

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

Laura Mazini Alves

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NA TAXA
DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DE CISTOS RADICULARES E RESIDUAIS**

Florianópolis

2021

Laura Mazini Alves

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NA TAXA
DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DE CISTOS RADICULARES E RESIDUAIS**

Trabalho Conclusão de curso da Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Elena Riet Correa Rivero

Coorientadora: Profa. Ma Andressa Fernanda Paza Miguel

Florianópolis

2021

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

Alves, Laura Mazini

Avaliação da influencia do processo inflamatório na taxa de proliferação celular de cisto radiculares e residuais / Laura Mazini Alves ; orientadora, Elena Riet Correa Rivero, coorientador, Andressa Fernanda Paza Miguel, 2021. 37 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Antígeno Ki-67;. 3. Cisto radicular; . 4. Cisto residual; . 5. Inflamação; Proliferação celular.. I. Rivero, Elena Riet Correa . II. Miguel, Andressa Fernanda Paza. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Odontologia. IV. Título.

Laura Mazini Alves

Análise da influência do infiltrado inflamatório na taxa de proliferação celular de cistos radiculares e residuais

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Cirurgiã Dentista” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Odontologia da UFSC

Florianópolis, 15 de Março de 2021

Prof.^a, Dr.^a Glaucia Santos Zimmermann

Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a, Dr.^a Elena Riet Correa Rivero

Orientador(a)

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a Carolina Amália Barcellos Silva

Avaliadora

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a Georgia Ribeiro Martini

Avaliadora

Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico esse trabalho a todas as mulheres que lutaram por uma sociedade igualitária e me permitiram estar na ciência, em especial, minha mãe e minha irmã.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Renata e Wanderley**. Meus maiores mentores. Mãe, quero que entendas que minha vida sempre será sua, por mais que nela andarei com meus próprios pés. A mulher que me ensinou a me valorizar e entender que nós somos capazes; e que em todas nós, mulheres, há uma força indestrutível e imensurável. Eu amo a senhora. Obrigada, mãe. Pai, meu eterno mestre da vida, o senhor me ensinou a amar as pequenas coisas; a fechar os olhos e dançar conforme a música; a amar o calor do sol e a água do mar. Ao senhor dedico todo o meu eu apaixonado pela vida. Te amo. Obrigada, pai.

A minha irmã, **Juliana**, pelas palavras de carinho e apoio na caminhada da vida. Ju, você é o porto mais seguro da minha vida, minha estabilidade, minha força. A melhor irmã e a melhor referência. Te amo e assisto, ansiosamente, conquistar o mundo! Porque sei que um lugar só é pouco para a pessoa incrível que és!

A minha professora e orientadora, **Elena Riet**, por ser uma inspiração dentro da UFSC e na ciência. Professora, você sempre se mostrou extremamente disposta a ajudar. De ti só senti certezas! Poder trabalhar com você foi uma honra. Muito obrigada!

A minha coorientadora, **Andressa Paza**, pela paciência e delicadeza em me ensinar. Você é incrível! Uma excelente professora e pesquisadora. Agradeço do fundo do meu coração pela calma e inúmeras aulas, orientações e correções. Você foi fundamental pra que tudo ocorresse da melhor maneira possível e compartilho contigo o resultado desse trabalho. Obrigada!

Ao meu amigo, namorado e companheiro, **Luigi**. Por ser meu equilíbrio. Amor, contigo construí uma relação de equilíbrio e companheirismo. Agradeço por ser uma pessoa tão boa comigo e que me ajuda a ser a melhor versão de mim. Te amo.

As minhas amigas e companheiras nessa caminhada; **Larissa**, minha força. **Julia**, minha calma. **Thayná**, minha segurança. **Édi**, minha consciência. **Lanis**, minha inteligência. **Ale**, minha compreensão. Vocês preencheram a minha alma com pedacinhos de cada uma. Sou eternamente grata pela nossa amizade e pelo apoio que encontro em cada uma de vocês. Vocês são inesquecíveis! Amo vocês!

A todos os meus amigos que a vida me proporcionou; amigos (as) de luta; amigos (as) de alma. Vocês são responsáveis pela pessoa que hoje tenho orgulho de ser. Obrigada por compartilharem comigo a vida e tornarem ela tão linda! Obrigada por tornarem de mim uma versão cada dia melhor!

Aos grupos que pude fazer parte, por acrescentarem na minha personalidade e na minha formação: Coletivo OdontoFeminista, Gestão Alvorecer (CAOQA) e ao PET OdontoFono;

À Universidade por me proporcionar um ensino público e de qualidade. Com momentos incríveis e acolhedores dentro dela. Minha segunda casa, meu segundo lar.

“Tu te tornas eternamente responsável

por aquilo que cativas”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O propósito desta pesquisa foi investigar a influência do infiltrado inflamatório na taxa de proliferação celular no epitélio de cistos radiculares (CRs) e residuais (CRes). A amostra foi constituída por 29 CRs e 8 CRes provenientes do Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC. Foram obtidos cortes teciduais para a realização da coloração histoquímica com hematoxilina e eosina (H&E) e para a técnica imunoistoquímica, utilizado o anticorpo anti-Ki-67. A intensidade do infiltrado inflamatório foi classificado em ausente, leve, moderada e severa por meio da contagem de células inflamatórias presentes na cápsula cística, utilizando os cortes corados em H&E. A expressão imunoistoquímica do Ki-67 foi obtida pela porcentagem de células positivas, em relação a contagem de 1000 células epiteliais em 10 campos consecutivos. Os testes estatísticos utilizados foram o de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e o teste de correlação de Spearman ($P \leq 0.05$). As amostras de CRs exibiram maior número de células inflamatórias do que CRes ($P=0.039$); isto devido a cessação do estímulo inflamatório em decorrência da extração dentária nos casos de CRes. A expressão de Ki-67 foi maior nos CRs, assim como nas amostras com graus mais severos de inflamação. Entretanto, não foi observada associação estatística entre o potencial proliferativo e a intensidade do infiltrado inflamatório ($P=0.129$). Concluiu-se que, embora os CRes apresentem menor índice proliferativo em relação aos CR, há a manutenção do potencial de crescimento nos CRes independente da diminuição do estímulo inflamatório.

Palavra-chave: Antígeno Ki-67; Cisto radicular; Cisto residual; Inflamação; Proliferação celular.

ABSTRACT

The purpose of this research was to investigate the influence of the inflammatory infiltrate on the rate of cell proliferation in the epithelium of radicular cysts (RCs) and residual (ReCs). The sample consisted of 29 RCs and 8 ReCs from the Biobank of the Laboratory of Oral Pathology at UFSC. Tissue sections were obtained to perform the histochemical staining with hematoxylin and eosin (H&E) and for the immunohistochemical technique, using the anti-Ki-67 antibody. The intensity of the inflammatory infiltrate was classified as absent, mild, moderate and severe by counting the inflammatory cells present in the cystic capsule, using the sections stained in H&E. The immunohistochemical expression of Ki-67 was obtained by the percentage of positive cells, in relation to the count of 1000 epithelial cells in 10 consecutive fields. The statistical tests used were Mann-Whitney, Kruskal-Wallis and Spearman's correlation test ($P \leq 0.05$). RCs samples exhibited a greater number of inflammatory cells than ReCs ($P = 0.039$); this is due to the cessation of the inflammatory stimulus as a result of tooth extraction in cases of ReCs. Ki-67 expression was higher in RCs, as well as in samples with more severe degrees of inflammation. However, no statistical association was observed between the proliferative potential and the intensity of the inflammatory infiltrate ($P = 0.129$). It was concluded that, although the ReC had a lower proliferative index in relation to the RC, there is the maintenance of the growth potential in the ReCs regardless decreased inflammatory stimulus.

Keywords: Antigen Ki-67, Radicular Cyst, Residual Cyst, Inflammation, Cell proliferation

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e imuno-histoquímicas da amostra total..... [25](#)

Tabela 2 - Características clínicas e imuno-histoquímicas conforme o diagnóstico de Cisto Radicular (CR) e Cisto Residual (CRe) [25](#)

Tabela 3 - Características clínicas e imuno-histoquímicas conforme a localização da lesão..... [26](#)

Tabela 4 - Expressão imuno-histoquímica de Ki-67 conforme o grau de severidade de inflamação..... [26](#)

Tabela 5 - Correlação entre a expressão de Ki-67 e a contagem de células inflamatórias em casos de Cisto Radicular (CR) e Cisto residual (CRe)..... [27](#)

Tabela 6 - Expressão imuno-histoquímica de Ki-67 conforme o grau de severidade de inflamação em Cisto Radicular (CR) e Cisto Residual (CRe) [27](#)

Tabela 7 - Expressão imuno-histoquímica de Ki-67 e Intensidade do infiltrado inflamatório conforme a espessura do epitélio [28](#)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparativo da expressão do Ki-67 e alterações epiteliais conforme o grau de inflamação em cistos radiculares (A) Grau leve de inflamação em CR (B) Expressão do Ki-67 da amostra A (C) Grau severo de infiltrado inflamatório em CR (D) Expressão do Ki-67 da amostra C..... [29](#)

Figura 2 - Comparativo da expressão do Ki-67 e alterações epiteliais conforme o grau de inflamação nos cistos residuais (A) Grau leve de inflamação em CRe (B) Expressão do Ki-67 da amostra A (C) Grau severo de infiltrado inflamatório em CRe (D) Expressão do Ki-67 da amostra C..... [30](#)

LISTA DE ABREVIATURAS

BEH - Bainha epitelial de Hertwing

CR – Cisto radicular

CR_e – Cisto residual

CO – Cisto odontogênico

CEO – Ceratocisto odontogênico

Caspase-3 – “CysteinyI aspartic acid-protease-3”

DPM – Desvio-padrão da media

DP – Desvio-padrão

H&E – Hematoxilina e Eosina

IL – Interleucina

Ki-67 - Proteína não-histona de proliferação celular

LPB – Laboratório de Patologia Bucal

MCM-2 – “Minichromosome maintenance proteins -2”

MMP – Metaloproteinase da Matriz

P – Valor de Significância

REM – Resto epitelial de Malassez

RC – “Radicular cyst”

ReC – “Residual cyst”

TNF - Fator de necrose tumoral

µm – Micrometro

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 CISTOS ODONTOGÊNICOS INFLAMATÓRIOS	16
2.2 MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR Ki-67.....	18
2.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO E PROLIFERAÇÃO EPITELIAL.....	19
2.4 PERGUNTA NORTEADORA	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. METODOLOGIA	21
4.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	21
4.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	22
4.3 AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	22
4.4 ANÁLISE DO EPITÉLIO	22
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
5. RESULTADOS.....	24
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÃO	35
8. REFERENCIAS	36
9. ANEXO A	38

1. INTRODUÇÃO

As periapicopatias são lesões exclusivas do ápice dental advindas do processo inflamatório decorrente da necrose pulpar e colonização bacteriana no canal radicular (1). A cronificação do processo inflamatório presente nessa região é capaz de estimular a formação de lesões, tais como o granuloma periapical e o cisto radicular (CR) (1). O desenvolvimento dessas lesões periapicais está relacionado ao acúmulo de mediadores inflamatórios, como fatores de crescimento, citocinas pró inflamatórias (IL-1 α , IL-1b, TNF- α) e prostaglandinas que estimulam o crescimento celular da região apical e promovem a reabsorção óssea e até mesmo radicular (1,2).

As lesões císticas são cavidades patológicas compostas por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, delimitada por um epitélio de revestimento (3,4,5). Os CRs são descritos como cistos odontogênicos (CO) inflamatórios de origem endodôntica, originários da estimulação dos restos epiteliais de Malassez quiescentes nessa região (3). Já os cistos residuais (CRes), como o nome sugere, se referem aos CRs não removidos da região após a extração do elemento dental (4,5).

Os cistos inflamatórios crescem sob o estímulo de mediadores químicos advindos do processo inflamatório e sua evolução decorre do processo de proliferação e morte celular. A degeneração celular é responsável por gerar no lúmen cístico o aumento da saturação proteica acarretando na diferença de pressão osmótica dentro do cisto. Essa diferença osmótica viabiliza a entrada de fluido e aumento da pressão hidrostática no lúmen levando a expansão cística (5).

Entende-se que a inflamação possui papel direto na estimulação do crescimento e proliferação do epitélio cístico (6,7,8). O marcador de proliferação celular Ki-67 é uma proteína nuclear não histona que está presente em todas as etapas de divisão celular, tornando-a uma excelente escolha para estudos imuno-histoquímicos da proliferação celular. Seu uso tem sido preconizado no estudo de lesões tumorais, além de servir para definição da agressividade das mesmas (9-13). Em lesões císticas periapicais, a proliferação celular ocorre predominantemente nas camadas epiteliais (14), mais especificamente, na camada basal (15).

A manutenção do processo inflamatório no CR ocorre devido à permanência de material necrótico no interior do canal radicular, sendo o tratamento não cirúrgico endodôntico uma das

principais vias para redução da infecção e cura da lesão (3-5). Contudo, o CRe, o qual independe da presença do dente desvitalizado, não regride após a remoção do estímulo inflamatório, podendo até continuar crescendo (1-6). Desse modo, não está clara qual a influência do infiltrado inflamatório na taxa de proliferação celular dessas lesões, assim como seu papel na manutenção e crescimento dos cistos residuais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CISTOS ODONTOGÊNICOS INFLAMATÓRIOS

As lesões císticas são compostas por um epitélio revestindo uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso com presença de conteúdo líquido ou semilíquido em seu lúmen (4, 16). Dentre os tipos de COs inflamatórios ou de desenvolvimento, os cistos radiculares (CR) são os mais comuns e compreendem aproximadamente 60% dos cistos em mandíbula e maxila (16,17).

No decorrer da formação dental, na fase de campânula, ocorre a união do epitélio interno e externo do órgão do esmalte. Essa união é responsável por gerar a bainha epitelial de Hertwing (BEH), a qual direcionará a formação da raiz dental (4,18). Após o desenvolvimento da dentina radicular, a BEH sofre um processo degenerativo, no entanto restos epiteliais dessa bainha podem permanecer inativos no ligamento periodontal, formando pequenos ninhos quiescentes de células epiteliais denominadas restos epiteliais de Malassez (REM) (4,18).

Durante o processo inflamatório periapical, ocasionado pela necrose do tecido pulpar e colonização bacteriana no canal radicular, células dos tecidos periapicais liberam mediadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, provenientes do sistema imune inato e adaptativo (4). Esses mediadores são capazes de induzir os REM a entrarem em atividade novamente e iniciarem o processo proliferativo que pode levar desenvolvimento do CR (4).

O desenvolvimento do CR é explicado por diversas teorias, sendo duas principais: a teoria do abscesso e a da deficiência nutricional (5). O embasamento da teoria do abscesso está na tendência inerente das células epiteliais de cobrir uma área de conjuntivo exposto. Em outras palavras, a partir da degradação tecidual, em função da formação de um abscesso, a cavidade formada seria pavimentada por células epiteliais, gerando uma cavidade revestida por epitélio e delimitada externamente por tecido conjuntivo. (5, 19). Por outro lado, na teoria da deficiência nutricional, a massa epitelial cresce em três dimensões e se nutre através do tecido conjuntivo ao redor, o qual passa a compor a cápsula cística. Contudo, com o decorrer do seu crescimento, as células epiteliais centrais obtêm menor aporte nutricional do que as células das camadas periféricas, – as quais estão em constante processo proliferativo e maior necessidade de nutrição – o que leva a um processo apoptótico e degenerativo acarretando na formação de uma cavidade (5).

Já o crescimento e expansão cística se devem à descamação das células epiteliais para no lúmen cístico, criando um ambiente com alta concentração proteica. Assim, estabelece-se um gradiente osmótico que resulta na entrada de fluídos no interior da cavidade cística, ocasionando o aumento gradativo do cisto, em decorrência do aumento da pressão hidrostática no lúmen da lesão (5).

O CR normalmente apresenta-se como uma lesão assintomática, no periápice de um desvitalizado, podendo apresentar sintomatologia em casos com exacerbação do processo inflamatório agudo; além disso, quando seu crescimento é demasiado, pode vir a ocorrer expansão das corticais ósseas na região. No aspecto radiográfico, comumente exibe-se como uma lesão radiolúcida unilocular bem delimitada, corticalizada e associada à raiz de um dente não vital, o qual exibe perda da lâmina dura na região de inserção da cápsula cística a raiz (20).

Quando o CR se encontra com seu lúmen isolado do ápice dental, recebe a classificação de cisto verdadeiro. Entretanto, quando há ligação do lúmen cístico com o canal radicular este é denominado cisto em bolsa (16). Ressalta-se que os CRs do tipo ‘bolsa’ tendem a responder melhor aos tratamentos instituídos devido ao contato do lúmen com o canal radicular, uma vez que possibilita uma melhor penetração da medicação intracanal quando realizado o tratamento endodôntico (16).

Caso o dente relacionado ao cisto seja extraído, sem a remoção da lesão, a mesma passa a ser denominada de cisto residual (CRe) (16). Os CRes também são lesões assintomáticas, diagnosticadas em exames radiográficos de rotina. Seu aspecto assemelha-se ao do CR, sendo uma lesão radiolúcida unilocular, bem definida, com alo radiopaco devido à osteogênese reacional (20). Após a remoção do dente, há a remoção do agente causador da lesão e a consequente interrupção do estímulo inflamatório, assim, a lesão pode apresentar um quadro de regressão. Contudo, a mesma pode permanecer estática ou até mesmo continuar a se expandir (16). Vale ressaltar que a sintomatologia do CRe resulta de infecções secundárias e, caso o cisto seja de grande extensão, a lesão pode vir a causar expansão das corticais ósseas (16,20).

Histologicamente, os dois cistos abordados possuem características muito semelhantes; ambos são compostos por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, revestida por um epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado. Caso as lesões se localizem na maxila, podem apresentar células mucosas dispersas e áreas de epitélio colunar pseudoestratificado ciliado

(20). Além disso, o epitélio de revestimento pode apresentar calcificações lineares ou em formato de arco, conhecidas como corpúsculos de Rushton (20). Na cápsula cística é frequente a presença de infiltrado inflamatório predominantemente crônico composto principalmente por linfócitos e plasmócitos. Pode haver ainda a presença de calcificações distróficas e cristais de colesterol, que atraem células multinucleadas e macrófagos na tentativa de fagocitar esses materiais. A fendas de cristais de colesterol também são frequentes no lúmen da lesão. (20).

2.2 MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR Ki-67

A proteína Ki-67 é uma proteína nuclear não histona, que se encontra presente em todas as fases da divisão celular (G1, S, G2 e M), com maior aparecimento na interfase G2 e rápido desaparecimento pós-mitose, sendo, portanto, um dos marcadores de proliferação celular mais utilizados em estudos de imuno-histoquímica (9, 10).

No decorrer da divisão celular, a localização da proteína sofre mudanças: na fase G0, onde a célula permanece quiescente, a proteína Ki-67 está ausente; na fase G1 a proteína Ki-67 se encontra em focos no nucleoplasma; nas fases S e G2, ela está localizada dentro do nucléolo; e na fase mitótica ela se realoca para a periferia da cromatina condensada, compondo a camada pericromossomal (11,12). Sua função ainda permanece dúbia, mas estudos relatam a associação da proteína com a síntese de ribossomos, devido a sua localização na parte fibrilar densa do nucléolo (12).

A avaliação do índice de proliferação celular, por meio da identificação da proteína ki-67, tem sido muito considerada pela possibilidade de estimar prognóstico de crescimento, agressividade e recidiva de diferentes tipos de tumores (11,12,13). Nas lesões císticas periapicais, a atividade proliferativa ocorre predominantemente no epitélio (14), sendo observada na camada basal, essa com maior grau de marcação de Ki-67 (15), seguida pela camada parabasal. Já a camada suprabasal é a região em que as células epiteliais permanecem para sua maturação até a descamação, não exibindo, portanto, atividade proliferativa (15).

Um estudo realizado por Soluk Tekkesin; Mutlu; Olgaç (2012) comparou a expressão de Ki-67 em ceratocistos (CEOs), CRs e ameloblastomas. Como resultado, os pesquisadores encontraram que a atividade proliferativa nos CEOs e ameloblastomas foi maior do que nos CRs, podendo essa elevada taxa de marcação no epitélio estar associada ao quadro clínico

agressivo dessas lesões. Segundo os autores, a marcação de Ki-67 dos CRs pode estar relacionada a presença de infiltrado inflamatório na capsula cística (15).

2.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO E PROLIFERAÇÃO EPITELIAL

A inflamação pode alterar não somente a morfologia, como também o potencial proliferativo das células epiteliais (6). Kaplan; Hirshberg, (2004) investigaram a influência do processo inflamatório na proliferação celular em CEOs através da marcação do Ki-67. Seus resultados demonstraram um aumento proliferativo em regiões do epitélio cístico em que havia a presença de intenso infiltrado inflamatório crônico (7). Em acréscimo, Ayoub *et al.*, (2011) relataram que em CRs e CEOs a imunopositividade celular da proteína Ki-67 aumentou conforme o grau de inflamação na cápsula cística devido a ação estimuladora da inflamação crônica (8). Contudo, em contrapartida aos estudos citados, Mourão *et.al*, (2015) observaram que a expressão de Ki-67 se apresentou maior em lesões com baixo grau de infiltrado inflamatório. Os autores acreditam que seja devido à destruição da camada basal do epitelial em decorrência do alto grau de inflamação (21).

Diversos estudos em COs e tumores odontogênicos benignos têm mostrado que fatores de crescimento e citocinas inflamatórias presentes no processo inflamatório podem ser responsáveis pela atividade de crescimento celular (6, 4). Bando *et al.*, (1993) identificaram nos CRs a presença das interleucinas inflamatórias IL-1a, IL-1b, e IL-6 nas camadas epiteliais, assim como nas células endoteliais de vasos próximos aos epitélios (22). Esses achados suportam um mecanismo de crescimento contínuo da lesão e a reabsorção óssea associada, em vista que as interleucinas IL-1, IL-6 e TNF- α são conhecidos como remodeladores ósseos (23).

2.4 PERGUNTA NORTEADORA

Assim, diante do exposto acima, poderia o grau do infiltrado inflamatório presente na cápsula cística de CRs e CRes estar relacionado ao potencial proliferativo dessas lesões, bem como ser responsável pela permanência dos CRes?

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar e comparar de maneira quantitativa a associação entre a taxa de proliferação celular e a intensidade do infiltrado inflamatório em CRs e CRes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as características clínicas dos cistos radiculares e cistos residuais em maxila e mandíbula do Laboratório de Patologia Oral da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC) no período 2006 a 2018
- Comparar a taxa de proliferação celular entre CRs e CRes, através da marcação imuno-histoquímica da proteína Ki-67, e relacionar a sua expressão com a intensidade do infiltrado inflamatório presente na cápsula cística de ambas as lesões.
- Comparar a intensidade do infiltrado inflamatório presente nas amostras de CRs com as amostras de CRes
- Avaliar qualitativamente as alterações epiteliais decorrentes do processo inflamatório e correlacionar as mesmas com a taxa de proliferação.
- Correlacionar os achados desse estudo com os existentes na literatura.

4. METODOLOGIA

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da UFSC, sob protocolo 1.285.803.

Foram coletados 96 casos diagnosticados como “cisto radicular” e “cisto residual” entre o período de 2006 - 2018 do Laboratório de Patologia Oral da UFSC (LPB-UFSC). Todas as amostras foram submetidas a cortes com espessura de 3µm para coloração com hematoxilina e eosina (H&E).

Os critérios de inclusão foram: a presença de no mínimo 2/3 de revestimento epitelial da cápsula cística, a disponibilidade de tecido epitelial presente nos cortes histológicos, assim como a boa qualidade dos blocos fixados. Ao final da análise foram selecionados 37 casos, sendo 29 CRs e 8 CRes.

Os dados clínicos das amostras selecionadas foram coletados através dos laudos patológicos armazenados no LPB-UFSC. Todos os laudos foram executados por patologistas e são acompanhados da ficha de biópsia do paciente. Para análise dos dados foram coletadas informações como: diagnóstico; sexo; idade do paciente; localização anatômica e presença de sintomatologia;

4.1 IMUNO-HISTOQUIMICA

Para a técnica imuno-histoquímica foram obtidos cortes teciduais de 3 µm de espessura, montados em lâmina preparada com solução de ATPS (3- aminopropiltriétoxisilano) (Sigma-Aldrich, Saint. Louis, MO, EUA). As lâminas foram desparafinizadas em xilol e reidratadas por passagens sucessivas em etanol de concentrações decrescentes (100%, 90%, 85%). O bloqueio da atividade da enzima peroxidase foi realizado após imersão em solução de H₂O₂/metanol a 6%. A recuperação antigênica foi feita por meio de um banho-maria a 96°C, com tampão citrato 0.01M (pH 6.0), durante 40 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas durante 40 minutos em solução de leite desnatado em pó diluído em solução salina tamponada 0.05M, pH 7.4 (PBS), para bloqueio das reações inespecíficas. Entre cada processo foram realizadas lavagens com PBS. As lâminas foram então encubadas com o anticorpo primário para marcação da proteína Ki-67 (1:400; Clone SP6, BioCare Medical, CA, EUA) em câmara úmida a 4°C durante a noite.

Para amplificação da reação, as lâminas foram encubadas durante 1 hora com o sistema EnVision (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA). Após lavagem com PBS, a revelação da reação foi realizada com solução cromógena, contendo diaminobenzidina (DAB) (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA), durante três minutos. Em seguida, foi feita a contra-coloração das lâminas com hematoxilina de Harris durante dois minutos. Finalmente, as lâminas passaram por uma desidratação em cadeias de concentração crescentes de etanol (85% e 100%), diafanização em xilol e montagem com o adesivo Permount®.

4.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para avaliação das reações foi utilizado o software NIH ImageJ 1.45q (National Institutes of Health, Maryland, EUA) a partir de imagens capturadas com câmera fotográfica (Bel Engineering, Eureka 3.0, Milão, Itália) acoplada a microscópio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com magnitude de 400X. A avaliação para Ki-67, caracterizada pela coloração castanha no núcleo, foi obtida individualmente no epitélio, através da contagem de no máximo 1000 células epiteliais em até 10 campos consecutivos para cada caso. O resultado final foi expresso como a porcentagem de células epiteliais positivas para Ki-67.

4.3 AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

A intensidade de infiltrado inflamatório foi avaliada a partir da contagem total de células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares) em um aumento de 400x, com o auxílio da ferramenta *cell counter* do software NIH ImageJ 1.45q. Em seguida, a intensidade do infiltrado inflamatório foi classificada em: 0 - ausência de inflamação, [0-10] células/área; 1 - inflamação leve, [11-25] células inflamatórias/área; 2 - inflamação moderada, [26-65] células inflamatórias/área; 3 - inflamação severa, [>65] células inflamatórias/área. Para cada caso, também foi calculada a média e mediana de cinco campos consecutivos, afim de se obter uma maior precisão para análise do processo inflamatório nas amostras (24).

4.4 ANÁLISE DO EPITÉLIO

Para análise da espessura do epitélio foi utilizado o software NIH ImageJ 1.45q. A espessura do epitélio foi classificada conforme o número de camadas epiteliais: Atrófico (≤ 6

camadas epiteliais); Moderado (6-10 camadas epiteliais); Hipertrófico (≥ 10 camadas epiteliais) (25). A integridade do epitélio também foi analisada qualitativamente, observando características como: presença de degeneração hidrópica e espongirose; acantose; projeções epiteliais em direção ao tecido conjuntivo; exocitose; integridade da camada basal.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi obtida utilizando o software SPSS Statistics (Statistical Product and Service Solutions, EUA). Inicialmente, a normalidade das variáveis quantitativas foi testada utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov ($n > 30$) e Shapiro-Wilk ($n < 30$). Em seguida, para a comparação entre grupos de variáveis quantitativas com distribuição não normal, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis (análise de três grupos) e de Mann-Whitney (análise de dois grupos), e a representação dos dados foi feita com mediana e distância interquartil. Para a correlação entre duas variáveis quantitativas (nº células inflamatórias vs Ki-67) foi usado o coeficiente de correlação de Spearman. Para a o estudo da associação entre variáveis qualitativas foram utilizados os testes exato de Fisher e Qui-quadrado. Para variáveis quantitativas com distribuição normal foi utilizado o teste T de Student, e a representação dos dados foi feita com média \pm desvio padrão. Foi considerado o valor de $P < 0.05$ para dados com significância estatística.

5. RESULTADOS

As características clínicas e os resultados imuno-histoquímicos da amostra geral estão representados na Tabela 1. Na amostra geral, observou-se um discreto predomínio de homens (1.6:1), não havendo associação entre sexo e tipo da lesão (Tabela 2). Em relação à localização, a frequência de lesões em maxila foi 2.77 vezes maior do que na mandíbula (Tabela 1). Ao comparar as características clínicas e imuno-histoquímicas entre as lesões localizadas na maxila e na mandíbula, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (Tabela 3). A idade média geral encontrada foi de 48 ± 13.9 anos, sendo 46 ± 14.7 para CR e 52 ± 11.3 para CRe, não sendo observada associação entre as idades médias e o tipo de lesão (Tabela 1 e 2).

Na amostra geral, o grau de inflamação severo foi o mais frequente, estando presente em 54.1% da amostra (Tabela 1). Ao analisar a correlação entre o grau do infiltrado inflamatório e o tipo de lesão (CR vs CRe), observou-se predomínio de casos com inflamação severa em CR (90%), enquanto em CRe houve maior frequência de casos com inflamação leve (57%). No entanto, não foi observada associação estatisticamente significativa entre a classificação do grau de inflamação e o tipo de lesão ($P = 0.070$; Tabela 2). Por outro lado, ao avaliar o número de células inflamatórias, observou-se que o valor mediano de células inflamatórias em CR (84.10) foi superior aos valores de CRe (27.8), havendo diferença estatística ($P = 0.039$) (Tabela 2).

A imunopositividade do Ki-67 apresentou-se majoritariamente na camada basal e parabasal do epitélio cístico, com pouca marcação no tecido conjuntivo da cápsula, salvo regiões de neoformação vascular. No CR, o valor mediano de expressão do antígeno Ki-67 foi maior do que em CRe (5.12 vs 3.29, respectivamente). Apesar disso, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na expressão de Ki-67 entre os dois tipos de lesão ($P = 0.625$) (Tabela 2).

Tabela 1: Características clínicas e imuno-histoquímicas da amostra total.

		TOTAL
IDADE	Média (DP)	48±13.9
SEXO	Feminino (%)	14 (37.8)
	Masculino (%)	23 (62.1)
DIAGNÓSTICO	CR (%)	29 (78.3)
	CRe (%)	8 (21.6)
LOCALIZAÇÃO	Maxila (%)	25 (73.5)
	Mandíbula (%)	9 (26.4)
Ki-67	Mediana (DIQ)	5.13 (10.15)
INFLAMAÇÃO	Ausente (%)	2 (5.4)
	Leve (%)	7 (18.9)
	Moderada (%)	8 (21.6)
	Severa (%)	20 (54.1)
Contagem de células inflamatórias	Mediana (DIQ)	73.20 (82.05)
TOTAL		37

CR, Cisto radicular; CRe, cisto residual; DP, desvio padrão; DIQ, distância interquartil.

Tabela 2: Características clínicas e imuno-histoquímicas conforme o diagnóstico de Cisto Radicular (CR) e Cisto Residual (CRe).

		DIAGNÓSTICO		
		CR	CRe	<i>P</i>
IDADE	Média (DP)	46±14.7	52±11.3	0.380¥
SEXO	Feminino (%)	13 (92.8)	1 (7.14)	0.123†
	Masculino (%)	16 (69.5)	7 (30.4)	
LOCALIZAÇÃO	Ausente (%)	2 (66.6)	1 (33.3)	0.644†
	Maxila (%)	19 (76)	6 (24)	
	Mandíbula (%)	8 (88.8)	1 (11.1)	
Ki-67	Mediana (DIQ)	5.12 (10.15)	3.29 (12.66)	0.625‡
INFLAMAÇÃO	Ausente (%)	2 (100)	0	0.070†
	Leve (%)	3 (42.9)	4 (57.1)	
	Moderada (%)	6 (75)	2 (25)	
	Severa (%)	18 (90)	2 (10)	
Contagem de células inflamatórias	Mediana (DIQ)	81.35 (99.53)	27.8 (64.30)	0.039‡
TOTAL		29	8	37

CR, Cisto radicular; CRe, cisto residual; DP, desvio padrão; DIQ, distância interquartil.

¥ Teste T de Student

† Teste exato de Fisher

‡ Teste Mann-Whitney

Significância estatística estabelecida em $P < 0.05$. Valores em negrito indicam $P < 0.05$.

Tabela 3: Características clínicas e imuno-histoquímicas conforme a localização da lesão.

		LOCALIZAÇÃO		
		MAXILA	MANDÍBULA	<i>P</i>
IDADE	Média (DP)	47.43 (13.60)	50.13 (16.21)	0.654¥
SEXO	Feminino (%)	9 (75)	3 (25)	1.000†
	Masculino (%)	16 (72.7)	6 (27.2)	
Diagnóstico	CR (%)	19 (70.3)	8 (29.6)	0.664†
	CRe (%)	6 (85.1)	1 (24.2)	
Ki-67	Mediana (DIQ)	4.91 (6.20)	5.97 (12.84)	1.000‡
	Ausente (%)	0	2 (100)	
INFLAMAÇÃO	Leve (%)	6 (85.2)	1 (24.2)	0.155†
	Moderado (%)	5 (83.3)	1 (16.6)	
	Severa (%)	14 (73.6)	5 (26.3)	
Contagem de células inflamatórias	Mediana (DIQ)	83.20 (98.70)	52.15 (101.93)	0.489
TOTAL		25	9	-

CR, Cisto radicular; CRe, cisto residual; DP, desvio padrão; DIQ, distância interquartil.

¥ Teste T de Student

† Teste exato de Fisher

‡ Teste Mann-Whitney

Significância estatística estabelecida em $P < 0.05$.

Em relação à expressão de Ki-67 entre os diferentes graus de inflamação, foi observado uma discreta elevação da expressão de Ki-67 conforme o aumento da severidade da inflamação, entretanto não foi encontrada diferença estatística ($P = 0.129$; [Tabela 4](#)); tampouco foi observada correlação entre o número de células inflamatórias e a expressão desta proteína ($P = 0.158$; [Tabela 5](#)).

Tabela 4: Expressão imuno-histoquímica de Ki-67 conforme o grau de severidade de inflamação

		Ki-67		
		Mediana	DIQ	<i>P</i>
INFLAMAÇÃO	Ausente	0.61	-	0.129*
	Leve	2.23	10.89	
	Moderada	4.65	8.92	
	Severa	6.76	9.41	

DIQ, distância interquartil.

*Teste Kruskal-Wallis; Significância estatística estabelecida em $P < 0.05$.

Tabela 5: Correlação entre a expressão de Ki-67 e a contagem de células inflamatórias

	Ki-67	Contagem de células inflamatórias
Correlações de coeficiente*	1.000	0.237
Ki-67 <i>P</i>	.	0.158
N	37	37

*Teste de correlação de Spearman; Significância estatística estabelecida em $P < 0.05$.

Comparações conforme diagnóstico

Dada a discrepância entre o tamanho da amostra de CR (29) e a de CRe (8), optou-se por estudar também a associação do Ki-67 com a inflamação de maneira separada para cada grupo de diagnóstico ([Tabela 6](#)). Em CR, a expressão de Ki-67 não demonstrou associação com a severidade do infiltrado inflamatório ($P = 0.086$). O mesmo foi observado nas amostras de CRe ($P = 0.570$) ([Tabela 6](#)).

Tabela 6: Expressão imuno-histoquímica de Ki-67 conforme o grau de severidade de inflamação em Cistos Radicular (CR) e Cistos Residual (CRe).

		CR	CRe
		Ki-67	Ki-67
		Mediana (DIQ)	Mediana (DIQ)
INFLAMAÇÃO	Ausente	0.61	-
	Leve	2.23	2.74 (12.70)
	Moderada	4.65 (6.64)	11.56
	Severa	7.54 (8.08)	3.97
<i>P</i>		0.086‡	0.570‡

CR, cisto radicular; CRe; cisto residual; DIQ, distância interquartil.

‡Teste Kruskal-Wallis; Significância estatística estabelecida em $P < 0.05$.

Espessura do Epitélio

Em relação à espessura do epitélio, 18 das 37 amostras (48.65%) apresentaram epitélio hipertrófico, com maior valor mediano de expressão de Ki-67 (7.5) em comparação ao epitélio de espessura moderada (3.52) ou atrófico (2.23). Salienta-se que 65% das lesões classificadas com infiltrado inflamatório severo apresentaram epitélio hipertrófico ([Tabela 7](#)).

A respeito disso, os casos classificados com inflamação severa apresentaram, em sua maioria, epitélio hipertrófico com áreas de acantose. Também foram observadas exocitose, degeneração hidrópica e esponjosa, assim como aumento nas projeções para o tecido conjuntivo. Já os casos com epitélio atrófico não apresentaram grandes discrepâncias quanto ao grau de inflamação, ademais foram observadas regiões de acantose sem grandes alterações epiteliais e discreta exocitose. É importante ressaltar que ocorreram lesões com grau de inflamação leve que apresentaram epitélio hipertrófico, contudo, estes casos demonstraram uma interface epitélio-conjuntivo homogênea com melhor preservação da camada epitelial basal e discreta degeneração ([Figura 1](#) e [Figura 2](#)).

Tabela 7: Expressão imuno-histoquímica de Ki-67 e Intensidade do Infiltrado inflamatório conforme a espessura do epitélio.

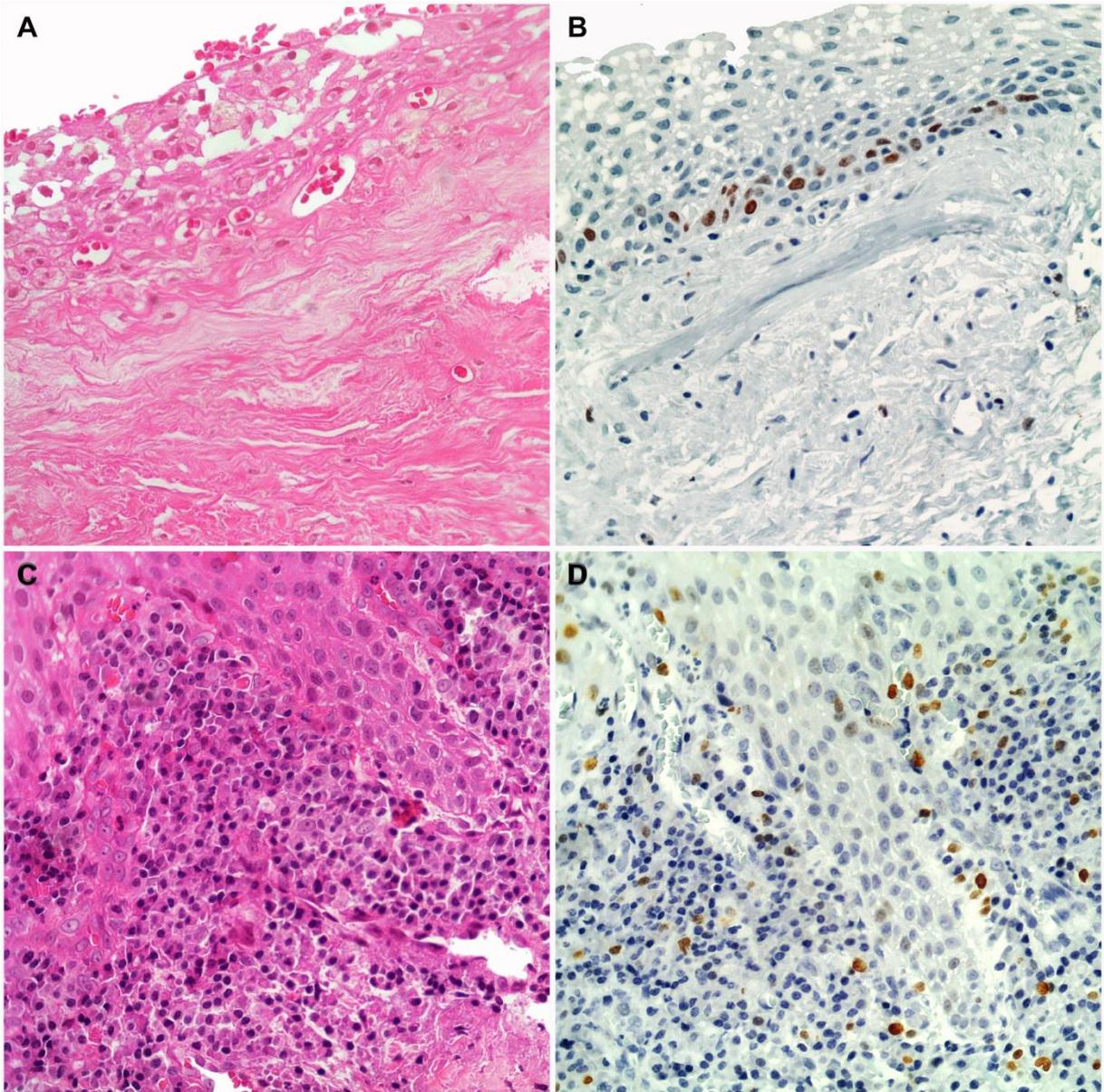
		ESPESSURA DO EPITÉLIO			<i>P</i>
		Atrófico	Moderado	Hipertrófico	
INFLAMAÇÃO	Ausente (%)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.205†
	Leve (%)	3 (42.9)	1 (14.3)	3 (42.9)	
	Moderada (%)	4 (50)	2 (25)	2 (25)	
	Severa (%)	4 (20)	3 (15)	13 (65)	
	Total (%)	13 (35.1)	6 (16.2)	18 (48.6)	
Ki-67 Mediana (DIQ)		2.23 (8.31)	3.52 (12.17)	7.5 (8.27)	0.084‡

DIQ; distância interquartil.

†Teste exato de Fisher

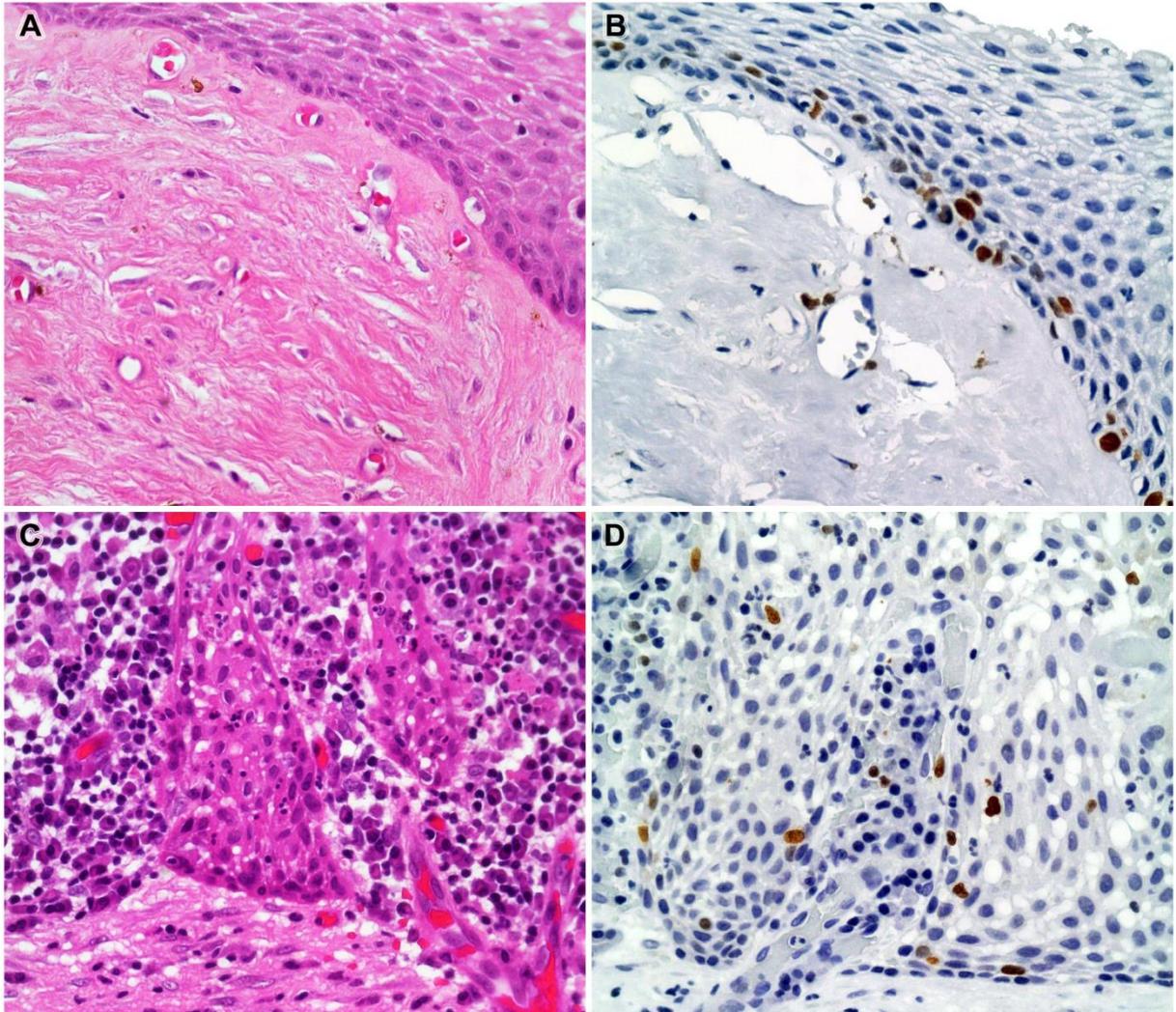
‡Teste de Kruskal-Wallis

Significância estatística estabelecida em $P < 0.05$



Fonte: Produção própria 2021

Figura 1: Comparativo da expressão do Ki-67 e alterações epiteliais conforme o grau de inflamação em cistos radiculares (A) H&E; Grau leve de inflamação em CR (B) Expressão do Ki-67 da amostra A (C) H&E, Grau severo de infiltrado inflamatório em CR (D) Expressão do Ki-67 da amostra C.



Fonte: Produção própria 2021

Figura 2: Comparativo da expressão do Ki-67 e alterações epiteliais conforme o grau de inflamação nos cistos residuais (A) H&E, Grau leve de inflamação em CRe (B) Expressão do Ki-67 da amostra A (C) H&E, Grau severo de infiltrado inflamatório em CRe (D) Expressão do Ki-67 da amostra C.

6. DISCUSSÃO

Os COs inflamatórios são cavidades patológicas revestidas por epitélio alojados nos ossos maxilares e dependentes do processo inflamatório para seu desenvolvimento (4,16). Dentre os grupos de cistos inflamatórios, os CRs advêm de um longo processo inflamatório crônico resultante da necrose pulpar e responsável por estimular a proliferação dos restos epiteliais de Malassez presentes no ápice dental (3,4,5). Já os CRes são lesões histológicas e clinicamente semelhantes aos CRs, porém se diferem destes apenas por serem lesões císticas que persistem após a extração do dente desencadeador da sua formação (4,5).

De acordo com o presente estudo, tanto os CRs quanto os CRes exibiram semelhanças clínicas, com maior prevalência na região de maxila (67%). Além disso, ambas as lesões acometeram ligeiramente mais homens do que mulheres (1.6:1), e a idade média geral foi de 48 ± 13.9 anos, sendo 46 ± 14.7 anos para CRs e 52 ± 11.3 anos para CRes. Estes resultados compactuam com os dados encontrados na literatura (16,17,19,26), em principal ao estudo sistemático de Kammer, Mello e Rivero (2020). Nesta revisão, os autores analisaram a prevalência dos COs inflamatórios e não inflamatórios e observaram predomínio de homens e maior acometimento da região anterior da maxila nos dados gerais de COs. Destaca-se que a frequência de COs inflamatórios (7.2%) foi maior em comparação aos COs de desenvolvimento (4.2%); e dos estudos analisados, os CRs representaram 54.23% das amostras gerais de COs inflamatórios (17).

A inflamação periapical, a qual caracteriza as lesões císticas odontogênicas inflamatórias de origem endodôntica, é resultado da colonização bacteriana no canal radicular de um dente desvitalizado (3-6). Com isso, a remoção do estímulo inflamatório, seja por tratamento endodôntico do canal radicular ou mesmo a extração do dente afetado, a princípio, acarretaria na resolução da resposta inflamatória (27). Dessa maneira, em lesões como os CRes, nas quais o fator causal foi removido, seria esperado encontrar uma resposta inflamatória de menor grau, em relação aos CRs (16). Neste estudo, constatou-se que CRs apresentaram maior número de células inflamatórias do que os CRes, bem como predomínio do grau de inflamação severo em 90% das amostras de CRs, contra apenas 1% das lesões de CRes. Esta diferença reafirma a presença do canal radicular necrótico como principal responsável pela manutenção do processo inflamatório crônico.

Entretanto, enfatiza-se que assim como ocorre uma diferença terapêutica entre os CRs do tipo bolsa, estes conectados ao canal radicular e apresentando maior sucesso terapêutico, há por parte dos CRs verdadeiros uma maior resistência ao processo curativo, estes também não envolvendo mesmo quando isolado do ápice dental necrosado e fonte inflamatória, assemelhando-se ao processo de não involução dos CRes (16).

Dessa forma, Martins *et al.*, (2017) encontraram que a maioria dos casos de CRs e CRes exibiam inflamação moderada/intensa, entretanto, não houve diferença no grau de inflamação entre CRs e CRes. Além disso, os autores observaram um alto potencial proliferativo em lesões de CRes, as quais exibiram maior marcação de Ki-67 do que os CRs. Diante disso, os autores sugeriram que a alta taxa de proliferação celular observada em CRes, bem como a manutenção do elevado grau de inflamação poderia ter relação com a proximidade destas lesões com a cavidade oral, devido à expansão cística e ruptura da cortical óssea (2). O estudo indica que, após a extração dental, a reabsorção fisiológica do osso alveolar poderia gerar uma proximidade com a cortical óssea que, por conta de algum trauma ou processo infeccioso secundário, poderiam vir a acarretar na permanência do processo inflamatório. Além disso, Martins, *et al.* (2017) demonstraram que CRes instalados em ossos com a cortical periférica rompida apresentaram expressão superior de Ki-67 do que os CRes com a cortical intacta, assim como destacaram a possibilidade de que fatores intrínsecos da camada epitelial - ainda desconhecidos - podem ser responsáveis pelo potencial proliferativo destes cistos (2).

Tendo em vista que a inflamação atua como um importante estímulo à proliferação celular, seria esperado encontrar uma associação positiva entre a severidade do infiltrado inflamatório e a expressão do marcador de proliferação Ki-67. A esse respeito, o presente estudo observou uma tendência ao aumento da expressão de Ki-67 associada com o aumento da severidade da inflamação. Aliado a isso, os resultados também demonstraram que as lesões de CRs, além de exibirem maior grau de inflamação, também apresentaram mais células positivas para Ki-67, em relação aos mesmos parâmetros nas lesões de CRes. Apesar de tais resultados não alcançarem significância estatística; os mesmos compactuam com os resultados encontrados na literatura sobre a relação positiva da proteína Ki-67 com o grau de intensidade do processo inflamatório (7,8, 28, 29).

Em contrapartida aos estudos citados acima, Mourão *et. al* (2016) ao avaliarem a expressão de Ki-67 em CRs, observaram que a marcação desta proteína foi significativamente

menor nos grupos com alto grau de infiltrado inflamatório mononuclear (macrófagos e linfócitos), em relação às lesões com baixo grau (21). Segundo os autores essa baixa expressão do Ki-67 seria resultado da destruição da camada basal epitelial em decorrência do intenso grau de infiltrado inflamatório. O estudo também sugere que a destruição tecidual agravada pela intensificação do processo inflamatório possa levar a um aumento do nível proteico no lúmen cístico, de maneira a acarretar alterações osmóticas e, conseqüente, expansão cística. Cabe destacar que no referido estudo foram contabilizadas apenas células inflamatórias mononucleares e a metodologia de classificação da inflamação não foi reportada (21).

Nesse mesmo contexto, Güler, Çomunoğlu e Cabbar (2012) investigaram a proliferação celular por meio da expressão de dois marcadores diferentes: MCM-2 e Ki-67 em COs. Os autores compararam a expressão de ambos os marcadores nas amostras císticas inflamadas e não inflamadas, correspondentes às lesões: CRs, CEOs, cistos dentígeros (CD) e folículo dental (FD). Apesar dos dois marcadores estarem presentes nas amostras de CRs, apenas o marcador MCM-2 apresentou associação com a inflamação, além de exibir expressão mais alta nas amostras do que o Ki-67. Além disso, o marcador Ki-67 apresentou expressão mais elevada em lesões não inflamatórias, como CEOs, quando comparado aos CRs. Vale ressaltar também que a proteína Ki-67 não apresentou associação significativa com o processo inflamatório. Segundo os autores, essa maior expressão do marcador MCM-2 em CRs poderia ser em virtude da proteína MCM-2 ser mais sensível a mudanças no processo inflamatório do que a proteína Ki-67 (6).

Ainda no que se refere à proliferação celular, alguns estudos têm demonstrado uma forte relação não somente entre expressão de Ki-67 e o processo inflamatório, mas também entre marcadores apoptóticos e a espessura do epitélio dessas lesões. Sabe-se que a apoptose é fundamental para a manutenção do epitélio de revestimento dos COs, sendo a proteína caspase-3, quando ativada, uma das principais executoras da via apoptótica (28,29). Assim, tais estudos demonstraram em CRs que a marcação do Ki-67 e da proteína caspase-3 foram maiores nas amostras com epitélio hipertrófico que também exibiam um alto grau de infiltrado inflamatório. Os autores sugeriram que essa associação seria devida à manutenção do equilíbrio entre apoptose e proliferação celular, ambos aumentados em decorrência da inflamação (28,29). No presente estudo, observou-se que lesões com infiltrado inflamatório severo corresponderam a 65% dos casos avaliados com epitélio hipertrófico; compactuando com os dados apresentados nas análises histológicas da literatura (28, 29)

Além do epitélio hipertrófico, o presente estudo também observou que as lesões com infiltrado inflamatório severo na cápsula cística apresentaram epitélio descontínuo e desorganização da camada basal. Estes achados estão em concordância com a análise imuno-histoquímica de Mourão *et.al* (2016), na qual os autores observaram um aumento na destruição da camada basal epitelial associada ao alto grau de inflamação, em decorrência da intensa atividade de enzimas remodeladoras da matriz extracelular (MMPs) produzidas pelas células inflamatórias, as quais são responsáveis pela degradação do colágeno e fibras elásticas que constituem a lâmina basal do epitélio (21).

Outro ponto importante a se considerar são as citocinas advindas do processo inflamatório crônico presentes na cápsula e no lúmen dos CRs e CRes, sendo muitas delas responsáveis pela atividade de reabsorção óssea, produção de colágeno e crescimento cístico (21, 30, 31, 32). Ressalta-se que em alguns casos, quando há altas concentrações de certos fatores, como o TNF- α , pode haver efeito inibitório da proliferação celular da camada epitelial (30). Jurisic *et al.*, (2007), constataram que os CRs possuem uma alta concentração de TNF- α em seu fluido no interior do lúmen cístico em comparação a outras lesões, como os CEOs, estando essa expressão de TNF- α relacionada significativamente com o aumento da intensidade do processo inflamatório (31) e expansão cística (32). Ademais, Muglali *et al.*, (2008) analisaram a expressão dos mediadores IL-1 α , TNF- α , MCP-1 e RANTES, envolvidos no crescimento cístico, em CRs e CRes. Os autores relataram que: CRs apresentaram tamanhos maiores e níveis de citocinas pró-inflamatórias mais elevados que os CRes. Isso porque a presença de endotoxinas bacterianas no canal radicular controla positivamente a vinda desses mediadores. Apesar disso, embora em menores níveis do que CRs, os CRes também possuem citocinas (IL-1 α , TNF- α , MCP-1 e RANTES) em seu lúmen, apresentando um possível potencial expansivo (32). Não obstante, os autores sugerem que, após a extração dental, caso haja a permanência da lesão, essas citocinas pró-inflamatórias podem ser responsáveis pela manutenção do crescimento cístico dos – agora classificados - CRes (32).

Nessa conjectura, a degeneração da camada basal epitelial associada a presença do processo inflamatório (21) pode estar relacionada tanto à redução dessa camada, prejudicando a identificação da proliferação celular em lesões cística com comprometimento da camada basal. Assim como também, possuir relação com a expansão de CRs e CRes, partindo do princípio de que: quanto mais inflamada a lesão periapical maior a saturação de proteínas

advindas da degeneração epitelial e permanência de citocinas pró-inflamatórias no lúmen cístico ([21](#), [28](#), [29](#), [31](#), [32](#)).

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, a partir deste estudo constatou-se que os CRs apresentaram maior número de células inflamatórias em comparação aos CRes, reforçando a permanência do canal radicular necrótico como principal fator de manutenção do processo inflamatório dos CRs. Entretanto, entende-se que mesmo após a retirada do ápice dental ainda existem fatores que mantêm o processo inflamatório nos CRes.

Além disso, o processo inflamatório em diferentes graus pode influenciar na taxa de proliferação celular das lesões císticas. Embora este estudo não tenha encontrado diferença significativa entre a proliferação celular e o infiltrado inflamatório, nossos achados demonstraram uma tendência ao aumento da marcação da proteína Ki-67 nas amostras com inflamação severa.

Cabe destacar que as lesões classificadas com infiltrado inflamatório severo, majoritariamente, apresentaram epitélio hipertrófico, descontínuo e com desorganização da lâmina basal. Diante disso, recomenda-se novos estudos envolvendo outros marcadores de proliferação celular, bem como análise das enzimas remodeladoras da matriz extracelular (MMPs), as quais seriam capazes de induzir degeneração da camada basal epitelial em CRs e CRes.

8. REFERENCIAS

- [1] VIER, F. V.; FIGUEIREDO, J. A. P. Prevalence of different periapical lesions associated with human teeth and their correlation with the presence and extension of apical external root resorption. **International Endodontic Journal**, v. 35, n. 8, p. 710–719, 2002.
- [2] MARTINS, R. et al. Comparative immunoeexpression of ICAM-1, TGF- β 1 and ki-67 in periapical and residual cysts. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 22, n. 1, p. e24–e30, 2017.
- [3] BERNARDI, L. et al. Radicular Cyst: An Update of the Biological Factors Related to Lining Epithelium. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 12, p. 1951–1961, 2015.
- [4] LIN, L. M.; HUANG, G. T. J.; ROSENBERG, P. A. Proliferation of Epithelial Cell Rests, Formation of Apical Cysts, and Regression of Apical Cysts after Periapical Wound Healing. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 8, p. 908–916, 2007.
- [5] TORABINEJAD, M. The rôle of immunological reactions in apical cyst formation and the fate of epithelial cells after root canal therapy: a theory. **International Journal of Oral Surgery**, v. 12, n. 1, p. 14–22, fev. 1983.
- [6] GÜLER, N.; ÇOMUNOĞLU, N.; CABBAR, F. Ki-67 and MCM-2 in dental follicle and odontogenic cysts: The effects of inflammation on proliferative markers. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.
- [7] KAPLAN, I.; HIRSHBERG, A. The correlation between epithelial cell proliferation and inflammation in odontogenic keratocyst. **Oral Oncology**, v. 40, n. 10, p. 985–991, 2004.
- [8] AYOUB, M. S.; BAGHDADI, H. M.; EL-KHOLY, M. Immunohistochemical detection of laminin-1 and Ki-67 in radicular cysts and keratocystic odontogenic tumors. **BMC Clinical Pathology**, v. 11, p. 2–7, 2011.
- [9] JAAFARI-ASHKAVANDI, Z.; MEHRANMEHR, F.; ROOSTA, E. MCM3 and Ki67 proliferation markers in odontogenic cysts and ameloblastoma. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 9, n. 1, p. 47–50, 2019.
- [10] MATEOIU, C.; PIRICI, A.; BOGDAN, F. L. Immunohistochemical nuclear staining for p53, PCNA, ki-67 and bcl-2 in different histologic variants of basal cell carcinoma. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 52, n. SUPPL. 1, p. 315–319, 2011.
- [11] JURÍKOVÁ, M. et al. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. **Acta Histochemica**, v. 118, n. 5, p. 544–552, 2016.
- [12] BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki67 protein: The immaculate deception? **Histopathology**, v. 40, n. 1, p. 2–11, 2002.
- [13] SITTEL, C. et al. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. **Oral Oncology**, v. 35, n. 6, p. 583–589, 1999.
- [14] TRIPI, T. K. et al. Proliferative activity in periapical lesions. **Australian Endodontic Journal**, v. 29, n. 1, p. 31–33, 2003.
- [15] SOLUK TEKKEŞİN, M.; MUTLU, S.; OLGAC, V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic odontogenic tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. **Türk Patoloji Dergisi/Turkish Journal of Pathology**, v. 28, n. 1, p. 49–55, 2012.
- [16] JAMDADE, A. et al. Localization of a Peripheral Residual Cyst: Diagnostic Role of CT Scan. **Case Reports in Dentistry**, v. 2012, p. 1–6, 2012.
- [17] KAMMER, P. V.; MELLO, F. W.; RIVERO, E. R. C. Comparative analysis between developmental and inflammatory odontogenic cysts: retrospective study and literature review. **Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 24, n. 1, p. 73–84, 2020.

- [18] TEN CATE, A. R. The epithelial cell rests of Malassez and the genesis of the dental cyst. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 34, n. 6, p. 956–964, 1972.
- [19] NAIR, P. N. R. New perspectives on radicular cysts: Do they heal? **International Endodontic Journal**, v. 31, n. 3, p. 155–160, 1998.
- [20] NEVILLE, Brand W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 912 p.
- [21] MOURÃO, R. V. C. et al. Study of the relationship between mononuclear inflammatory infiltrate and Ki-67 and basement membrane and extracellular matrix protein expression in radicular cysts. **International Endodontic Journal**, v. 49, n. 5, p. 447–453, 2016.
- [22] BANDO, Y. et al. Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 221–227, maio 1993.
- [23] BERNARDI, L. et al. Radicular Cyst: An Update of the Biological Factors Related to Lining Epithelium. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 12, p. 1951–1961, 2015.
- [24] BÓRIO, C. C. et al. Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggregate (MTA) Fillapex, DiaRoot BioAggregate and MTA. **International Endodontic Journal**, v. 47, n. 7, p. 667–674, 2014.
- [25] ALCANTARA, B. A. R. et al. Correlation between inflammatory infiltrate and epithelial lining in 214 cases of periapical cysts. **Brazilian oral research**, v. 27, n. 6, p. 490–495, 2013.
- [26] OCHSENIUS, G. et al. Odontogenic Cysts: Analysis of 2.944 cases in Chile. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 12, n. 2, p. 71–77, 2007
- [27] TORABINEJAD, M. et al. Levels of evidence for the outcome of nonsurgical endodontic treatment. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 9, p. 637–646, 2005.
- [28] MARTINS, C. A. et al. Immunohistochemical detection of factors related to cellular proliferation and apoptosis in radicular and dentigerous cysts. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 1, p. 36–39, 2011.
- [29] SUZUKI, T. et al. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 34, n. 1, p. 46–52, 2005.
- [30] QURESHI, W. UR R.; IDRIS, M.; KHAN, S. A. Role of tumour necrosis factor in pathogenesis of radicular cyst. **Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC**, v. 23, n. 2, p. 87–89, 2011.
- [31] JURISIC, V.; COLIC, S.; JURISIC, M. The inflammatory radicular cysts have higher concentration of tnf-alpha in comparison to odontogenic keratocysts (odontogenic tumour). **Acta medica (Hradec Králové) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Králové**, v. 50, n. 4, p. 233–238, 2007.
- [32] MUGLALI, M. et al. Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cyst fluids. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 185–189, mar. 2008.

9. ANEXO A



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

Aos 15 dias do mês de março de 2021, às 15:00 horas, em sessão pública por meio de webconferência utilizando a plataforma CAFe - RNP, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra. Elena Riet Correa Rivero, e pelos examinadores, Profa. Dra. Carolina Amália Barcellos Silva, e Profa. Me. Georgia Ribeiro Martini, a acadêmica Laura Mazini Alves apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado “ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA INFLUÊNCIA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NA TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DE CISTOS RADICULARES E RESIDUAIS” como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e a integralização do Curso de Graduação em Odontologia. A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO 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, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo aluno orientando.



Documento assinado digitalmente
Elena Riet Correa Rivero
Data: 15/03/2021 15:59:23-0300
CPF: 691.083.900-53
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Presidente da Banca Examinadora – Profa. Dra. Elena Riet Correa Rivero



Documento assinado digitalmente
Carolina Amalia Barcellos Silva
Data: 15/03/2021 16:15:15-0300
CPF: 029.175.849-55
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Examinador 1 - Profa. Dra. Carolina Amália Barcellos Silva



Documento assinado digitalmente
Georgia Ribeiro Martini
Data: 15/03/2021 16:52:33-0300
CPF: 048.171.719-60
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Examinador 2 - Profa. Me. Georgia Ribeiro Martini



Documento assinado digitalmente
Laura Mazini Alves
Data: 15/03/2021 16:37:48-0300
CPF: 101.417.189-00
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Acadêmica: Laura Mazini Alves