁹.

Como limitações para este estudo, ressaltamos que informações clínicas a longo prazo, como taxa de recidivas ou recorrências das lesões odontogênicas não obtidas no corrente estudo poderiam oferecer valiosas contribuições para a complementação dos resultados da pesquisa.

Conclusão

Concluimos que a alta densidade de células dendríticas nos cistos radiculares pode estar associada a presença de infiltrado inflamatório adjuvante. Além disso, a diminuição de CDs no tecido conjuntivo de cistos e tumores odontogênicos pode ser influenciada pelo comportamento clínico distinto destas lesões. Outros estudos que analisem essas lesões a longo prazo podem contribuir para um melhor entendimento da etiopatogenia dessas lesões e variável distribuição das CDs.

Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio do Governo Federal Apoio à Pesquisa (CAPES nº 458601/2014-4) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Não houve conflitos de interesse. Os autores agradecem à técnica Gilmar Lemos pela assistência na coleta de material.

Referências

1. Nair PN. New perspectives on radicular cysts: do they heal? *Int Endod J.* 1998. doi:10.1046/j.1365-2591.1998.00146.x.
2. Malassez, L. Sur l'existence de masses epitheliales dans ligament alveolo-dentaire chez l'homme adulte et a l'etat normal. *Comptes Rendus Societe de Biologie.*; 1884.
3. Wright JM, Vered M. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumors. *Head Neck Pathol.* 2017. doi:10.1007/s12105-017-0794-1

4. Singh M, Gupta KC. Surgical treatment of odontogenic keratocyst by enucleation. *Contemp Clin Dent*. 2010. doi:10.4103/0976-237X.76398.
5. El-Naggar AK, Chan JKC, Rubin Grandis J, Takata T, Slootweg PJ. *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 2017.
6. Nagi R, Sahu S, Rakesh N. Molecular and genetic aspects in the etiopathogenesis of ameloblastoma: An update. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2016. doi:10.4103/0973-029X.190954.
7. Mello LA, Figueiredo AL, Ramos EAG, et al. CD1a-positive Langerhans cells and their relationship with E-cadherin in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med*. 2013. doi:10.1111/jop.12033.
8. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998. doi:10.1038/32588.
9. Séguier S, Bodineau A, Godeau G, Pellat B, Brousse N. Langerin+ versus CD1a+ Langerhans cells in human gingival tissue: A comparative and quantitative immunohistochemical study. *Arch Oral Biol*. 2003. doi:10.1016/S0003-9969(02)00173-5.
10. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
11. Cao W, Lee SH, Lu J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J*. 2005. doi:10.1042/BJ20040741.
12. Matos FTC, Rizo VHT, Almeida LY, et al. Immunophenotypic characterization and distribution of dendritic cells in odontogenic cystic lesions. *Oral Dis*. 2013. doi:10.1111/j.1601-0825.2012.01960.x.
13. Keller R. Dendritic cells: Their significance in health and disease. *Immunol Lett*. 2001. doi:10.1016/S0165-2478(01)00247-4.
14. Santos LC, Ramos EAG, Gurgel CAS, De Santana EJB, Dos Santos JN. Immunohistochemical detection of Langerhans cells in dental granulomas and radicular cysts. *J Mol Histol*. 2007. doi:10.1007/s10735-007-9088-3.
15. Garg NK, Dwivedi P, Prabha P, Tyagi RK. RNA pulsed dendritic cells: An approach for cancer immunotherapy. *Vaccine*. 2013. doi:10.1016/j.vaccine.2012.12.027.
16. Perez L, Shurin MR, Collins B, Kogan D, Tourkova IL, Shurin G V. Comparative analysis of CD1a, S-100, CD83, and CD11c

- human dendritic cells in normal, premalignant, and malignant tissues. *Histol Histopathol*. 2005. doi:10.14670/HH-20.1165.
17. Gemmell E, Carter CL, Hart DNJ, Drysdale KE, Seymour GJ. Antigen-presenting cells in human periodontal disease tissues. *Oral Microbiol Immunol*. 2002. doi:10.1034/j.1399-302X.2002.170609.x.
 18. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004. doi:10.1177/154411130401500604.
 19. Panda A, Qian F, Mohanty S, et al. Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J Immunol*. 2010. doi:10.4049/jimmunol.0901022.
 20. Boren E, Gershwin ME. Inflamm-aging: autoimmunity, and the immune-risk phenotype. *Autoimmun Rev*. 2004.
 21. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S. Human immunosenescence: The prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine*. 2000. doi:10.1016/S0264-410X(99)00513-7.
 22. Brüünsgaard H, Pedersen BK. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2003. doi:10.1016/S0889-8561(02)00056-5.
 23. Jonuleit H, Kühn U, Müller G, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol*. 1997. doi:10.1002/eji.1830271209.
 24. Cruchley T, Williams DM, Farthing PM, et al. Langerhans cell density in normal human oral mucosa and skin: relationship to age, smoking and alcohol consumption. *J Oral Pathol Med*. 1994.
 25. Benn A, Altini M. Dentigerous cysts of inflammatory origin A clinicopathologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996. doi:10.1016/S1079-2104(96)80416-1.
 26. Sloopweg PJ. Lesions of the jaws. *Histopathology*. 2009. doi:10.1111/j.1365-2559.2008.03097.x.
 27. Marques JAF, Neves JL, Alencar DA, et al. Ceratocisto odontogênico: relato de caso. *Sitientibus*.2006.
 28. Wu YC, Wang YP, Chang JYF, Chiang CP. Langerhans cells in the lining epithelia of odontogenic cysts. *J Formos Med Assoc*. 2013. doi:10.1016/j.jfma.2013.07.013.

29. Tsujitani S, Furukawa T, Tamada R, et al. Langerhans cells and prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer*. 1987.

REFERÊNCIAS GERAIS

BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of Dendritic Cells. **Annual review of immunology**, v. 18, n. 1, p. 767–811, 2000.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245, 1998.

CAO, W.; LEE, S. H.; LU, J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. **Biochemical Journal**, v. 385, n. Pt 1, p. 85–93, 1 jan. 2005.

CRUCHLEY, A. T. et al. Langerhans cell density in normal human oral mucosa and skin: relationship to age, smoking and alcohol consumption. *Journal of oral pathology & medicine*, v. 23, n. 2, p. 55-59, 1994.

EL-NAGGAR, A. K.; CHAN, J. K. C.; RUBIN GRANDIS, J.; TAKATA, T.; SLOOTWEG, P. J. **WHO Classification of Head and Neck Tumours**. 2017

GARG, N. K. et al. RNA pulsed dendritic cells: an approach for cancer immunotherapy. **Vaccine**, v. 31, n. 8, p. 1141-56, Feb 2013.

JAEGER, F. Prevalence profile of odontogenic cysts and tumors on Brazilian sample after the reclassification of odontogenic keratocyst. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 45, n. 2, p. 267-270, 2017.

KATCHBURIAN, E; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral: Texto - Atlas - Correlações Clínicas**. 2. ed. Rio de Janeiro, Rj: Guanabara Koogan S.a., 2004. 372 p.

KELLER, R. Dendritic cells: their significance in health and disease. **Immunol Lett**, v. 78, n. 3, p. 113-22, Oct 2001.

KORENBERG, R. et al. Quantitation of S100 protein-positive cells in inflamed and non-inflamed keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. **Journal of cutaneous pathology**, v. 15, n. 2, p. 104–108, abr. 1988.

LEIDER, A. S.; EVERSOLE, L. R.; BARKIN, M. E. Cystic ameloblastoma: a clinicopathologic analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 60, n. 6, p. 624-630, 1985.

MALASSEZ M. L. Surl'existence de massesépithélialesdansleligamentalvéolodentaire chez l'hommeadulte et à l'état normal. **Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales** 36, 241–4.1884.

MATOS, F. T. C. et al. Immunophenotypic characterization and distribution of dendritic cells in odontogenic cystic lesions. **Oral diseases**, v. 19, n. 1, p. 85–91, jan. 2013.

MELLO, L. A., et al. CD1a-positive Langerhans cells and their relationship with E-cadherin in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 42, n. 6, p. 454-461, 2013.

NAGI, R.; SAHU, S.; RAKESH, N. Molecular and genetic aspects in the etiopathogenesis of ameloblastoma: An update. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, v. 20, n. 3, p. 497, 2016.

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

NAIR, P. N. R. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists**, v. 15, n. 6, p. 348–381, 1 nov.

2004.

NALABOLU, G. R. K., et al. Epidemiological study of odontogenic tumours: An institutional experience. **Journal of infection and public health**, v. 10, n. 3, p. 324-330, 2017.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3. ed. Rio de Janeiro, Rj: Elsevier, 2009. 972 p.

PEREZ, L. et al. Comparative analysis of CD1a, S-100, CD83, and CD11c human dendritic cells in normal, premalignant, and malignant tissues. **Histology and histopathology**, v. 20, n. 4, p. 1165-1172, 2005.

REGEZI, J. A. Odontogenic cysts, odontogenic tumors, fibrous, and giant cell lesions of the jaws. **Modern Pathology**, v. 15, n. 3, p. 331, 2002.

SÉGUIER, S. et al. Langerin versus CD1a Langerhans cells in human gingival tissue: a comparative and quantitative immunohistochemical study. **Archives of oral biology**, v. 48, n. 4, p. 255–262, 2003.

TSUJITANI, S. et al. Langerhans cells and prognosis in patients with gastric carcinoma. **Cancer**, v. 59, n. 3, p. 501–505, 1 fev. 1987.

WRIGHT, J. M.; VERED, M. Update from the 4th edition of the world health organization classification of head and neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumors. **Head and neck pathology**, v. 11, n. 1, p. 68-77, 2017.

APÊNDICE A – Metodologia Expandida

Seleção das amostras de pacientes

Os pacientes envolvidos neste projeto responderam ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou TCLE com o objetivo de autorizar a coleta das informações clínicas e histopatológicas presentes nos laudos anatomopatológicos bem como acesso ao material tecidual emblocado em parafina coletado. Casos com amostra insuficiente emblocada em parafina que impossibilitaram novos cortes para imuno-histoquímica foram excluídos do estudo. Peças cirúrgicas de cistos e tumores odontogênicos de 41 pacientes foram utilizados para o estudo. As amostras foram coletadas entre 2006 e 2017 no Laboratório de Patologia Oral da Universidade Federal de Santa Catarina. Em 10 pacientes, o diagnóstico foi CR, 10 eram CDgs, 10 eram CO e 11 eram AU. Todos os casos selecionados foram revisados através das lâminas histológicas coradas em H&E e utilizadas para o diagnóstico. Os critérios utilizados foram baseados na classificação da OMS (2017). Na Figura 4 seguem as imagens histopatológicas em H&E referentes aos grupos estudados.

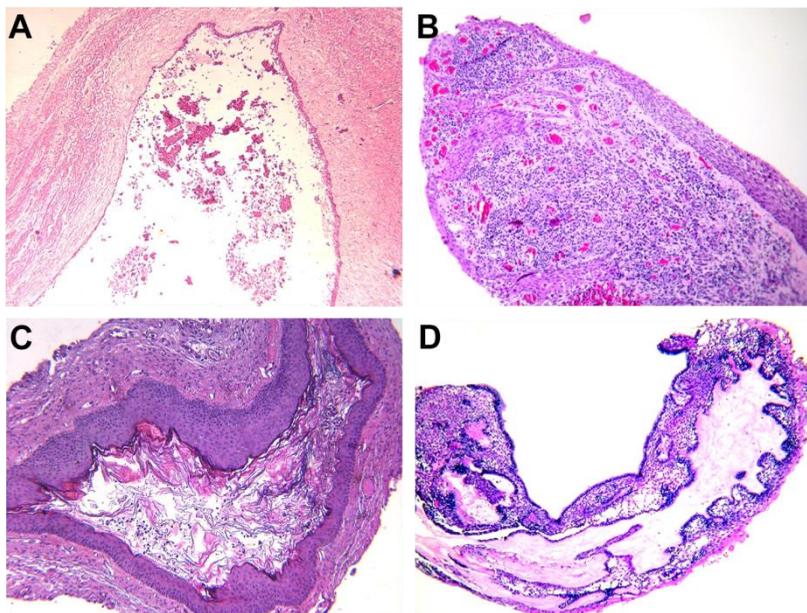
Dados clínicos

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos a partir dos prontuários e exames anatomopatológicos. Pacientes em que as informações clínicas eram insuficientes como por exemplo idade e gênero, ou localização anatômica, foram também excluídos do estudo.

Processamento de tecidos

Três cortes transversais das peças das lesões estudadas (CRs, CDgs, COs e AUs) foram obtidos, incluídos em parafina com seções de 3 µm de espessura. As lâminas foram submetidas à coloração de hematoxilina e eosina (H&E) e imuno-histoquímica.

Figura 4. A Cisto radicular com revestimento epitelial composto de epitélio pavimentoso estratificado com poucas camadas de células ecápsula de tecido conjuntivo fibroso denso permeada por moderado infiltrado inflamatório crônico. B Cisto dentígeros com fina camada de revestimento epitelial pavimentoso estratificado e região subepitelial capsular com infiltrado inflamatório. C Ceratocisto odontogênico composto de epitélio pavimentoso estratificado exibindo intensa paraceratinano interior da cavidade cística. D Ameloblastoma unicístico com tecido epitelial com aspecto ameloblásticoe camada de células basais com núcleos hiper cromáticos (H&E, magnificação 40x).



Imuno-histoquímica

Os anticorpos CD1a e CD83 utilizados nesta pesquisa foram submetidos a um processo de padronização para determinar as concentrações ideais de acordo com as instruções dos fabricantes.

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Bucal da UFSC para identificação das CDs imaturas (anti-

CD1a) e maduras (anti-CD83). Para cada reação imuno-histoquímica foi obtida uma seção de 3µm de espessura dos blocos de parafina das amostras selecionadas e colocadas em lâminas silanizadas.

As lâminas foram colocadas em uma estufa a uma temperatura entre 50 e 70°C por 1 hora e após 10 min em temperatura ambiente, os cortes teciduais foram colocados numa cuba de vidro contendo xilol durante a noite anterior a reação. A próxima etapa consistiu na hidratação dos cortes em banhos decrescentes de etanol (100%, 95% e 85%). Após, duas lavagens com água destilada foram realizadas durante 5 min. O bloqueio da peroxidase endógena foi feita com solução de álcool metílico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 20 volumes. Em câmara escura, dois banhos de 20 e 10 minutos foram realizados. Em seguida, duas lavagens de 5 minutos com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 7,4) e água destilada foram aplicadas. A recuperação antigênica foi realizada por imersão das lâminas em solução de tampão citrato a 10% diluído com água destilada num banho-maria a 96 °C por 40 minutos. Depois disso, a cuba contendo as lâminas foi retirada do banho-maria e mantida em TA por 30 minutos. Os cortes foram lavados duas vezes com PBS durante 5 minutos. O bloqueio das ligações não específicas foi feito incubando as lâminas em solução contendo 100ml de PBS e 5g de leite em pó por 40 minutos. Após este tempo, as lâminas foram lavadas novamente duas vezes com PBS por 5 minutos antes da incubação do anticorpo primário.

As seções foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em PBS, em câmara úmida por 18 horas a 4 °C. Após a incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas em PBS (2 vezes) e incubadas com o anticorpo secundário EnVision Dual Link System-HRP (Dako, California, EUA) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS (2 vezes). A seguir, os cortes foram tratados com substrato de cromôgeno (DAB, Dako, California, USA) que consistiu em adicionar 1 gota (ou 20 µL) do cromôgeno em 1mL de tampão. De 50 a 100 µL (dependendo do tamanho da amostra) desta solução foram colocados acima dos tecidos durante 4 minutos. Após o tempo, as lâminas foram colocadas em água destilada (2 banhos de 5 minutos).

As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Carazzi por 3 minuto e lavadas em água corrente. A remoção do pigmento fórmico foi feita com 3 imersões rápidas em solução aquosa de hidróxido de amônio a 1% e após, as lâminas foram lavadas com água corrente por 2 minutos. A desidratação dos tecidos foi feita em concentrações crescentes de etanol (85%, 95% e 100%). A diafanização foi feita com 2

imersões de 20 minutos em xilol. Finalmente, a montagem das lâminas foi feita com Entellan®. Um controle negativo foi incluído em cada reação IH, omitindo o anticorpo primário. Na padronização dos anticorpos foi utilizado um controle positivo de acordo com as recomendações do fabricante.

Análise Microscópica

A quantificação das CDs imaturas e maduras foi realizada utilizando um microscópio de luz (Carl Zeiss, Berlim, Alemanha) com uma ocular x40. As células positivas foram contabilizadas para cada um dos dois anticorpos em cinco campos sequenciados no revestimento epitelial e cinco campos sequenciados no tecido conjuntivo subepitelial capsular de cistos e tumores odontogênicos utilizando o *software* NIH ImageJ 1.51j8 (National Institutes of Health, Maryland, EUA).

Antes da quantificação das lâminas da pesquisa, foi realizada a calibração da contagem e a posterior conferência através do teste Kappa para conferência inter-observadores (MPZ, ROG). Após obtenção do escore 0,85 de concordância, iniciou-se o processo de contagem. Os resultados foram expressos como células positivas por área de epitélio de revestimento ou tecido conjuntivo subepitelial da cápsula cística/tumoral (células/mm²).

ANEXO 1 – Ata de Apresentação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Às 22 horas do mês de maio de 2018 às 14:30 horas, em sessão pública na Sala 910 do CCS desta Universidade, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Dr. Rogério de Oliveira Gondak e pelos examinadores:

1 - Prof. Dr. Felipe Pennzo Dalbo

2 - Drª. Angelica Reinheimer

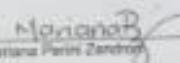
e aluna Mariana Perin Zandron apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado:

Expressão de células dendríticas CD1a+ e CD83+ em dentes e linfonos odontogênicos como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e à integralização do Curso de Graduação em Odontologia. A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, delibera e decide pelo APPROVAÇÃO do referido Trabalho de Conclusão do Curso, divulgando o resultado formalmente ao aluno e aos demais presentes, e eu, na qualidade de presidente da Banca, lavro a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo aluno orientado.


Prof. Dr. Rogério de Oliveira Gondak
Presidente da Banca Examinadora


Prof. Dr. Felipe Pennzo Dalbo
Examinador 1


Drª. Angelica Reinheimer
Examinador 2


Mariana Perin Zandron
Aluno

ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética



CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONEP BIOBANCO Nº 011/2016

Registro CONEP B-051 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este biobanco)

Processo nº 25000.237810/2014-54

Instituição responsável: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Instituições participantes: —

Responsável(is) Institucional(is): Dra. Eliana Riet Correa Rivero

CEP de origem: Universidade Federal de Santa Catarina

Sumário geral do protocolo

Tipo de material biológico: tecido, células, sangue, saliva

Requisito interno:

- Quanto à composição dos membros responsáveis pelo biobanco: A composição dos membros responsáveis pelo *Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (LPB/UFSC)* seguirá as seguintes recomendações: Um docente coordenador e um sub-coordenador com reconhecida experiência em desenvolvimento de pesquisa, pertencentes ao Departamento de Patologia da UFSC e que sejam membros permanentes do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFSC. O coordenador e o sub-coordenador serão escolhidos pelos docentes do Departamento de Patologia da UFSC que forem membros permanentes do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFSC, escolhidos por votação, durante reunião específica para esse fim. A duração do mandato do coordenador e do sub-coordenador do Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC será de 2 anos, podendo os mesmos serem reconduzidos. A escolha será feita pelos membros do departamento de Patologia que forem credenciados como membros permanentes ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFSC.

- Quanto à captação das amostras biológicas e potenciais consentidores: Os potenciais consentidores de material biológico ao Biobanco serão indivíduos que tiverem alguma lesão no complexo buco-maxilo-facial ou região de cabeça e pescoço, em que foi necessário procedimento de biópsia ou remoção completa da lesão para estabelecimento do diagnóstico definitivo ou tratamento, cujo material tenha sido processado e o laudo liberado pelo Laboratório de Patologia Bucal da UFSC. O potencial voluntário será abordado no momento da biópsia, pela pessoa responsável pelo ato cirúrgico, explicando quais os objetivos para o armazenamento de seu material.

- Quanto ao sigilo e confidencialidade das amostras coletadas e dos dados dos consentidores: Quando o material chegar ao LPB, será devidamente identificado, recebendo um número de registro do laboratório. Para aqueles que aceitarem que seu material biológico seja armazenado no Biobanco do LPB-UFSC, após o estabelecimento do diagnóstico definitivo, o material será cadastrado junto ao Biobanco, mantendo o mesmo número de cadastro do LPB, para fins de localização dos blocos de parafina e lâminas histológicas. Será feito um banco de dados dos casos cadastrados com os dados referentes ao participante (sexo, idade, profissão), assim como dados referentes à lesão (localização, tamanho, tempo de evolução). Esses dados serão colhidos a partir da ficha de biópsia, que será preenchida pelo profissional que executa o procedimento. Os blocos de parafina e as lâminas histológicas receberão o número de cadastro do biobanco e serão armazenados(as) num HISTOFILE, o qual é um arquivo de aço, próprio para essa finalidade para uso futuro em projetos de pesquisa. O material criopreservado será armazenado em freezer -80°C. Somente o material dos participantes que aceitarem participar será cadastrado junto ao Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC. Após esse cadastro, os dados clínicos do caso, referentes ao participante (sexo, idade, profissão), assim como dados referentes a lesão (localização, tamanho, tempo de evolução) serão cadastrados junto ao banco de dados do Biobanco.

- Quanto à transferência de material biológico humano do gerente do biobanco para o pesquisador: A transferência temporária das amostras e de informações associadas ao pesquisador é feita através de Termo de Transferência de Material Biológico. As amostras somente serão cedidas ao pesquisador após apresentação do parecer de aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (CEP-UFSC) ou Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). É vedado o acesso ao material por pesquisadores que não estejam formalmente vinculados à equipe de pesquisa do referido projeto de pesquisa. Após o término dos procedimentos laboratoriais, o pesquisador responsável pela pesquisa deverá imediatamente proceder a devolução dos espécimes ao Biobanco do LPB-UFSC. As amostras provenientes de material embocado em parafina apenas poderão ser utilizadas se houver material biológico suficiente para manter as mesmas arquivadas por um período de 5 anos (considerando a data de entrada no LPB). Após esse período as mesmas poderão ser utilizadas até a sua finalização.

- Quanto ao uso e descarte do material biológico armazenado: Todos os projetos de pesquisa, que planejem utilizar material armazenado no Biobanco, elaborados na UFSC ou em outras instituições deverão ser encaminhados ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC para avaliação e aprovação. A princípio todo material coletado será usado em pesquisa até que termine, porém caso seja necessário descartá-lo por razões de estocagem ou espaço, serão encaminhados para o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da UFSC, para ser recolhido pela empresa Pró-Activa. Além disso, conforme preconizado na Resolução CNS nº 441 de 2011, Item 8, os participantes serão notificados sobre perda ou destruição de suas amostras, bem como sobre o encerramento do biobanco. O descarte do material biológico humano armazenado em Biobanco poderá ocorrer:

- a) pela manifesta vontade do sujeito da pesquisa;
- b) devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade;
- c) por iniciativa da instituição; e
- d) pela dissolução do Biobanco.

Parecer CONEP nº 011/2016

Nas hipóteses previstas nas alíneas "c" e "d", são obrigatórias:

- a) a oferta formal do material armazenado a, no mínimo, duas instituições de pesquisa que possuam Biobanco e a apresentação comprovada da recusa; e
- b) a submissão da decisão institucional e da destinação do material biológico ao CEP, que as encaminhará para avaliação da CONEP.

Procedimentos operacionais padrão: Os procedimentos operacionais padrão foram apresentados, de acordo com a solicitação do checklist, Anexo II da Norma Operacional MS nº 001 de 2013, abordando os tópicos: coleta, processamento, armazenamento e distribuição.

Documentos encaminhados para análise: 1. Regimento Interno; 2. Procedimentos Operacionais Padrão (POP); 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) Versão 02/2014 – Anexo A; 4. Termo de Assentimento Versão 02/2014; 5. Ofício de encaminhamento dos documentos do CEP para a CONEP; 6. Termo de Responsabilidade Institucional; 7. Identificação dos responsáveis pelo biobanco; 8. Ficha de cadastro das amostras; 9. Termo de Transferência de Material Biológico (TTMB); 10. Declaração de cumprimento da Resolução CNS nº 441 de 2011 e da Portaria MS nº 2.201 de 2011; 11. Declaração de compromisso de envio de relatório de atividades; 12. Parecer para Regularização do Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC; 13. Ata da Reunião do dia 22/09/2014 do CEP da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer de Biobanco CONEP Nº. 031/2015, relativo ao protocolo de desenvolvimento em questão:

1 – Quanto ao "Regimento Interno – Versão 02/2014", documento intitulado "4 – Regimento Interno":

- a) Na página 2 de 6, "CAPÍTULO I - DA NATUREZA E FINALIDADE DO BIOBANCO", lê-se: "Art. 1º - O Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina (Biobanco do LPBUFSC) foi criado pelo Departamento de Patologia da UFSC em reunião de XXXDATAXXXX em cumprimento ao disposto na Resolução 441/11, do Conselho Nacional de Saúde (CNS), do Ministério da Saúde.". Solicita-se o preenchimento do trecho em branco, informando no parágrafo a data da reunião de criação do biobanco.
Resposta: Essa informação foi incluída no Regimento Interno (em destaque).
Análise: PENDÊNCIA ATENDIDA.

- b) Na página 3 de 6, "CAPÍTULO V – DO MANDATO DOS MEMBROS DO BIOBANCO", lê-se: "Art. 6º - A duração do mandato do coordenador e o sub-coordenador do Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC será de 2 anos, podendo os mesmos serem reconduzidos.". Deve ser acrescentada a informação de que quando houver alteração da titularidade da responsabilidade pelo Biobanco, tal fato deverá ser prontamente comunicado ao Sistema CEP/CONEP, conforme preconizado na Resolução CNS nº 441 de 2011, Item 3.IV. Solicita-se adequação.
Resposta: A informação foi inserida no Regimento Interno (em destaque).
Análise: PENDÊNCIA ATENDIDA.

- c) Na página 4 de 6, "CAPÍTULO VIII - COLETA E ARMAZENAMENTO DE MATERIAL DE ORIGEM HUMANA, Artigo 11", lê-se: "§ 1º Os blocos de

parafina e as lâminas histológicas receberão o número de cadastro do biobanco e serão armazenados(as) num HISTOFILE, o qual é um arquivo de aço, próprio para essa finalidade para uso futuro em projetos de pesquisa.". No documento deverá constar a informação de que o sigilo e a confidencialidade do consentidor serão garantidos, sendo apresentados os processos de codificação e decodificação e as políticas de segurança com níveis de permissão diferenciados e formas de evitar a identificação do consentidor por pessoal não autorizado. Solicita-se adequação (Portaria MS nº 2.201 de 2011, Capítulo IV, Seção III, Artigo 23, Parágrafo 2º).

Resposta: Com finalidade de adequação o texto do Art. 11º do regimento interno foi modificado (em destaque no texto).

Análise: PENDÊNCIA ATENDIDA.

- d) Caso exista previsão de participação de outras instituições envolvidas na constituição do referido biobanco, deve ser apresentado um acordo entre as instituições participantes envolvidas, contemplando operacionalização, compartilhamento, utilização do material biológico humano armazenado e a possibilidade de dissolução futura da parceria, partilha e destinação dos dados e materiais armazenados, de acordo com a Resolução CNS nº 441 de 2011, Item 13. Solicita-se a apresentação da documentação pertinente. Adicionalmente, ressalta-se que amostras provenientes de outras instituições deverão estar acompanhadas do TCLE do consentidor e do termo de transferência de responsabilidades.

Resposta: No Regimento interno do Biobanco não há previsão de participação de outras instituições.

Análise: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2 – Quanto ao "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Versão 02/2014", documento intitulado "TCLE + assentimento", Anexo A, páginas 1 e 2:

- a) Na página 1 de 4, item "Benefícios", lê-se: "o material armazenado irá possibilitar futuros trabalhos de pesquisa, dentro da linha com o objetivo de entender melhor os processos que levam ao aparecimento das doenças.". O TCLE deve informar ao consentidor que não somente as amostras biológicas, mas também os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir de pesquisas poderão ser utilizados nas pesquisas futuras (Resolução CNS nº 441 de 2011, Item 5d). Solicita-se adequação.

Resposta: a informação foi inserida no TCLE (em destaque).

Análise: PENDÊNCIA ATENDIDA.

- b) Na página 1 de 4, item "Manutenção da privacidade e garantia da retirada do consentimento e material biológico", lê-se: "O participante, ou seu representante legal, tem a garantia de retirar o seu consentimento de guarda da amostra biológica, a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo.". Solicita-se escrever no TCLE que caso o participante queira retirar seu consentimento, isso deverá ser formalizado por meio de uma manifestação, por escrito e assinada pelo consentidor ou seu representante legal (Resolução CNS nº 441 de 2011, Item 10.I).

Resposta: a informação foi inserida no TCLE (em destaque).

Análise: PENDÊNCIA ATENDIDA.

- c) Conforme Resolução CNS nº 441 de 2011, Item 11, o prazo de armazenamento de material biológico humano em Biobanco é indeterminado, sendo a manutenção de

Parecer CONEP nº 011/2016

seu credenciamento subordinada ao atendimento das normas vigentes. Solicita-se acrescentar esta informação no TCLE.

Resposta: Informação foi inserida no final do primeiro parágrafo do TCLE (em destaque).

Análise: PENDÊNCIA ATENDIDA.

- d) Na página 1 de 4, Item "Manutenção da privacidade e garantia da retirada do consentimento e material biológico", lê-se: "Caso haja transferência do material biológico armazenado entre BIORREPOSITÓRIOS ou biobancos, desta ou de outra instituição, o participante será prontamente comunicado e poderá optar por manter ou não sua amostra armazenada." (destaque nosso). Solicita-se a retirada do termo em destaque "entre biorrepositórios" deste trecho e sua adequação, uma vez que, em se tratando esta análise de um Protocolo de Desenvolvimento de Biobanco, pode ser prevista apenas a transferência entre biobancos ou de um biorrepositório para um biobanco.
Resposta: Foi feita a adequação. O termo "entre biorrepositórios" foi removida do TCLE.
Análise: PENDÊNCIA ATENDIDA.
- e) Na página 1 de 4, Item "Meios de contato", lê-se: "Poderá também contatar o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC, pelo telefone (48) 37219206.". Solicita-se que sejam incluídos no TCLE uma breve descrição do que é o CEP, qual sua função no estudo, seu endereço e horário de funcionamento (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.5.d).
Resposta: A informação foi incluída no TCLE (em destaque).
Análise: PENDÊNCIA ATENDIDA.
- f) Na página 1 de 4, Item "Outras informações", lê-se: "Ao assinar esse documento o participante receberá uma COPIA do mesmo, assinado e rubricado em todas as páginas pelo(s) responsável(ais) pelo biobanco." (destaque nosso). Deve ser informado que o TCLE será elaborado em duas vias, e não cópias, sendo uma retida pelo biobanco e a outra com o consentidor. Cabe lembrar que, caso exista mais de uma página, o TCLE deverá ser rubricado em todas as páginas pelo consentidor ou seu responsável, assim como pelo responsável pelo biobanco ou pessoa por ele delegada (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens IV.3.f; IV.5.d). Solicita-se adequação.
Resposta: foi realizada a adequação, conforme solicitado.
Análise: PENDÊNCIA ATENDIDA.
- g) Na página 2 de 4, lê-se: "Material Doado". Ressalta-se que o material biológico humano armazenado em biobanco pertence ao consentidor, cabendo à instituição sua guarda e gerenciamento. Sendo assim, o termo "doado" e correlatos (por exemplo: "doador", "doação", "doadores", "doar", "doações") deverão ser substituídos por termos como "cessão", "ceder", "cedido" e "consentidor" (Resolução CNS nº 441 de 2011, Item 9 e Portaria MS nº 2201 de 2011, Artigo 26, Seção III). Adequar documento.
Resposta: O termo "doado" e termos correlatos foram substituídos (em destaque).
Análise: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3 – Quanto à Ata de Reunião do CEP da UFSC, datada de 22/09/2014 e assinada pelo coordenador do CEP, Prof. Washington Portela de Souza: observa-se que não

Parecer CONEP nº 011/2016

foi enviado para análise da CONEP o Parecer do CEP da Instituição de origem, aprovando este Protocolo de Desenvolvimento. Há apenas a informação de que o Colegiado do CEP aprovou o parecer dos relatores. Solicita-se adequação.

Resposta: o Parecer de aprovação do CEP está em anexo juntamente com a documentação.

Análise: Pendência atendida.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas nas Resoluções CNS nº 466 de 2012 e na Resolução CNS nº 441 de 2011, manifesta-se pela aprovação do protocolo de desenvolvimento do biobanco.

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 11 de fevereiro de 2016.



JORGE ALVES DE ALMEIDA VENÂNCIO
COORDENADOR DA CONEP/CNS/MS