

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL**

MAIARA DE MORAES

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS
PROTEÍNAS RANK, RANKL E OPG EM CISTOS
RADICULARES E CISTOS DENTÍGEROS**

NATAL, RN

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MAIARA DE MORAES

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS
PROTEÍNAS RANK, RANKL E OPG EM CISTOS
RADICULARES E CISTOS DENTÍGEROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Patologia Oral da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito à obtenção do título de Mestre em Patologia Oral.

Orientador: Antonio de Lisboa Lopes Costa

NATAL, RN

2010

Divisão de Serviços Técnicos

Catálogo da Publicação na Fonte UFRN/Biblioteca Setorial de Odontologia

Moraes, Maiara de

Expressão imuno-histoquímica das proteínas RANK, RANKL e OPG em cistos radiculares e cistos dentígeros / Maiara de Moraes. – Natal, RN, 2010.
99f.: il.

Orientador: Antonio de Lisboa Lopes Costa

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral.

1. Cisto radicular– Dissertação. 2. Cisto dentígero – Dissertação. 3. RANK– Dissertação. 4. RANKL – Dissertação. 5. OPG – Dissertação. I. Costa, Antonio de Lisboa. II. Título.

BLACK DØ3


RN/UF/BSO/2010

A defesa deste trabalho foi realizada no dia 23 de fevereiro de 2010, em Natal/RN, tendo sido aprovada com conceito "A".

COMISSÃO EXAMINADORA


Profa. Dra. Patrícia Teixeira de Oliveira
Universidade de Potiguar


Profa. Dra. Lélia Maria Guedes Queiroz
Universidade Federal do Rio Grande do Norte


Prof. Dr. Antonio de Lisboa Lopes Costa
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

“Ao meu filho, Luca de Moraes Ohashi, pelo reconhecimento à minha profissão, o qual tem desejado em um futuro próximo fazer educação, sabendo dos desafios do educador no contexto atual.”

“Aos meus pais, Vicente Fernando de Moraes e Maria Eunice de Moraes, a quem honro pelo esforço com o qual mantiveram seus filhos, permitindo-lhes condições de galgar êxito e que com todo amor e dedicação tornaram-me um ser humano consciente da importância de se construir uma vida com honestidade, simplicidade e trabalho.”

“Aos meus amigos pelo incentivo a busca de novos conhecimentos, a todos os professores e professoras que muito contribuíram para a minha formação.”

“Dedico ainda a minha querida segunda mãe, Darley de Oliveira Cardoso, que foi ao longo de sua vida um exemplo de luta e que muito me apoiou quando da minha vinda para Natal-RN. Que a sua luta contra o câncer, se transforme em minha luta por perspectivas melhores na pesquisa científica.”

AGRADECIMENTOS

“Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los. Quando damos conta, já é tarde para lhes agradecer. Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o meu trabalho.”

“Agradeço ao professor e orientador Antonio de Lisboa Lopes Costa, pelo acompanhamento e revisão do estudo, pela sabedoria e dedicação com a qual supervisionou meu trabalho, levando em consideração os problemas, sendo sensível às diversas situações entres que lhes foram apresentadas.”

“Agradeço, sobretudo aos meus Pais que sempre depositaram confiança e acreditaram no meu potencial.”

“Agradeço ao meu filho, Luca de Moraes Ohashi, por compreender que minha ausência ao longo destes dois anos foi objeto de um sonho e realização pessoal.”

“Agradeço aos meus amigos, em especial aos colegas do mestrado, pelo apoio, compreensão, ensinamentos e pela ajuda.”

“Agradeço ao Biólogo, Hévio Freitas de Lucena, pela ajuda nos procedimentos laboratoriais e por fazer da minha estada no Laboratório e o meu dia-a-dia mais agradável.”

“Agradeço a todos os professores do departamento de Patologia Oral que direta ou indiretamente contribuíram para a minha evolução acadêmica e intelectual. Agradeço ao Prof. Paulo Sérgio Lúcio pela valiosa contribuição na análise estatística.”

“Agradeço aos funcionários, Sandra, Canindé, Lourdes e Graçinha por todo apoio e convívio durante estes anos.”

“À CAPES pelo auxílio financeiro para realização do projeto de pesquisa.”

“O professor pensa ensinar o que sabe, o que recolheu nos livros e da vida, mas o aluno aprende do professor não necessariamente o que o outro quer ensinar, mas aquilo que quer aprender.” Affonso Romano de Sant Anna

“Melhor professor nem sempre é o de mais saber e, sim, aquele que, modesto, tem a faculdade de manter o respeito e a disciplina da classe.” Cora Coralina

"Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende." Guimarães Rosa

“A vida nos jardins ensina-nos uma sabedoria milenar. Plantas precisam de podas que não ultrapassem os limites estabelecidos. Não houve poda, e por isso a árvore avançou o território que não poderia ter avançado. Árvores crescem sem disciplina. A tesoura de poda é que dará o rumo que a árvore poderá seguir. Se quisermos o fruto, é preciso que haja empenho no cultivo do broto.” Fábio de Melo

RESUMO

Receptor ativador nuclear kappa B (RANK), ligante do receptor ativador nuclear kappa B (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) são membros da família do fator de necrose tumoral relacionados com o metabolismo ósseo. A formação, diferenciação e atividade dos osteoclastos são reguladas por estas três proteínas. RANK é um receptor transmembrana presente em diversos tipos celulares, principalmente em células de linhagem macrófaga, linfócitos, células dendríticas e fibroblastos e quando ativado pelo seu ligante, RANKL, promove a diferenciação e ativação de células osteoclásticas responsáveis pelo processo de reabsorção óssea. A OPG impede a ligação RANK/RANKL atuando como um receptor inibitório para a atividade osteolítica. O objetivo deste estudo foi comparar a expressão imuno-histoquímica destes biomarcadores em cistos radiculares (n=20) e cistos dentígeros (n=20). A expressão imuno-histoquímica destes marcadores foi avaliada no epitélio e na cápsula dos cistos por escores e percentuais médios de imunomarcção. Para o epitélio, a análise semi-quantitativa revelou um padrão similar dos escores de imunomarcção de RANK, RANKL e OPG nas lesões, não havendo diferença estatística significativa ($p=0.589$, $p=0.688$, $p=0.709$, respectivamente). Para a cápsula cística a análise quantitativa, mostrou diferença estatística significativa entre os percentuais médios de imunomarcção do RANK e RANKL ($p=0,001$ e $p=0,005$, respectivamente) nos cistos. A correlação dos escores de imunomarcção de RANKL e OPG no epitélio do CR e do CD revelou diferença estatística significativa ($p=0,029$, $p=0,003$, respectivamente). No epitélio dos CRs e dos CDs observou-se uma maior imunoexpressão da OPG comparada a do RANKL. Os resultados apontam a presença de RANK, RANKL e OPG nos cistos radiculares e cistos dentígeros, sugerindo a atuação destas proteínas no desenvolvimento e expansão das lesões no osso adjacente.

Palavras-chave: cisto radicular, cisto dentígero, RANK, RANKL e OPG

ABSTRACT

Receptor activator nuclear kappa B (RANK), Receptor activator nuclear kappaB-ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) are members of the superfamily of ligands and receptors of tumor necrosis factor family involved in bone metabolism. The formation, differentiation and activity of osteoclasts are regulated for this three proteins. RANK is a transmembrane receptor present in various cell types, mainly in cells of macrophage lineage, lymphocytes, and dendritic cells and fibroblasts when activated by its ligand, RANKL promotes the differentiation and activation of osteoclastic cells responsible for process of bone resorption. The OPG prevents binding RANK / RANKL acting as an inhibitory receptor for reabsorptive activity. The aim of this study was to compare the immunohistochemical expression of biomarkers in radicular cysts (n=20) and dentigerous cysts (n=20). The immunohistochemical expression of these markers was evaluated in the epithelium and the capsule of the cysts by scores and means percentage of immunostaining. In the epithelium, the semi-quantitative analysis revealed a similar of immunostaining scores of RANK, RANKL and OPG in the lesions, with no statistically significant difference was found ($p=0,589$, $p=0,688$ and $p=0,709$, respectively). In regard to the cystic capsule the quantitative analysis, showed a statistically significant differences between the average percentage of immunostaining of RANK and RANKL ($p=0.001$ and $p=0.005$, respectively). The correlation of scores of immunostaining for RANKL and OPG in the epithelium of the CR and CD revealed a statistically significant differences ($p=0.029$, $p= 0.003$, respectively). The epithelium showed a higher content of OPG than RANKL. The results indicate the presence of RANK, RANKL and OPG in radicular and dentigerous cysts, suggesting the presence of these proteins and their involvement in the development and expansion of lesions in the adjacent bone.

Keywords: radicular cyst, dentigerous cyst, RANK, RANKL and OPG.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Papel dos osteoblastos na diferenciação dos osteoclastos (adaptado de KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).....	28
Figura 2	Regulação da osteoclastogênese (adaptado de KHOSLA, 2001).....	32
Figura 3	Papel do RANK, RANKL e OPG na osteoclastogênese em condições homeostáticas e inflamatórias (adaptado de MENEZES et al., 2008)....	37
Figura 4	Cisto radicular com revestimento epitelial pavimentoso estratificado não- ceratinizado hiperplásico exibindo exocitose e contendo intenso infiltrado inflamatório mononuclear subjacente ao epitélio (Hematoxilina-eosina – 400X).....	52
Figura 5	Cisto dentígero exibindo revestimento epitelial atrófico e cápsula de tecido conjuntivo denso exibindo áreas de hemorragia e escasso infiltrado inflamatório mononuclear (Hematoxilina-eosina – 200X).....	52
Figura 6	Frequência relativa à idade nos casos de CR.....	53
Figura 7	Frequência relativa à idade nos casos de CD.....	53
Figura 8	Expressão imuno-histoquímica da proteína RANK (A), RANKL (B) e OPG (C) no epitélio de CR (LSAB – A – 400X, B, C - 1000X).....	57
Figura 9	Expressão imuno-histoquímica da proteína RANK (A), RANKL (B) e OPG (C) no epitélio de CD (LSAB - 1000X).....	57
Figura 10	Expressão imuno-histoquímica do RANKL na cápsula do cisto radicular. Observe imunomarcção em células inflamatórias do tipo mononuclear. LSAB (1000X).....	60
Figura 11	Expressão imuno-histoquímica da OPG na cápsula do cisto radicular. Observe imunomarcção em células inflamatórias do tipo mononuclear e polimorfonuclear. LSAB (1000X).....	60
Figura 12	Expressão imuno-histoquímica de OPG na cápsula do cisto radicular. Observe imunomarcção em células endoteliais e células inflamatórias. LSAB (1000X).....	65

Figura 13 Expressão imuno-histoquímica de RANK na cápsula do cisto dentífero. Observe imunomarcção em células inflamatórias do tipo polimorfonucleares. LSAB (1000X).....	65
Figura 14 Expressão imuno-histoquímica de RANKL na cápsula do cisto dentífero. Observe imunomarcção em células inflamatórias do tipo mononuclear. LSAB (1000X).....	66
Figura 15 Expressão imuno-histoquímica da OPG na cápsula do cisto dentífero. Observe imunomarcção em ninhos de epitélio odontogênico. LSAB (1000X).....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos escores da marcação imuno-histoquímica para o anticorpo anti-RANK, -RANKL e -OPG no epitélio do cisto radicular e do cisto dentífero. Natal, RN – 2010.....	56
Tabela 2	Distribuição do percentual médio de células imunopositivas para o anticorpo anti-RANK, -RANKL e -OPG e razão RANKL/OPG na cápsula do cisto radicular. Natal, RN – 2010.....	59
Tabela 3	Distribuição dos escores da marcação imuno-histoquímica para o anticorpo anti-RANK, -RANKL e -OPG na cápsula do cisto radicular. Natal, RN – 2010.....	61
Tabela 4	Distribuição do percentual médio de células imunopositivas para o anticorpo anti-RANK, -RANKL e -OPG e razão RANKL/OPG em cisto dentífero. Natal, RN – 2010.....	63
Tabela 5	Distribuição dos escores da marcação imuno-histoquímica para o anticorpo anti-RANK, -RANKL e -OPG na cápsula do cisto dentífero. Natal, RN – 2010.....	64
Tabela 6	Parâmetros utilizados no cálculo do teste de <i>Mann-Whitney</i> para a avaliação dos escores de células imunorreativas para o RANK, RANKL e OPG no epitélio, segundo o tipo de lesão. Natal, RN – 2010.....	67
Tabela 7	Parâmetros utilizados no cálculo do teste de <i>Mann-Whitney</i> para a avaliação do percentual médio de células imunorreativas para o RANK, RANKL e OPG na cápsula cística, segundo o tipo de lesão. Natal, RN – 2010.....	68
Tabela 8	Distribuição dos casos com relação aos postos de escores de imunomarcção para OPG e RANKL no epitélio e na cápsula cística. Natal, RN – 2010.....	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Especificidade, recuperação antigênica, diluição, tempo de incubação e fabricante dos anticorpos utilizados.....	44
Quadro 2	Frequências referentes ao gênero, raça, localização e sintomatologia dos casos de cisto radicular e cisto dentífero.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cbfa – fator transcripcional associado com diferenciação osteoblástica

CD – cisto dentífero

CDs – cistos dentíferos

CR – cisto radicular

CRs – cistos radiculares

FSC – M – Fator estimulante de colônias de macrófagos

FSC-GM - Fator estimulador de colônia granulocítica-macrofágica

IFNs - Interferons

IL – interleucina

NF- κ B – fator nuclear kappa B

NO - óxido nítrico

ODF - fator de diferenciação osteoclástica

OPG – osteoprotegerina

OPGL - ligante da osteoprotegerina

PG - prostaglandinas

PMNs – leucócitos polimorfonucleares

RANK – Receptor Ativador do fator Nuclear kappa B

RANK-L - ligante do receptor ativador fator nuclear kappa B

EROE - epitélio reduzido do órgão do esmalte

rFSC-M – receptor para Fator estimulante de colônias de macrófagos

TGF-beta – fator de necrose tumoral beta

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TRAIL - Ligante Indutor de Apoptose Relacionado a TNF

TRANCE - Citocina Indutora de Ativação Relacionada ao TNF

TRAP – fosfatase ácida tártaro-resistente

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Cistos radiculares	19
2.1.1 Considerações iniciais.....	19
2.1.2 Características clínicas, radiográficas, histopatológicas.....	20
2.1.3 Histogênese e mecanismo de formação da cavidade cística.....	21
2.2 Cistos dentígeros	23
2.2.1 Considerações iniciais.....	23
2.2.2 Características clínicas, radiográficas e histopatológicas.....	24
2.2.3 Histogênese do CD.....	25
2.3 Tecido ósseo – Considerações iniciais	27
2.4 RANK	30
2.5 RANKL	30
2.6 OPG	33
2.7 RANK/RANKL/OPG	34
2.8 RANK/RANKL/OPG em CRs e CDs	36
3 PROPOSIÇÃO	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Caracterização do estudo	42
4.2 População	42
4.3 Amostra	42
4.4 Critérios de seleção da amostra	43
4.4.1 Critérios de inclusão.....	43
4.4.2 Critérios de exclusão.....	43
4.5 Estudo morfológico	43
4.6 Coleta dos dados clínicos	44
4.7 Estudo imuno-histoquímico	44
4.7.1 Coloração pelo método imuno-histoquímico.....	45
4.7.2 Análise da marcação imuno-histoquímica.....	46
4.8 Análise estatística	47
4.9 Implicações éticas	48

5 RESULTADOS	49
5.1 Aspectos histopatológicos da amostra selecionada para o estudo	50
5.2 Análise descritiva de frequência dos dados	50
5.2.1 Distribuição por gênero, raça, localização e sintomatologia.....	51
5.2.2 Distribuição por idade e aspecto radiográfico.....	51
5.3 Análise dos resultados imuno-histoquímicos	53
5.3.1 No epitélio (E).....	54
<i>5.3.1.1 Cistos radiculares</i>	54
<i>5.3.1.2 Cistos dentígeros</i>	55
5.3.2 Na cápsula (C).....	58
<i>5.3.2.1 Cistos radiculares</i>	58
<i>5.3.2.2 Cistos dentígeros</i>	62
5.4 Resultados estatísticos	67
5.4.1 Associação da expressão dos escores de imunomarcção para RANK, RANKL e OPG no epitélio com o tipo de lesão.....	67
5.4.2 Associação da expressão dos percentuais médios de imunomarcção para RANK, RANKL e OPG na cápsula com o tipo de lesão.....	67
5.4.3 Correlação da expressão dos escores de imunomarcção de RANKL e OPG no epitélio e na cápsula dos cistos.....	68
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICES	87
ANEXOS	98

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os cistos dos maxilares são descritos com base na origem do revestimento epitelial, sendo subdivididos em odontogênicos e não-odontogênicos (SHAND; REGGIE, 2005). Os cistos odontogênicos correspondem às lesões ósteo-detrutivas mais comuns da região maxilo-facial e, acredita-se que se originam de uma proliferação de remanescentes epiteliais do órgão dental (FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; GROSSMAN et al., 2007). De acordo com sua origem, podem ser divididos em cistos inflamatórios e cistos de desenvolvimento (NEVILLE et al., 2009; REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008; SHAND; REGGIE, 2005; SHEAR et al., 1994).

Dentro do grupo de cistos odontogênicos inflamatórios, o cisto radicular (CR) é o mais comum. As lesões radiculares são caracterizadas por destruição óssea periapical que ocorre como resultado da resposta imune-inflamatória do hospedeiro a infecções bacterianas oriundas do canal radicular. A infecção que se inicia no canal radicular progride para a região periapical por meio do fluxo contínuo de microrganismos e seus produtos (KAWASHIMA et al., 2007; MENEZES et al., 2006; MENEZES et al., 2008; VERNAL et al., 2006). No grupo de cistos de desenvolvimento, o cisto dentígero (CD) é o mais comum. Sua patogênese é desconhecida, entretanto acredita-se que ele se desenvolve pelo acúmulo de líquido entre o epitélio reduzido do esmalte e a coroa do dente (NEVILLE et al., 2009; REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008).

A expansão destes cistos está relacionada com a proliferação epitelial, liberação de fatores de reabsorção e um aumento da osmolaridade do fluido cístico (REGEZI; SCIUBBA, JORDAN, 2008). A reabsorção óssea nestas lesões é iniciada pela proliferação de células precursoras osteoclásticas imaturas, ativação e degradação da matriz óssea orgânica e inorgânica por células osteoclásticas maduras. Os osteoclastos são células derivadas de monócitos/macrófagos e sua diferenciação é regulada principalmente pelo fator macrofágico estimulador de colônia (M-CSF), receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), ligante do receptor ativador fator nuclear kappa B (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) (MENEZES et al., 2006; MENEZES et al., 2008).

A expressão de OPG e RANKL foi primeiramente detectada em odontoblastos, ameloblastos, células da polpa e do ligamento periodontal (SILVA et al., 2008). RANKL também tem sido

identificado em granulomas periapicais e, cistos e tumores odontogênicos (ANDRADE et al., 2008; SILVA et al., 2008; MENEZES et al. 2006; TAY et al., 2004, VERNAL et al., 2004). Embora os estudos iniciais apontem a presença destas proteínas em diversas patologias ósseas de interesse odontológico como a doença periodontal, tumores odontogênicos e outros tumores ósseos do esqueleto facial, a presença destas em cistos radiculares e em cistos dentígeros tem sido pouco avaliada (ANDRADE et al., 2008; BOSTANCI et al., 2007; CROTTI et al., 2003; TAY et al., 2004).

A identificação do RANKL e da OPG e a elucidação da regulação do RANK no desenvolvimento e ativação dos osteoclastos têm criado novas possibilidades para o desenvolvimento de drogas para o tratamento da perda óssea (ANDRADE et al., 2009; BAUD'HUIN et al., 2007). A utilização destas proteínas em medicações intra-canal ou mesmo a aplicação intralesional direta destas, poderia de alguma forma restabelecer o tecido lesionado, possibilitando uma melhora nas estratégias terapêuticas radicais utilizadas até o momento.

O fato de o RANKL ser requerido para o desenvolvimento osteoclástico sugere que agentes que inibem sua atividade podem atuar como potentes agentes terapêuticos. Neste contexto, a OPG, que inibe a formação osteoclástica pelo bloqueio da interação RANK-RANKL, pode desempenhar um papel essencial em tratamentos futuros (TAY et al., 2004).

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar e comparar a expressão imuno-histoquímica do RANK, RANKL e OPG em cistos radiculares e cistos dentígeros tentando estabelecer o papel destas proteínas no processo de reabsorção óssea e sua contribuição na progressão e desenvolvimento destas lesões.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cistos radiculares

2.1.1 Considerações iniciais

Os cistos radiculares, também denominados de cistos periapicais, periodontais apicais ou perirradiculares, são lesões odontogênicas de natureza inflamatória nos ápices dentários geralmente oriundos de um processo infeccioso (NEVILLE et al., 2009; REGEZI; SCIUBA; JORDAN, 2008). A resposta inflamatória periapical ocorre como consequência da infecção bacteriana da polpa dentária por exposição à cárie, trauma, iatrogenia ou mesmo após tratamento endodôntico, como resposta aos materiais utilizados na instrumentação do canal. Este estímulo inflamatório dá origem aos granulomas periapicais e CRs com concomitante reabsorção do osso adjacente ao dente afetado (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998).

As lesões císticas periapicais são as mais comuns da região maxilofacial representando cerca de 55% dos cistos odontogênicos e, constituindo 50 a 75% de todos os cistos encontrados na literatura (JONES; CRAIG; FRANKLIN, 2006; NEVILLE et al., 2009). Jones, Craig e Franklin (2006), encontraram 52,3% de casos diagnosticados como CR em um estudo sobre cistos odontogênicos num período de 30 anos. Grossman et al. (2007) avaliaram o perfil demográfico dos cistos de origem odontogênica e não odontogênica em uma população brasileira num período de 51 anos, encontrando 61% dos casos de cistos odontogênicos com diagnóstico de cisto radicular.

A distribuição por idade varia da terceira a sexta décadas da vida, sendo relativamente rara a ocorrência na primeira década da vida, mesmo sendo frequente lesões de cárie nesta faixa etária. A maioria dos casos ocorre em indivíduos de sexo masculino e quanto à localização, 60% ocorrem na maxila, especialmente na região anterior, seguida da região maxilar posterior, região posterior de mandíbula e por último, região mandibular anterior (JONES; CRAIG; FRANKLIN, 2006; NEVILLE et al., 2009; OCHSENIUS et al., 2007; REGEZI; SCIUBA; JORDAN, 2008). Existem divergências em relação ao gênero mais acometido por estes cistos. Raitz et al. (2000) apontam o sexo feminino como o mais acometido e justificam isto pelo fato de as mulheres possuírem uma cronologia de erupção

antecipada o que poderia levar a uma maturação incompleta do esmalte, e conseqüentemente a uma maior susceptibilidade à cárie. No entanto, outros estudos (JONES; CRAIG; FRANKLIN, 2006; OCHENSIUS et al., 2007) apontam o gênero masculino como o mais acometido. Shear et al. (1989), justifica esta maior incidência em homens pelo fato de a higiene oral destes ser mais negligenciada quando comparada à das mulheres, além de os homens serem mais susceptíveis à traumatismos dentários.

2.1.2 Características clínicas, radiográficas e histopatológicas

Os CRs são lesões geralmente assintomáticas, descobertas em exames radiográficos de rotina no ápice de um dente desvitalizado, sendo tumefação e sensibilidade leve, achados comuns. Estes cistos podem assumir dimensões suficientes para produzir destruição óssea local e dor. Radiograficamente aparecem como áreas radiotransparentes bem localizadas, circunscritas e bem definidas com perda da lâmina dura. Em cistos de longa evolução pode-se observar a reabsorção radicular do dente envolvido e usualmente o afastamento e a reabsorção das raízes dos dentes adjacentes (NETO et al., 2004; NEVILLE et al., 2009; REGEZI; SCIUBA; JORDAN, 2008).

Microscopicamente, o CR é revestido por epitélio escamoso estratificado não ceratinizado, de espessura variável, que se encontra infiltrado por células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e linfócitos. O tecido conjuntivo circunjacente encontra-se focal ou difusamente infiltrado por células inflamatórias e quando há grande quantidade de plasmócitos podemos observar a presença de corpúsculos de Russel. Focos de calcificação distrófica, imagens negativas de cristais de colesterol e células gigantes multinucleadas podem ser visualizados na parede do cisto. Em alguns CRs podemos visualizar corpos hialinos, denominados corpúsculos de Rushton, caracterizados por laminações concêntricas e por vezes mineralizações basofílicas (NEVILLE et al., 2009; REGEZI; SCIUBA; JORDAN, 2008).

O diagnóstico diferencial radiográfico dos CRs deverá incluir o granuloma periapical, a displasia cemento-óssea periapical e cisto ósseo traumático. Em áreas tratadas anteriormente, deve-se considerar no diagnóstico diferencial a cicatriz periapical. O tratamento varia desde ações conservadoras como a endodontia à exodontia com curetagem

apical e cirurgia apical (apicectomia) (COHEN; BURNS, 2000; NEVILLE et al., 2009; REGEZI; SCIUBA; JORDAN, 2008).

2.1.3 Histogênese do CR e Mecanismo de formação cística

Muitos autores acreditam que os CRs originam-se de uma proliferação do epitélio contido em um granuloma periapical pré-existente ou dos remanescentes epiteliais do órgão dental, no caso dos cistos inflamatórios, os restos epiteliais de Malassez (BROWNE, 1975; CURY et al., 1998; FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; LIN et al., 1996; LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007; MEGHJI et al., 1996).

Durante a odontogênese, no final da fase de coroa, quando os eventos de diferenciação alcançam a região da alça cervical, os epitélios interno e externo proliferam para induzir a formação da raiz. Esta proliferação em direção apical dá origem a uma dobra que constitui o diafragma epitelial. A contínua proliferação epitelial nesta região dá origem a outra estrutura, denominada bainha radicular de Hertwig. Com o processo de diferenciação dos odontoblastos e formação da dentina da raiz surgem espaços, fenômeno denominado de fragmentação da bainha de Hertwig. A formação contínua da dentina da raiz aumenta progressivamente estes espaços e estas células se rompem dando origem a cordões celulares denominados de restos epiteliais de Malassez. Estes remanescentes epiteliais que permanecem na região do ligamento periodontal após o término da odontogênese, podem se tornar ativos e proliferar. Desta maneira, poderiam originar cistos periodontais, laterais ou apicais (KACTHBURIAN; ARANA, 2003).

As endotoxinas bacterianas oriundas de canais radiculares infectados são sugeridas como potentes iniciadores da lesão radicular. As bactérias e seus produtos exercem uma ação direta por intermédio da atividade mitogênica sobre as células epiteliais ou desempenham uma ação indireta pela produção de citocinas e fatores de crescimento que induzem a proliferação e diferenciação de restos epiteliais (CURY et al., 1998; FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; LIN et al., 1996; LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007; MEGHJI et al., 1996).

Os mecanismos responsáveis pela indução da proliferação epitelial e a biologia do processo de crescimento e expansão do cisto estão associados a eventos imunopatológicos (FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; LIN; HUANG;

ROSENBERG, 2007). Especula-se que os cistos se expandem por um processo de reabsorção óssea osteoclástica que pode ser favorecido por mediadores inflamatórios (prostaglandinas) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF). A maioria dos mediadores inflamatórios que medeia a proliferação de restos epiteliais, também favorece o processo de reabsorção óssea nas lesões periapicais (FUKADA et al., 2009; LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007).

A reação imune de defesa na região periapical é caracterizada por várias células inflamatórias, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, que sintetizam numerosos mediadores químicos como as interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), fator macrofágico estimulador de colônia (M-CSF), óxido nítrico (NO), interferons (IFNs), prostaglandinas (PGs) e metaloproteinases (MMPs) relacionados com a progressão e expansão da lesão (KAWASHIMA et al., 2007; VERNAL et al., 2006).

Para que ocorra a reabsorção óssea é necessário o recrutamento de osteoclastos para a região. As citocinas que estão associadas com o recrutamento e a diferenciação são chamadas de fatores ativadores de osteoclastos (*OAF – osteoclast-activation factor*). Entre elas podemos destacar a IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , TNF β , IL-6 e IL-11. A reabsorção óssea ativada por estas citocinas atua pela via das PGs ou por outras vias independentes de indução da atividade osteoclástica. Em humanos a IL-1 β constitui a citocina de maior importância na mediação da reabsorção óssea periapical (FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; STASHENKO; TELES; D’SOUZA, 1998). Estudos imuno-histoquímicos demonstram a presença de IL-1 α e IL-1 β no epitélio em proliferação de CRs, indicando que estas células secretam e respondem ao estímulo destas citocinas (FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999).

Várias citocinas produzidas nos CRs são capazes de induzir a osteólise pelo estímulo da ação osteoclástica no osso. A fonte destas citocinas podem ser macrófagos, linfócitos T e outros tipos celulares como fibroblastos, células endoteliais e ceratinócitos (FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999).

A formação dos cistos têm sido descrita em 3 fases: proliferação dos restos epiteliais sob influência de citocinas e fatores de crescimento liberados pela polpa necrótica; surgimento da cavidade revestida por epitélio por um mecanismo desconhecido; e, crescimento e expansão do cisto por um mecanismo ainda não compreendido. A teoria para o crescimento dos cistos que acredita na influência da pressão osmótica tem sido rejeitada em função do crescimento de teorias moleculares para a expansão do cisto (NAIR et al., 2008).

Dentro das teorias de formação da cavidade cística para os CRs, Browne (1975) cita que eles surgem quer pela degeneração das células centrais no processo de degeneração do

epitélio proliferante avascular, ou pela degeneração de áreas do tecido de granulação que se tornam revestida pelas células epiteliais proliferantes.

Diversas teorias tentam elucidar o processo de formação da cavidade cística. A teoria da deficiência nutricional acredita que as ilhas epiteliais proliferantes tornam-se grandes, de maneira que as células mais centrais perdem sua fonte de nutrição, sofrendo degeneração e necrose liquefativa com formação da cavidade. Os restos celulares decompostos promovem um aumento na concentração de proteínas o que favorece o transporte de fluido para o tecido conjuntivo adjacente, auxiliando no crescimento do cisto (FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007). Outra teoria seria a do abscesso, onde uma cavidade é formada no tecido conjuntivo periapical. O abscesso seria revestido por epitélio por conta da inclinação natural do epitélio escamoso estratificado em revestir superfícies conjuntivas expostas (NAIR et al., 2008). Uma terceira teoria seria a da fusão dos ninhos epiteliais formando uma massa tridimensional. Quando o tecido conjuntivo, aprisionado dentro da massa, degenera o cisto seria formado (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007). Nair et al. (2008) defendem a teoria do abscesso, uma vez que no seus experimentos realizado em roedores as células epiteliais proliferaram ao redor de um foco de inflamação aguda ou de um tecido necrótico. Embora haja diversas teorias para a formação da cavidade cística, não há evidências que suportem nenhuma delas.

2.2 Cistos dentígeros

2.2.1 Considerações iniciais

Os CDs são cistos odontogênicos do desenvolvimento caracterizados por uma radioluscência bem definida geralmente associada a coroa de um dente incluso, impedindo a sua erupção (GONDIM et al., 2008). Os CDs podem se originar de uma alteração do epitélio do órgão do esmalte, após a formação completa ou parcial da coroa dental, e está sempre associado a coroa de um dente incluso, unido ao dente na junção cimento-esmalte, podendo eventualmente estar associado a um odontoma complexo ou a um dente supranumerário (GODOY et al., 2004). Evidências indicam que o epitélio reduzido do órgão do esmalte seja o responsável pela formação do CD (BROWNE, 1975).

Entre os cistos odontogênicos ocorre com uma frequência de 34%, sendo comum na segunda e terceira décadas da vida, havendo uma leve predileção pelo gênero masculino. É o segundo mais comum dos cistos odontogênicos (NEVILLE et al., 2009). Jones, Craig e Franklin (2006) encontraram 18.1% dos casos com diagnóstico de CD, já Grossman et al. (2007), encontraram 25,3% dos casos com este diagnóstico. Sousa, Souza, Pereira Pinto (1994) estudaram 102 casos de CDs e observaram que a lesão ocorreu com uma maior frequência nas três primeiras décadas da vida, havendo uma leve predileção pelo gênero masculino, e com um maior acometimento na raça branca. Estes autores apontam como a localização anatômica mais comum, a região de terceiros molares inferiores e caninos superiores.

Apesar da maioria dos CDs serem considerados de desenvolvimento, alguns casos apresentam características de patogênese inflamatória, como por exemplo, aqueles cistos que se desenvolvem subjacente a dentes decíduos com lesões radiculares ou em terceiros molares inferiores parcialmente erupcionados que desenvolvem lesões císticas ao longo da face distal ou vestibular (NEVILLE et al., 2009). Os CDs inflamados são encontrados na dentição mista e geralmente no gênero masculino na idade de 6 a 12 anos, com maior ocorrência na mandíbula principalmente em região de pré-molar e molares (GODOY et al., 2004).

2.2.2 Características clínicas radiográficas e histopatológicas

Os CDs são, em sua maioria, assintomáticos e normalmente descobertos em exames radiográficos de rotina. Alguns podem assumir tamanhos consideráveis capazes de causar assimetria facial e dor. Geralmente estão associados a terceiros molares e caninos superiores, e apresentam como sinal um retardo na erupção dentária (GONDIM et al., 2008; NETO et al., 2004). Radiograficamente, o CD apresenta-se como uma lesão radiolúcida unilocular bem definida e muitas vezes esclerótica, associada à coroa de um dente não-erupcionado. A relação do cisto com a coroa do dente pode apresentar três variações: a central que é a mais comum, o cisto circunda a coroa do dente; a lateral, na maioria das vezes associada a um terceiro molar incluso, o cisto cresce lateralmente à porção radicular do dente; e a circunferencial, no qual o cisto circunda a coroa e se estende ao longo da raiz. O diagnóstico deve ser feito com base nos critérios clínicos, radiográficos e histopatológicos (GODOY et al., 2004; GONDIM et al., 2008; NETO et al., 2004; REGEZI; SCIUBA; JORDAN, 2008).

O exame histopatológico revela um revestimento epitelial escamoso estratificado do lúmen cístico e uma cápsula fibrosa de tecido conjuntivo frouxo com infiltrado inflamatório variável e podendo conter ilhas e cordões de epitélio odontogênico. Na cápsula podemos visualizar áreas de hemorragia, deposição por hemossiderina e imagens negativas de cristais de colesterol. Em um CD não-inflamado, o revestimento epitelial é não ceratinizado e tende a possuir de 4 a 6 camadas de células de espessura. Ocasionalmente, células mucosas e células claras podem ser encontradas no limitante epitelial, além de intenso extravasamento hemorrágico. A junção epitélio-conjuntivo é geralmente plana. O conteúdo cístico, quando visualizado, é caracterizado por um exsudato seroso que pode conter eventualmente células epiteliais e células inflamatórias (GONDIM et al., 2008; NEVILLE et al., 2009; REGEZI; SCIUBA; JORDAN, 2008).

O diagnóstico diferencial inclui o folículo dentário, o tumor odontogênico ceratocístico, ameloblastoma e outros tumores odontogênicos como o tumor odontogênico adenomatóide. O tratamento dos CDs geralmente inclui a enucleação do cisto e remoção do dente incluso. Outro tratamento mais conservador utilizado é a marsupialização do cisto a fim de permitir a decompressão e a redução da lesão, diminuindo a extensão da cirurgia a ser realizada em um segundo tempo (GONDIM et al., 2008; REGEZI; SCIUBA; JORDAN, 2008). O tratamento para CD depende do dente acometido, da idade do paciente e do tamanho de sua extensão. Proservação clínica e radiografia periódica são recomendadas. O prognóstico para o CD é excelente, raramente ocorrendo sua recorrência após sua remoção completa (NEVILLE et al., 2009).

Complicações de um CD não tratado incluem a transformação ameloblastomatosa e carcinomatosa do revestimento epitelial. O CD é capaz de se transformar em uma lesão agressiva. Alguns estudos apontam que ameloblastomas e carcinomas intra-ósseos originam-se de CD pré-existentes (HOLMLUND et al., 1991). De acordo com Osion et al. (2000), aproximadamente 22 a 25% dos carcinomas odontogênicos são originados em CDs.

2.2.3 Histogênese do CD

A origem do CD vem sendo extensamente estudada. Algumas lesões se desenvolvem precocemente na odontogênese, pela degeneração do retículo estrelado, e o dente envolvido desenvolve hipoplasia do esmalte. Porém, na maioria dos casos, a coroa do dente envolvido já

está completamente formada, o que sugere o acúmulo de líquido entre o epitélio reduzido do órgão do esmalte (EROE) e a coroa do dente envolvido (NEVILLE et al., 2009).

O EROE cobre a coroa de um dente não erupcionado. Como a coroa do dente se projeta dentro da cavidade do CD, e o revestimento cístico está associado à coroa do dente na junção amelo-cementária, acredita-se no acúmulo de líquido nesta região. Após a formação da coroa, o EROE consiste de uma camada simples de células cuboidais ou colunares. Durante o processo de erupção, estas células assumem uma aparência escamóide. No momento em que ocorre a impactação dentária e ocorre uma falha na erupção, esta mudança se torna mais marcante e o epitélio assume características de epitélio escamoso estratificado. Há evidências que sugerem que a fixação do epitélio reduzido do esmalte à superfície do dente torna-se mais fraca após as alterações escamosas. Pode-se esperar assim que a formação dos CDs é uma seqüela de um dente com erupção impedida o que ocorreria após a mudança escamóide do epitélio (BROWNE, 1975).

Três teorias tentam explicar a etiologia dos CDs. A primeira e mais aceita, sugere que o acúmulo de fluido entre o epitélio reduzido do órgão do esmalte e a coroa do dente permanente ocorre como resultado da pressão exercida pela erupção dentária no folículo dentário. O acúmulo de líquido ocorreria pela saída de exsudato dos capilares como consequência da obstrução do retorno venoso. A segunda teoria sugere que na sua trajetória de erupção, o dente permanente encontra um cisto radicular oriundo do seu antecessor decíduo. Já a terceira teoria afirma que o CD poderia ser causado por inflamação do tecido radicular devido a uma infecção periapical originada do seu antecessor decíduo, que atingiria e estimularia o desenvolvimento do germe dental proporcionando acúmulo de líquido. Embora numerosas teorias tentem explicar a origem do CD nenhuma delas é considerada correta e sua etiologia permanece incerta (GONDIM et al., 2008).

O estímulo para a proliferação epitelial nestas lesões ainda não está bem definido. Mudanças inflamatórias não são tão marcantes na parede destes cistos e são menos propensas a gerar estímulos proliferativos, devido ao fato da atividade mitótica no revestimento epitelial dos CDs ser baixa quando comparada à dos CRs. Esta baixa atividade mitótica do epitélio cístico dos CDs se deve provavelmente ao seu epitélio de origem (EROE) que se encontra em estado de baixa atividade metabólica (BROWNE, 1975). Dentro desta perspectiva, pode-se especular que a pressão exercida pelo acúmulo de líquido poderia levar à liberação de citocinas e fatores de reabsorção pelas células adjacentes, capazes assim de não apenas reabsorver o osso adjacente, mas também de levar à proliferação dos restos epiteliais.

2.3 Tecido ósseo – considerações gerais

O osso é um tecido conjuntivo composto principalmente pela parte inorgânica (cristais de hidroxiapatita - 65%) e parte orgânica (35%). O componente inorgânico confere força e rigidez, além de funcionar como depósito de íons importantes como cálcio, fósforo e magnésio. O componente orgânico inclui as células ósseas, como as osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos, e proteínas da matriz como colágeno tipo 1, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea e proteoglicanas. A maioria destas proteínas são secretadas e depositadas por osteoblastos (KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

As células progenitoras são células tronco-mesenquimais pluripotentes localizadas na superfície óssea e quando estimuladas sofrem divisão celular e se diferenciam em osteoblastos. O processo de diferenciação osteoblástica é iniciado e dirigido pelo fator de transcrição nuclear de ligação do fator $\alpha 1$ (cbfa1) que ativa a expressão do gene osteoblasto-específico. Os osteoblastos são células que sintetizam e armazenam diversas proteínas e iniciam o processo de mineralização. Eles expressam receptores celulares de superfície que se ligam a diversos hormônios, citocinas, fatores de crescimento e proteínas extracelulares da matriz (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005) (Figura 1).

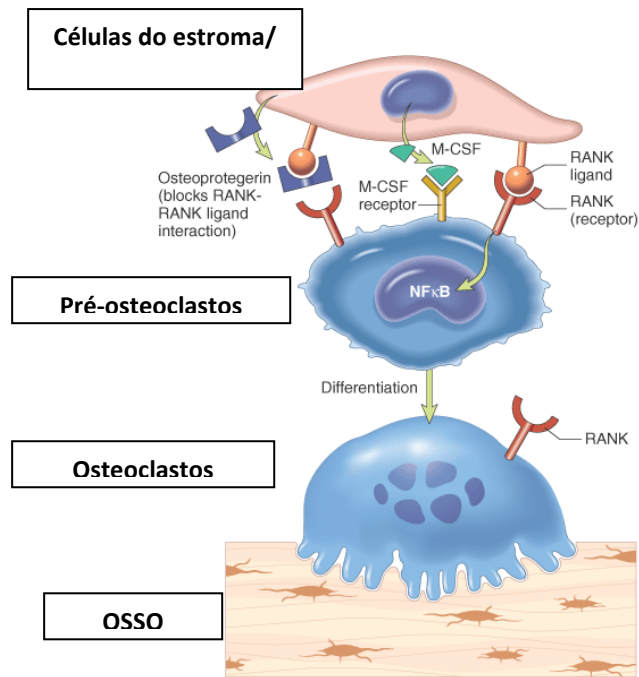


Figura 1 Papel dos osteoblastos na diferenciação dos osteoclastos (adaptado de KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005)

O osteoclasto é a célula responsável pela reabsorção óssea. Ele é derivado de células progenitoras hematopoiéticas de linhagem monocítica-macrofágica (AESCHLIMANN; EVANS, 2004). As citocinas e fatores de crescimento para a diferenciação e maturação dos osteoclastos em humanos incluem a IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, TNF, fator estimulante de colônias granulocítica-macrofágica (FSC-GM) e fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF). Além de estimular a proliferação celular, os fatores de crescimento podem ter efeito na locomoção, contratilidade, diferenciação e angiogênese celulares. Estes fatores de crescimento atuam na osteoclastogênese pela estimulação de células progenitoras ou por um sistema parácrino, essencial para o metabolismo ósseo, onde os osteoblastos e células progenitoras desempenham um papel central por meio de mediadores como RANK, RANKL e OPG (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Todos os fatores de crescimento atuam por ligações a receptores específicos, que distribuem sinais às células-alvo. Estes sinais têm dois efeitos: estimulam a transcrição de muitos genes que estavam silenciosos, e vários desses genes regulam a entrada das células no ciclo celular e sua passagem através dos vários estágios deste ciclo. A sinalização parácrina funciona de modo que um tipo de célula produz o ligante, o qual atua nas células-alvo adjacentes que expressam os receptores apropriados. Neste tipo de sinalização, a interação

receptor-ligante é dependente e promove adesão célula-célula (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A ligação de um ligante ao seu receptor deflagra uma série de eventos de modo que os sinais extracelulares atuam na célula e modulam alterações na expressão gênica. Uma forma comum de ligação receptor-ligante inclui a dimerização ou trimerização das moléculas receptoras. Os receptores estão normalmente localizados na superfície das células, mas podem também ser encontrados no citoplasma ou no núcleo. O complexo receptor-ligante pode iniciar respostas celulares múltiplas ou específicas. Muitos dos sistemas de transdução de sinais utilizados por fatores de crescimento transferem informações ao núcleo e modulam a transcrição do gene através de fatores de transcrição como a *c-MYC* e *c-JUN*. Os eventos celulares que requerem respostas rápidas dependem de modificações pós-translacionais que causam a ativação do fator de transcrição e migração para dentro do núcleo. Estas modificações incluem a heterodimerização, fosforilação de fatores disponíveis, e a liberação da inibição para permitir a migração nuclear (NFκB) (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

O osso é um tecido dinâmico que é permanentemente remodelado num mecanismo intrínseco que integra estímulos externos químicos, hormonais e biomecânicos. Em nível celular, a remodelação óssea permite um sequência de ciclos repetitivos de reabsorção óssea por osteoclastos derivados de células de linhagem macrofágica, seguido por formação óssea guiadas por células-tronco mesenquimais. A maioria das doenças ósseas é causada por um distúrbio no número e atividade das células osteoclásticas, resultando em inapropriada perda óssea que excede a capacidade compensatória dos osteoblastos. (AESCHLIMANN; EVANS, 2004; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; KHOSLA, 2001; VEGA; MAALOUF; SAKHAEI, 2007). O aumento da atividade osteoclástica é vista em numerosas desordens osteopênicas como a osteoporose pós menopausa, Doença de Paget, metástases ósseas e artrite reumatóide (FUKADA et al., 2009).

Os osteoblastos possuem um papel central no controle hormonal da osteoclastogênese e na reabsorção óssea (BAUD'HUIN et al., 2007; DOUGALL; CHAISSON, 2006; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; KHOSLA, 2001). Em resposta a vários fatores osteotrópicos, os osteoblastos induzem a expressão do fator de diferenciação osteoclástica (ODF), ou RANKL, uma citocina de membrana. Os pré-osteoclastos reconhecem o RANKL nos osteoblastos e, por meio de uma interação célula-célula diferenciam-se em osteoclastos (Figura 1) (KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; KHOSLA, 2001).

Citocinas, hormônios e outros fatores osteotrópicos que regulam a formação e ativação osteoclástica e por extensão a remodelação óssea normal incluem fator estimulador de colônia

de macrófagos (M-CSF), TNF, prostaglandinas (PGs), paratormônio (PTH), proteína relacionada ao hormônio da paratireóide (PTHrP) e ILs-1, 6, 11. O mecanismo pelo qual estes fatores regulam a osteoclastogênese é via super expressão de RANKL nos osteoblastos e pré-osteoclastos, e/ou pela diminuição da expressão de OPG (DOUGALL; CHAISSON, 2006).

2.4 RANK

RANK é um receptor transmembrana (de superfície celular) do tipo 1 da família do TNF que está presente em células precursoras de osteoclastos, células dendríticas, fibroblastos e células T. RANK humano é um peptídeo de 616 aminoácidos. A ativação do RANK pelo RANKL é seguida por sua interação com membros da família dos receptores associados ao TNF (TRAF), ativação do NF- κ B e c-Fos que estão relacionados com o processo de maturação osteoclástica (KHOSLA, 2001). Quando ativado promove a maturação dos osteoclastos pelo aumento da expressão de genes específicos (ANDRADE et al., 2008; HOFBAUER, 2006; KHOSLA, 2001; MENEZES et al., 2006;).

A cascata de sinalização do RANK é complexa e pouco compreendida e seu papel na osteoclastogênese e na proliferação de células tumorais está sendo investigado na tentativa de descobrir um futuro alvo para as terapias anti-tumorais (BOYCE; XING, 2008).

2.5 RANKL

RANKL é um peptídeo de 317 aminoácidos da família do TNF expresso de forma distinta como uma citocina de membrana celular ou liberado como fator solúvel por diversos tipos celulares, como linfócitos T e osteoblastos (BOYCE; XING, 2008; HOFBAUER, 2006; TYROVOLA et al., 2008). Enquanto a forma ligada à superfície celular é mais comum e expressa por vários tipos celulares, a forma secretada é limitada às células T ativadas e linhagens celulares de carcinoma de células escamosas (HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; TYROVOLA et al., 2008; WITTRANT et al., 2004).

RANKL, também denominado ligante da osteoprotegerina (OPGL), ODF ou citocina indutora de ativação relacionado ao TNF (TRANCE), atua como ligante da OPG e

desempenha atividade imuno-modulatória, uma vez que camundongos deficientes em RANKL desenvolvem agenesia de linfonodos e hipoplasia do timo. O RANKL é considerado um estimulador de células dendríticas, agindo e atuando como um fator de sobrevivência para células dendríticas e modulando a ativação de células T maduras. Estas atividades são associadas com a ativação do NF- κ B após a ligação do RANKL ao seu receptor de membrana RANK (BAUD'HUIN et al., 2007; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001).

Os efeitos biológicos do RANKL são produzidos quando ele se liga ao RANK na superfície dos pré-osteoclastos resultando na fusão, diferenciação, ativação e sobrevivência de osteoclastos (ANDRADE et al., 2008; DOUGALL; CHAISSON, 2006; MENEZES et al., 2006; TYROVOLA et al., 2008). Na presença de concentrações permissivas de M-CSF, RANKL estimula a diferenciação, proliferação, fusão e ativação de células de linhagem osteoclástica, resultando no aumento de osteoclastos ativos e em reabsorção óssea (KHOSLA, 2001; TYROVOLA et al., 2008).

A expressão de M-CSF por osteoblastos é requerida para que as células progenitoras se diferenciem em osteoclastos; a célula sozinha é incapaz de completar este processo. M-CSF ligado à seu receptor (rM-CSF ou c-Fms) funciona como um sinal primário para o desenvolvimento de osteoclastos. A completa diferenciação dos osteoclastos requer a expressão de RANKL pelas células osteoblásticas e de RANK pelos percussores osteoclásticos (Figura 2) (BOYCE; XING, 2008; KHOSLA, 2001).

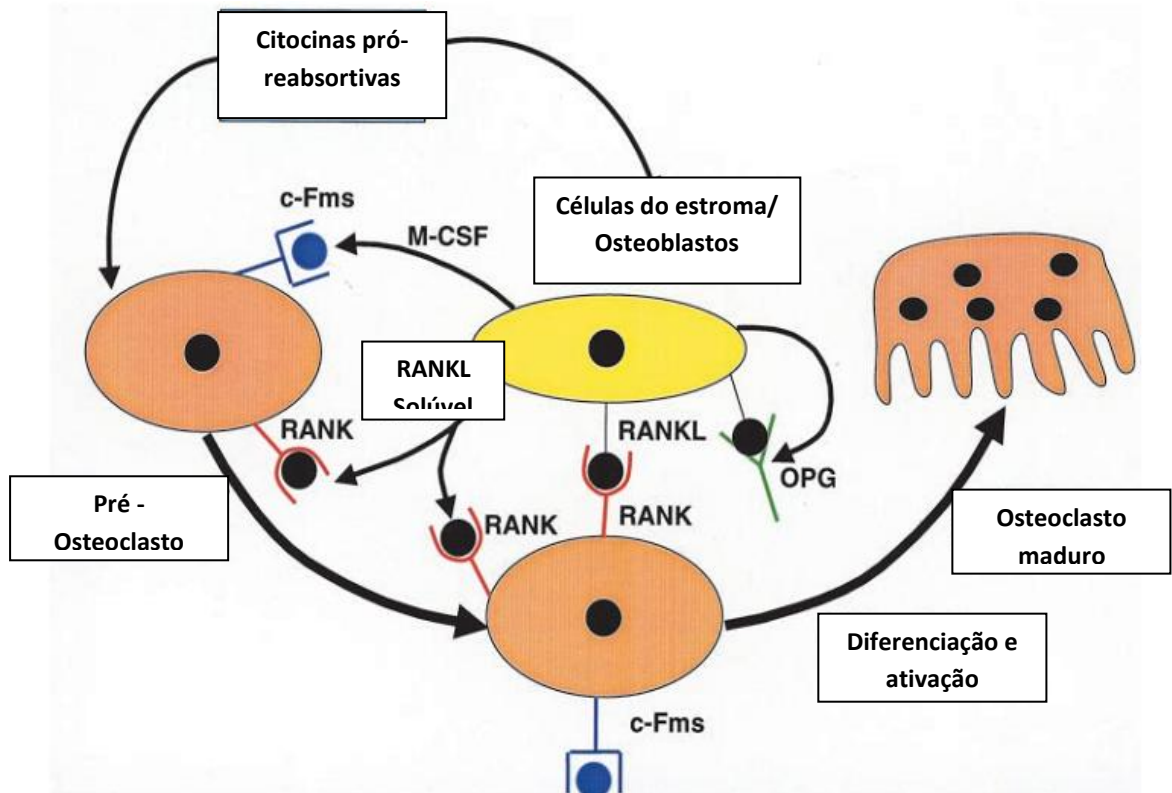


Figura 2 Regulação da osteoclastogênese (adaptado de KHOSLA, 2001)

Experimentos *in vivo* com RANKL promovem a ativação de osteoclastos, ocasionando perda óssea e causando severa hipercalcemia, enquanto a deleção de RANKL resulta na ausência de osteoclastos maduros e subsequente desenvolvimento de osteopetrose. Deleção de RANK em roedores gera um fenótipo idêntico ao dos animais deficientes em RANKL. Estes achados demonstram que o RANKL é um fator pró-reabsortivo (BAUD'HUIN et al., 2007; HOFBAUER, 2006).

A resposta celular do RANKL depende da presença do receptor inibitório, OPG, assim como do nível de expressão do seu receptor RANK, que é primariamente expresso em células de linhagem macrofágica/monocítica, incluindo precursores osteoclásticos, células T e B, células dendríticas e fibroblastos (ANDRADE et al., 2008). RANKL ativa seu receptor específico RANK e sinaliza uma cascata de sinais que envolvem a estimulação de c-jun, NF- κ B, e quinase serina/treonina (PKB/Akt) que estão relacionados com a proliferação, diferenciação e apoptose celular (HOFBAUER; HEUFELDER, 2001).

Os efeitos do RANKL são contrários aos da osteoprotegerina (OPG). RANKL e OPG são regulados por vários hormônios (glicocorticóides, vitamina D, estrógeno), citocinas (fator

de necrose tumoral alfa, interleucinas 1, 4, 6, 11, e 17), e vários fatores transcripcionais mesenquimais (como cbf-a, por exemplo) (HOFBAUER; HEUFELDER, 2001).

2.6 OPG

O maior inibidor da osteoclastogênese foi identificado simultaneamente em 1997-1998 pelo grupo Tsudas e companhia Amgen (BAUD'HUIN et al., 2007; BOYCE; XING, 2008; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001). Eles nomearam respectivamente este novo regulador negativo da diferenciação osteoclástica como fator inibitório da osteoclastogênese (OCIF) ou osteoprotegerina (OPG). A OPG é um peptídeo de 380 aminoácidos que pertence a família de receptores do TNF, e em contraste com todos os outros receptores TNF carecem de domínios citoplasmáticos e de membrana e são secretados como proteínas solúveis (KHOSLA, 2001; TYROVOLA et al., 2008).

OPG é um receptor solúvel que atua como antagonista do RANKL (KHOSLA, 2001). É produzido por numerosos tipos celulares, incluindo células imunes, osteoblásticas e endoteliais. É considerado um receptor inibitório para RANKL, pois bloqueia a interação RANK/RANKL, inibindo o estágio terminal de diferenciação osteoclástica e, assim resultando numa diminuição da reabsorção óssea (BAUD'HUIN et al., 2007; HOFBAUER, 2006).

Estudos *in vitro* demonstram que os efeitos da OPG incluem inibição da diferenciação, sobrevivência e fusão osteoclástica; assim como, a estimulação da apoptose de osteoclastos, reduzindo desse modo a capacidade de reabsorção óssea (HOFBAUER, 2006; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; KHOSLA, 2001; TYROVOLA et al., 2008). Super-expressão de OPG em camundongos ou administração de OPG em roedores inibe a osteoclastogênese, ativação de osteoclastos e a reabsorção óssea, resultando em um fenótipo osteopetrótico. Por outro lado, a deleção de OPG foi associada com acentuada osteoclastogênese, aumento da reabsorção óssea e osteoporose massiva (HOFBAUER, 2006; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; KHOSLA, 2001).

O papel da OPG foi demonstrado por intermédio de experimentos com camundongos transgênicos e *knock-out*. Camundongos *knock-out* em OPG desenvolviam uma grande diminuição da densidade e do volume ósseo e sofriam de osteoporose associado com uma alta incidência de fraturas e deformidade nas vértebras. Esta osteoporose induzida era totalmente

revertida pela injeção intravenosa de OPG recombinante. Isto demonstra que a presença da OPG é essencial para a manutenção da massa óssea em situações fisiológicas funcionando como um poderoso agente osteoprotetivo (BAUD'HUIN et al., 2007; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002).

O papel osteoprotetor da OPG também tem sido suportado pela deleção parcial da OPG em pacientes com Doença de Paget juvenil, uma doença autossômica recessiva onde os indivíduos afetados têm um aumento na remodelação óssea, osteopenia e fraturas (BOYCE; XING, 2008). Um aumento da atividade do RANKL, associado a uma diminuição da atividade regulatória da OPG, tem sido implicado em diversas doenças como osteoporose, artrite reumatóide e doença periodontal. (ANDRADE et al., 2008; SILVA et al., 2008; HOUFBAUER; HEUFELDER, 2001; MENEZES et al., 2006; VERNAL et al., 2006).

2.7 RANK/RANKL/OPG

RANK, RANKL, e OPG são reguladores chave na biologia dos osteoclastos e no metabolismo ósseo. RANKL interage com seu receptor RANK localizado nos osteoclastos e células dendríticas, e ativa os sinais c-jun, NF κ B e serina/treonina quinase PKB/Akt que estão relacionados com o processo de diferenciação, proliferação e apoptose celular. Os efeitos do RANKL são bloqueados por receptores solúveis como a OPG. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que RANK/RANKL/OPG são essenciais para a vida dos osteoclastos e ainda, como mediadores de doenças ósseas, sendo importantes alvos moleculares para o diagnóstico e intervenção terapêutica (HOFBAUER; HEUFELDER, 2001).

Chuang et al. (2009) foram os primeiros a relatarem a expressão de RANK, RANKL e OPG em carcinoma de células escamosas (CCE) oral. Utilizando amostras de CCE sem invasão de osso e com invasão do osso e comparando com amostras de mucosa oral normal encontraram imunomarcagem citoplasmática para RANK e RANKL para as células cancerosas de ambos os grupos. No entanto, para a OPG observou-se fraca ou ausente imunomarcagem.

Andrade et al. (2008) avaliaram a expressão destes marcadores no epitélio e no estroma de tumores odontogênicos não encontrando diferenças na imunexpressão epitelial entre as lesões. No estroma, obtiveram resultados divergentes com um grupo de lesões apresentando relação onde os valores de OPG eram maiores comparados aos de RANKL (tumor odontogênico cístico calcificante e tumor odontogênico adenomatóide); e, no outro

grupo, níveis de RANKL maiores que os da OPG (tumor odontogênico epitelial calcificante, mixoma odontogênico e fibroma ameloblástico), indicando que a presença de imunopositividade para estes marcadores poderia estar relacionada com o processo de invasão e reabsorção óssea tumoral. Silva et al. (2008) encontraram na maioria das suas amostras de ameloblastomas níveis de RANKL maiores que da OPG. Em contrapartida, Kumamoto e Ooya (2004) encontraram níveis de OPG superiores aos do RANKL nas células tumorais dos ameloblastomas.

Em diversos modelos animais de doenças ósseas malignas e benignas, a administração da proteína OPG ou de RANK solúvel foi capaz de neutralizar o RANKL e assim, prevenir a reabsorção óssea e reduzir a perda óssea (KHOSLA, 2001).

A razão RANKL/OPG pode ser usada como marcador biológico de prognóstico em patologias ósseas como a osteoporose, espondilite aquilosa, artrite reumatóide, tumores ósseos benignos e osteólise associada a perdas protéticas e fraturas ósseas. Este índice pode também ser importante para avaliação de novas drogas contra doenças ósseas e como terapia para patologias ósseas (BAUD'HUIN et al., 2007).

Anormalidades na razão RANKL/OPG têm sido implicadas na patogênese da osteoporose pós menopausa, artrite reumatóide, doença de Paget, doença periodontal, tumores ósseos benignos e malignos, metástases ósseas e hipercalcemia maligna. (HOFBAUER; HEUFELDER, 2001).

RANKL e OPG são também importantes reguladores da biologia vascular, calcificação e formação das glândulas mamárias durante a gravidez, indicando seu papel crucial no manejo do cálcio extra-esquelético (HOFBAUER; HEUFELDER, 2001).

Estudos recentes têm confirmado que RANKL e OPG podem ser detectados no fluido crevicular gengival e indicam que o nível de RANKL é aumentado enquanto que o de OPG é diminuído em periodontites ou durante a movimentação ortodôntica. Um aumento na razão RANKL/OPG pode indicar destruição óssea. Isto está hipotetizado, por exemplo, pelo aumento desta relação no fluido gengival crevicular de pacientes com periodontites (CROTTI et al., 2003; BOSTANCI et al., 2007).

2.8 RANK/RANKL/OPG em CRs e CDs

A atividade macrofágica é associada com o desenvolvimento de lesões no periápice e com a destruição óssea por meio da secreção de citocinas ósseo-reabsortivas. Os macrófagos são considerados a maior fonte de citocinas, (IL-1 α , TNF α e IL-1 β), metaloproteinases e prostaglandinas, que contribuem para o processo inflamatório e o resultado destrutivo destas lesões (VERNAL et al., 2006).

Citocinas inflamatórias e lipopolissacarídeos (LPS) estão diretamente envolvidos na diferenciação e função osteoclástica. A IL-1 estimula diretamente a função osteoclástica via estimulação de RANKL. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) estimula a diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos na presença de M-CSF (KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; KAWASHIMA et al., 2007). Ambas as citocinas, Th1 pró-inflamatória e Th2 anti-inflamatória, podem modular a expressão de IL-1 e ativar macrófagos. A IL-6 estimula a reabsorção óssea, enquanto IL-4 e INF- γ exercem um efeito inibitório na reabsorção óssea. IL-4 suprime a síntese de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 e TNF- α , que promovem reabsorção óssea (FUKADA et al., 2009; HREN; IHAN 2009).

O mecanismo preciso de destruição óssea inflamatória nas lesões periapicais permanece incerto. A expressão do RANKL é observada em lesões periapicais, e a cinética das células que expressam RANKL é semelhante àquelas dos osteoclastos das lesões periapicais em roedores. Kawashima et al. (2007) encontraram níveis aumentados do RANKL em lesões periapicais, duas semanas após a indução da exposição pulpar em dentes de roedores. Quando avaliada a razão RANKL/OPG houve um aumento da relação na segunda e terceira semana. Este aumento da expressão de RANKL associado ao início do processo de reabsorção óssea nas lesões periapicais sugere que o RANKL induz a diferenciação de osteoclastos que são as células responsáveis pela destruição óssea. O aumento da expressão de RANK, também observado após duas semanas da exposição pulpar, sugere o aumento da presença de células osteoclásticas e seus precursores expressando receptores RANK. A cinética de expressão de RANKL acompanhada pela expressão de OPG, RANK e diversas outras citocinas vem sendo pouco avaliada.

Menezes et al. (2006) encontraram imunomarcagem positiva para RANKL e OPG em neutrófilos, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais e linfócitos presentes em CRs. Com base nos padrões de expressão de RANKL/OPG em diferentes condições fisiológicas e patológicas, sugere-se que sítios com reabsorção óssea ativa apresentam um padrão

diferencial de expressão de RANKL/OPG quando comparado com sítios onde a reabsorção óssea é ausente ou mínima. Em condições inflamatórias, há um desequilíbrio nos níveis RANKL/OPG levando a excessiva atividade osteoclástica e consequente reabsorção óssea patológica (Figura 3) (MENEZES et al., 2008).

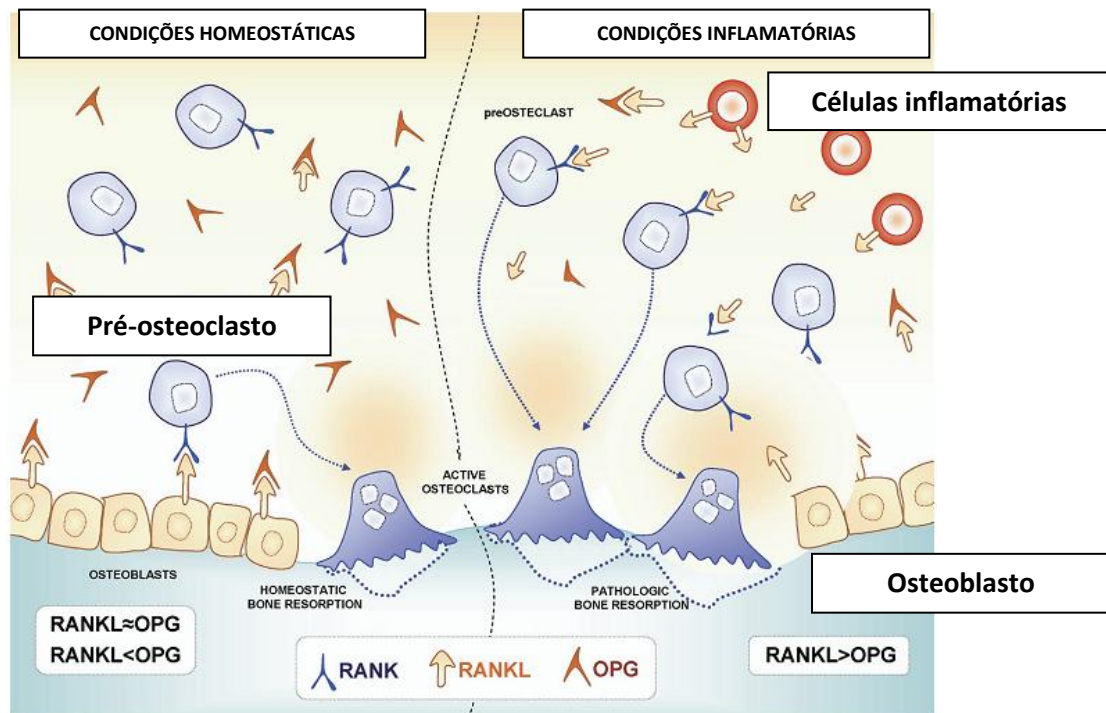


Figura 3 Papel do RANK, RANKL e OPG na osteoclastogênese em condições homeostáticas e inflamatórias (adaptado de MENEZES et al., 2008)

Um grande número de citocinas pré-reabsorptivas como $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 , modulam este sistema inicialmente pela estimulação da produção de M-CSF e pelo aumento direto na expressão de RANKL. Adicionalmente, outras numerosas citocinas e hormônios como $\text{TGF-}\beta$ (aumenta a produção de OPG), PTH (aumenta RANKL e diminui OPG), 1,25-dihidroxitamina D3 (aumenta a produção de RANKL), glicocorticóides (aumenta a produção de RANKL e diminui a de OPG) e estrógeno (aumenta produção de OPG), exercem seus efeitos na osteoclastogênese pela regulação da produção de OPG e RANKL pelos osteoblastos (KHOSLA, 2001; TAY et al., 2004).

Metabólitos do ácido araquidônico (via ciclooxigenase – prostaglandinas (PGs) e tromboxanos; e via lipooxigenase – leucotrienos) são encontrados em cistos dentígeros e cistos radiculares. As PGs e o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), produzidos por

macrófagos ativados, são reconhecidos por estimular a reabsorção óssea através do aumento da expressão do RANKL em osteoblastos e células estromais (TAY et al., 2004). A identificação do RANKL nestes dois tipos de células sugere sua atuação como mediador da osteoclastogênese e emerge como uma nova área para a investigação da biologia óssea nestas doenças.

Tay et al. (2004) mostraram imunexpressão de RANKL em lesões osteolíticas faciais principalmente nas células dispersas no estroma (pré-osteoblastos), inclusive em células endoteliais. Menezes et al. (2006) analisaram a expressão imuno-histoquímica de RANKL e OPG em CR e granulomas periapicais e encontraram uma maior imunomarcagem em células de linhagem monocítica-macrofágica, no entanto, fibroblastos, neutrófilos polimorfonucleares e células endoteliais também exibiram imunopositividade. No caso dos CRs, houve também imunomarcagem para as células epiteliais. Os níveis de RANKL foram maiores quando comparados com os de OPG, o que de certa forma é esperado nos casos de lesões osteolíticas. A razão RANKL/OPG não foi estatisticamente significativa e os níveis de RANKL e OPG em CR foram menores quando comparados com os níveis em granulomas periapicais. Estes autores sugerem que um aumento na razão RANKL/OPG nestas lesões estaria diretamente relacionado com o processo de destruição óssea.

Vernal et al. (2006) e Menezes et al. (2008) encontraram altos níveis do RANKL e atividade monocítica durante a destruição óssea no granuloma periapical. Estes autores acreditam que o RANKL desempenha um papel chave nos eventos patológicos associados com destruição óssea periapical e os métodos de controle da atividade do RANKL podem ser úteis para o tratamento destas patologias.

Silva et al. (2008) analisaram a expressão imuno-histoquímica de RANKL e OPG no epitélio e nas células mesenquimais de CD. No epitélio encontraram uma distribuição similar relativa aos casos, onde a 42,9% das células imunopositivas apresentavam uma relação onde $OPG=RANKL$ e, em outros 42,9% uma relação $OPG<RANKL$. Já no estroma encontraram em 100% dos casos níveis de $OPG>RANKL$. Concluíram assim, que estas diferenças entre a imunomarcagem destas proteínas na cápsula dos CDs principalmente em fibroblastos, células endoteliais, células ósseas precursoras e osteoclastos identifica estes tipos celulares como importantes fonte destas moléculas.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O propósito deste estudo é avaliar e comparar a expressão imuno-histoquímica do RANK, RANKL e OPG entre cistos radiculares e cisto dentígeros com o objetivo de compreender o papel e o comportamento destas proteínas, buscando elucidar os principais mecanismos regulatórios responsáveis pelo processo de reabsorção óssea nestas lesões.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização do estudo

Este estudo observacional retrospectivo caracterizou-se por uma análise descritiva dos dados clínicos assim como uma análise comparativa da expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores RANK, RANKL e OPG no epitélio e cápsula de cistos radiculares e cistos dentígeros.

4.2 População

Foram selecionados casos de cistos radiculares e cistos dentígeros pertencentes ao arquivo do serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN, Brasil.

4.3 Amostra

A amostra do estudo foi constituída por 40 espécimes fixados em formol 10% e incluídos em parafina, obtidos e selecionados de todos os casos registrados no serviço de Patologia Oral da UFRN, sendo 20 espécimes de cistos radiculares e 20 espécimes de cistos dentígeros.

4.4 Critérios de seleção da amostra

4.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostras os espécimes de cisto radicular e cisto dentífero que continham informações sobre dados clínicos, radiográficos, e que exibiam características histológicas bem definidas pertinentes a cada lesão, sendo a presença do revestimento epitelial e cápsula critérios para inclusão na amostra para o estudo imuno-histoquímico.

4.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os espécimes com material insuficiente para análise imuno-histoquímica, os casos de CD que apresentaram intenso infiltrado inflamatório na cápsula cística e os casos que não apresentavam informações relativas aos dados radiográficos da lesão.

4.5 Estudo morfológico

Para o estudo morfológico, examinaram-se sob microscopia de luz (OLIMPUS CH30), as lâminas que haviam sido submetidas previamente a cortes histológicos de 5µm de espessura e coradas pela técnica da hematoxilina/eosina. As características morfológicas analisadas para a seleção dos casos foram: tipo de revestimento epitelial; cápsula; e presença ou ausência de infiltrado inflamatório.

4.6 Coleta dos dados clínicos

Após a seleção dos casos, os dados dos pacientes foram coletados por meio de uma ficha clínica (Apêndice A), que continha informações sobre gênero, idade, bem como localização, sintomatologia, aspecto radiográfico e diagnóstico histopatológico. Os dados foram obtidos das fichas que acompanham o material para exame anátomo-patológico.

4.7 Estudo imuno-histoquímico

Para o estudo imuno-histoquímico os espécimes emblocados em parafina foram submetidos a cortes de 3 μ m de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA*). A técnica imuno-histoquímica empregada foi a da estreptoavidina-biotina (LSAB- *Labeled Streptavidin Biotin*). Os cortes foram submetidos aos anticorpos policlonais anti-RANK, anti-RANKL, anti-OPG (Quadro 1).

Quadro 1 Especificidade, recuperação antigênica, diluição, tempo de incubação e fabricante dos anticorpos utilizados

Especificidade	Clone	Recuperação antigênica	Diluição	Tempo de incubação
Anti-RANKL*	N-19	Citrato pH6.0 Pascal	1:200	Overnight
Anti-RANK*	C-20	Citrato pH6.0 Pascal	1:200	Overnight
Anti-OPG*	N-20	Citrato pH6.0 Pascal	1:200	Overnight

*Fabricante: Santa Cruz Biotechnology®

4.7.1 Coloração pelo método imuno-histoquímico

Como controle positivo para os anticorpos foram utilizados cortes histológicos de lesões centrais de células gigantes. Para o controle negativo foi feita a omissão do anticorpo primário. A técnica que foi utilizada seguiu o seguinte protocolo:

- 1) Desparafinização: 2 banhos em xilol, ambos por 10 minutos à temperatura ambiente (TA);
- 2) Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - álcool etílico absoluto I (5 minutos) TA;
 - álcool etílico absoluto II (5 minutos) TA;
 - álcool etílico absoluto III (5 minutos) TA;
 - álcool etílico absoluto IV (5 minutos) TA;
 - álcool etílico 95°GL (5 minutos) TA;
 - álcool etílico 80°GL (5 minutos) TA;
- 3) Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95° por 10 minutos, à temperatura ambiente;
- 4) Lavagem em água corrente por 10 minutos;
- 5) Duas passagens em água destilada por 5 minutos cada;
- 6) Recuperação dos sítios antigênicos (Quadro 1);
- 7) Lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 passagens em água destilada por 5 minutos cada;
- 8) Duas incubações dos cortes, pelo período de 10 minutos cada, em solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes, em uma proporção de 1/1 para bloqueio da peroxidase endógena tecidual;
- 9) Lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 passagens em água destilada por 5 minutos cada;
- 10) Duas passagens em solução tampão TRIS-HCl [0,0499 mol/l] (tris-hidroximetilaminometano, Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) com NaCl [0,1454 mol/l] pH 7,4 por 5 minutos cada;
- 11) Incubação dos cortes com os anticorpos primários (Quadro 1) diluídos em solução diluente Dako (*Antibody diluent with background reducing components*; Dako, A/S, Glostrup, Dinamarca);

- 12) Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 por 5 minutos cada;
- 13) Incubação com o anticorpo secundário (*Biotinylated link universal*, DAKO, A/S, Glostrup, Dinamarca + System-HRP, diluição 1:200) durante 30 minutos - TA;
- 14) Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 por 5 minutos cada;
- 15) Incubação com o complexo estreptoavidina-biotina HRP (DAKO, A/S, Glostrup, Dinamarca) durante 30 minutos, à temperatura ambiente;
- 16) Imersão em TRIS-HCl pH 7,4, duas trocas de 5 minutos cada;
- 17) Aplicação do agente cromógeno diaminobenzidina 25 a 30 mg (3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), diluída em 100 ml TRIS-HCl pH 7,4, acrescida de 1,2 ml de peróxido de hidrogênio 10 volumes durante 3 minutos na câmara escura;
- 18) Lavagem em água corrente por 10 minutos;
- 19) Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- 20) Contracoloração com hematoxilina de Mayer por 10 minutos à temperatura ambiente;
- 21) Lavagem em água corrente – 10 minutos;
- 22) Duas passagens em água destilada por 5 minutos cada;
- 23) Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
 - álcool etílico 80°GL (2 minutos) TA;
 - álcool etílico 95°GL (2 minutos) TA;
 - álcool etílico absoluto I (5 minutos) TA;
 - álcool etílico absoluto II (5 minutos) TA;
 - álcool etílico absoluto III (5 minutos) TA;
- 24) Diafanização em dois banhos de xilol: xilol 1 (2 minutos) e xilol 2 (2 minutos);
- 25) Montagem da lâmina em resina Permount® (*Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA*).

4.7.2 Análise da marcação imuno-histoquímica

Para análise imuno-histoquímica dos antígenos em todos os espécimes incluídos na amostra, o parâmetro consistiu na positividade da marcação, sendo consideradas positivas as células que exibiram coloração acastanhada no núcleo ou no citoplasma. Após o tratamento imuno-histoquímico, as células imunorreativas foram analisadas quantitativamente por um observador. A expressão imuno-histoquímica de RANK, RANKL e OPG foi avaliada no revestimento epitelial e na cápsula cística dos CRs e CDs.

No epitélio a análise foi semi-quantitativa de acordo com o método proposto por Leonardi et al. (2003), com algumas modificações relativas aos escores de imunomarcção. Neste método, a imunomarcção epitelial foi classificada de acordo com os seguintes parâmetros em um aumento de 400X: < 10% de células imunomarcadas (escore 0); marcação em 11 a 25% das células (escore 1); marcação em 26 a 75% das células (escore 2); e, marcação em mais de 76% das células (escore 3) (Apêndice B). Os resultados foram expressos pela frequência dos escores e média relativa aos escores dos n casos.

Na cápsula, a análise quantitativa das células imunorreativas foi realizada de acordo o método proposto por Menezes et al. (2006). Num aumento de 1000X, o número de células imunopositivas (+) para cada anticorpo foi contado em 10 campos microscópicos consecutivos sobre o total de células presentes em cada campo (T). Para a contagem das células, os campos selecionados foram fotografados utilizando-se microscópio de luz OLYMPUS® com máquina fotográfica digital OLYMPUS® acoplada. Estas imagens foram transferidas para o computador através do sistema OLYMPUS *Master* v.1.41 EX, e as células contadas com o auxílio do *software* IMAGE J® (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) (RASBAND, 2004). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células positivas (%) em relação ao total de células presentes em cada campo para cada caso, dos quais foram obtidos o percentual médio de células imunomarcadas (P) dos 20 casos. De posse desse percentual médio, atribuiu-se um escore para cada caso, levando-se em conta o padrão do escore utilizado para o epitélio sendo: escore 0 (< 10% de células imunomarcadas), 1 (marcação em 11 a 25% das células), 2 (marcação em 26 a 75% das células) e 3 (marcação em mais de 76% das células) (Apêndice C, D, E, F, G, H).

Estes procedimentos de contagem foram realizados para os três marcadores (RANK, RANKL e OPG) em ambas as lesões.

4.8 Análise estatística

Com o intuito de testar as hipóteses aventadas na presente pesquisa, os resultados obtidos foram submetidos a testes estatísticos apropriados. Os dados foram digitados em planilhas eletrônicas Excel (*Microsoft Office 2007 for Windows*) e, posteriormente, transferidos para o programa SPSS (*Statistical for Social Science version 17.0 for Windows-SPSS Inc. Chicago, Illinois, 2007*) para análise estatística.

Para análise dos dados clínicos e radiográficos realizou-se uma análise descritiva dos dados.

Em virtude da ausência de distribuição normal, para análise da associação dos escores de imunomarcção do RANK, RANKL e OPG no epitélio com o tipo de lesão (CR e CD) e, para a associação do percentual médio de imunopositividade do RANK, RANKL e OPG na cápsula cística com o tipo de lesão foi realizado o teste de *Mann-Whitney*.

Para análise da correlação entre os escores de imunomarcção de RANKL e OPG no epitélio e na cápsula do CR e CD utilizou-se o *Wilcoxon signed rank test*.

Para todos os testes estatísticos utilizados foi estabelecido o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4.9 Implicações éticas

O projeto de pesquisa desenvolvido foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, de acordo com a resolução 196/96 do CNS segundo protocolo 056/2009 e CAAE nº 058.0.051.000-09 (Anexo A).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos histopatológicos da amostra selecionada para o estudo

Em nosso estudo, de um modo geral, verificamos que os casos diagnosticados como cisto radicular e selecionados dentro da amostra caracterizavam-se pela presença de um revestimento epitelial escamoso estratificado não ceratinizado que variava muito na sua espessura, sendo em sua maioria hiperplásico (Figura 4) exibindo áreas de exocitose, espongirose, degeneração hidrópica e apresentando em alguns casos projeções arciformes, além de células mucosas e ciliadas. A cápsula era de tecido conjuntivo fibroso denso e continha quantidade variável de células inflamatórias, sendo que a maioria dos casos apresentava um intenso infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, além de alguns casos que apresentavam imagens negativas de cristais de colesterol. Os casos de CD selecionados na amostra caracterizavam-se por um revestimento epitelial escamoso estratificado não ceratinizado que exibiam em sua maior parte atrófico e uma cápsula fibrosa de tecido conjuntivo de densidade variável exibindo áreas de hemorragia, pigmentação por hemossiderina e, com escasso infiltrado inflamatório mononuclear associado (Figura 5). Em alguns casos, observaram ninhos de epitélio odontogênico dispersos na cápsula.

5.2 Análise descritiva de frequência dos dados

Embora haja certa variação na distribuição por idade, raça, gênero e localização das lesões, os dados clínicos, radiográficos e histopatológicos serviram para traçar o universo dos grupos selecionados para o estudo. Os dados clínicos relativos a cada caso foram coletados e os resultados dispostos no Quadro 2.

5.2.1 Distribuição por gênero, raça, localização e sintomatologia

Quadro 2 Frequências referentes ao gênero, raça, localização e sintomatologia dos casos de cisto radicular e cisto dentífero.

Variáveis	Lesão	
	CR n(%)	CD n(%)
Gênero		
Feminino	11 (55,0%)	9 (45,0%)
Masculino	9 (45,0%)	11 (55,0%)
Total n(%)	20 (100,0%)	20 (100,0%)
Raça		
Leucoderma	16 (80,0%)	12 (60,0%)
Feoderma	3 (15,0%)	2 (10,0%)
Melanoderma	1 (5,0%)	4 (20,0%)
Total n(%)	20 (100,0%)	18 (90,0%)
Localização		
Maxila anterior	9 (45,0%)	7 (35,0%)
Maxila posterior	1 (5,0%)	1 (5,0%)
Mandíbula anterior	3 (15,0%)	0 (0,0%)
Mandíbula posterior	5 (25,0%)	10 (50%)
Total n(%)	18 (90,0%)	18 (90,0%)
Sintomatologia		
Assintomático	12 (60,0%)	13 (65,0%)
Sintomático	4 (20,0%)	5 (25,0%)
Total n(%)	16 (80,0%)	18 (90%)

Legenda: CR – cisto radicular; CD – cisto dentífero

5.2.2 Distribuição por idade e aspecto radiográfico

Para os casos de cisto radicular, o aspecto radiográfico foi de uma área radiolúcida unilocular circunscrita na região periapical (20/20; 100%). A idade variou entre 13 a 70 anos (Figura 6) (média: 32,5 anos; desvio-padrão: 13,67 anos).

Para o cisto dentífero a imagem radiográfica foi de uma área radiolúcida associada à coroa de um dente não-erupcionado ou incluso (20/20; 100%). A idade variou entre 9 a 60 anos (Figura 7) (média: 24,79 anos; desvio-padrão: 12,35 anos).

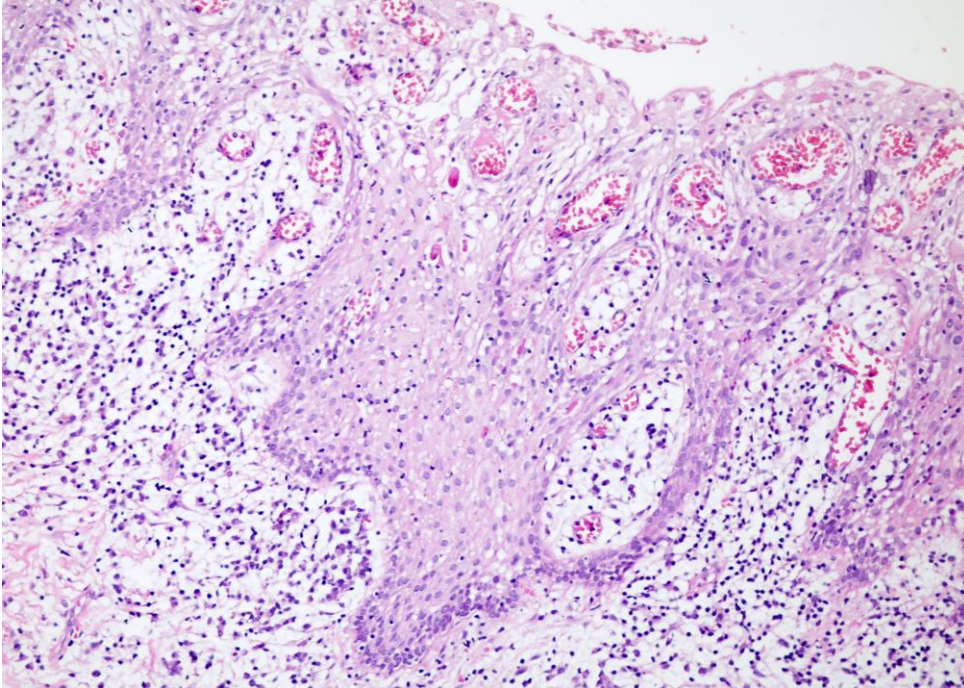


Figura 4 Cisto radicular com revestimento epitelial pavimentoso estratificado não- ceratinizado hiperplásico exibindo exocitose e contendo intenso infiltrado inflamatório mononuclear subjacente ao epitélio (Hematoxilina-eosina – 400×)

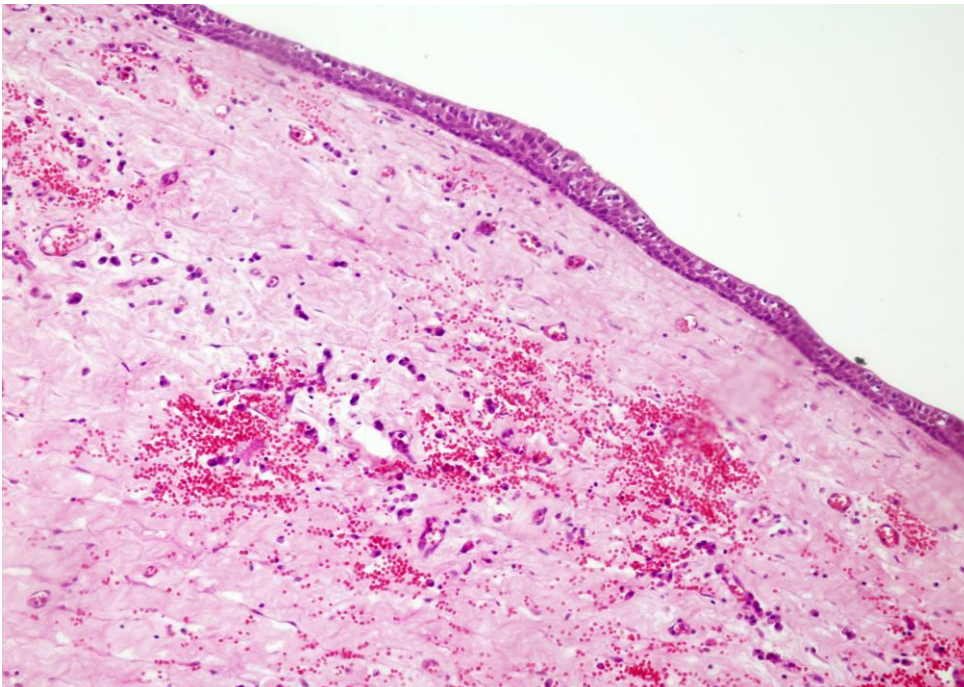


Figura 5 Cisto dentífero exibindo revestimento epitelial atrófico e cápsula de tecido conjuntivo denso exibindo áreas de hemorragia e escasso infiltrado inflamatório mononuclear (Hematoxilina-eosina – 200×)

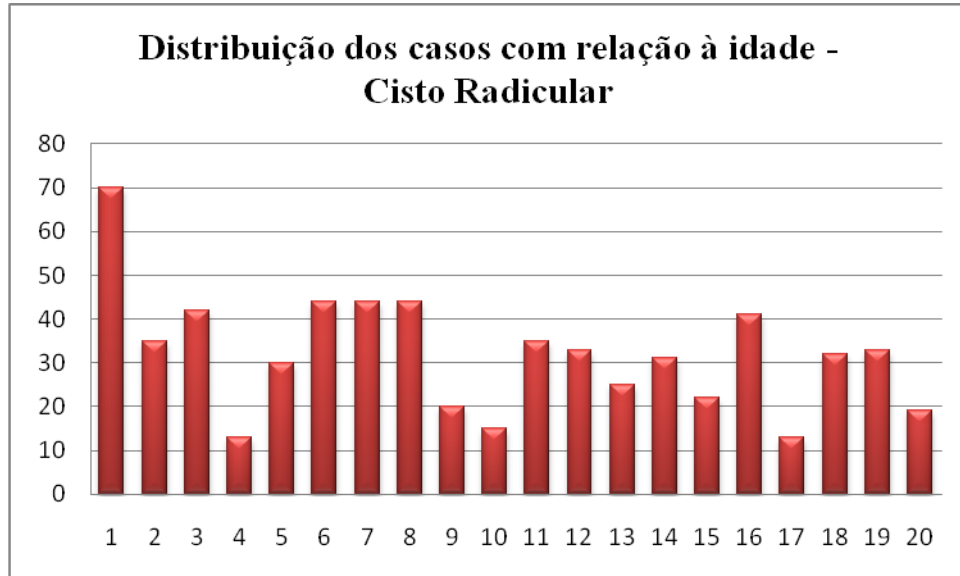


Figura 6 Frequência relativa à idade nos casos de CR selecionados.

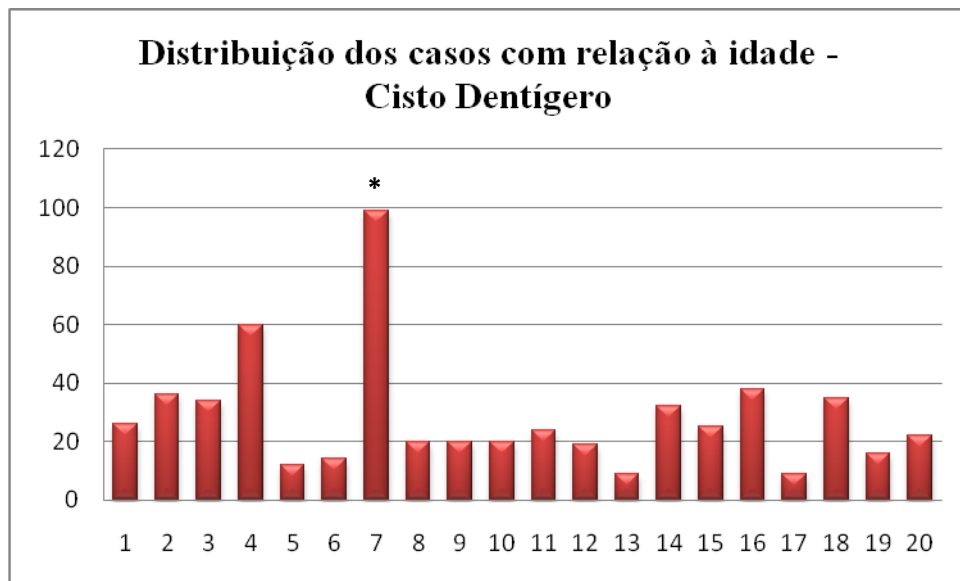


Figura 7 Frequência relativa à idade nos casos de CD selecionados (* dado não informado na ficha clínica).

5.3 Análise dos resultados imuno-histoquímicos

Os biomarcadores RANK, RANKL e OPG exibiram predominantemente em ambas as lesões um padrão de marcação citoplasmática. No entanto, para as células de linhagem

monocítica-macrofágica, células epiteliais, endoteliais e fibroblastos observamos adicionalmente um padrão de marcação nuclear. Observou-se variados graus de expressão, tipos de células imunomarcadas e algumas peculiaridades foram identificadas para cada tipo de lesão e imunomarcador com relação ao revestimento epitelial e a cápsula cística. O controle positivo exibiu forte imunomarcação. Para uma melhor compreensão dos resultados foram divididas as análises dos resultados no epitélio e na cápsula dos cistos.

5.3.1 No epitélio (E)

5.3.1.1 *Cistos radiculares*

A expressão imuno-histoquímica do RANK, RANKL e OPG localizou-se no citoplasma e por vezes no núcleo das células do revestimento epitelial (Figura 8 - A, B e C). Observou-se adicionalmente células com características de células dendríticas imunomarcadas.

A frequência relativa ao escore de imunomarcação para o RANK foi de 7 casos com escore 1, o que corresponde ao percentual de 35% dos casos, seguido de 6 casos (30%) com escore 2. Para o RANKL houve uma frequência de 10 casos (50%) com escore 2, seguidos de 6 casos (30%) com escore 1 e 4 casos (20%) com escore 0. Para a OPG, a frequência foi de 9 casos (45%) com escore 2, 6 casos (30%) com escore 3 e 5 casos (25%) com escore 1 (Tabela 1).

Houve uma distribuição similar dos casos com relação a frequência dos escores de imunomarcação do RANK. Houve um predomínio do escore 2 (isto é, 26 a 75% das células imunomarcadas) na avaliação das frequências dos escores de imunomarcação do RANKL e da OPG. Ainda, para a OPG, o escore 3 (>76% de células imunomarcadas) foi bem representado no grupo de casos.

A média dos escores de imunomarcação do RANK no epitélio foi de $1,85 \pm 0,93$, do RANKL foi de $1,30 \pm 0,80$ e da OPG foi de $2,05 \pm 0,75$.

5.3.2.2 Cistos dentígeros

A expressão imuno-histoquímica do RANK, RANKL e OPG localizou-se no citoplasma e no núcleo das células do revestimento epitelial (Figura 9 – A, B e C). Observou-se adicionalmente células com características de células dendríticas imunomarcadas.

A frequência de casos para o escore de imunomarcção do RANK foi de 7 casos (35%) apresentando escore 2, 7 casos (35%) com escore 3, 5 casos (25%) com escore 1 e apenas 1 caso (5%) com escore 0. Para o RANKL, observou-se 9 casos (45%) com escore 1 e outros 5 casos (25%) com escore 2. Para a OPG, a frequência foi de 9 casos (45%) com escore 3, 5 casos (25%) com escore 1, 5 casos (25%) com escore 2 e apenas 1 caso (5%) com escore 0 (Tabela 1).

Houve igual distribuição dos casos com relação a frequência dos escores 2 e 3 de imunomarcção para o RANK. Ademais, observou-se um predomínio do escore 1 de imunomarcção para o RANKL; e o escore 3 de imunomarcção para a OPG foi o que predominou nas amostras selecionadas.

A média dos escores de imunomarcção do RANK no epitélio foi de $2,00 \pm 0,91$, do RANKL foi de $1,25 \pm 0,91$ e da OPG foi de $2,10 \pm 0,96$.

Tabela 1 Distribuição dos escores da marcação imuno-histoquímica para o anticorpo anti-RANK, -RANKL e -OPG no epitélio do cisto radicular e do cisto dentígero. Natal, RN – 2010.

Caso	CR			CD		
	RANK	RANKL	OPG	RANK	RANKL	OPG
	E	E	E	E	E	E
1	2	1	3	2	1	2
2	2	0	2	3	0	3
3	1	0	3	2	0	1
4	2	2	3	1	2	3
5	2	0	1	3	0	3
6	3	2	3	2	2	0
7	1	2	2	1	2	1
8	0	1	2	2	1	2
9	3	2	2	3	2	1
10	1	0	2	3	0	2
11	2	2	2	3	2	3
12	1	2	1	1	2	1
13	3	2	2	2	2	2
14	1	1	2	2	1	2
15	1	1	1	1	1	3
16	1	1	1	3	1	3
17	2	1	1	3	1	3
18	3	2	2	1	2	3
19	3	2	3	0	2	1
20	3	2	3	2	2	3

Legenda: CR – cisto radicular; CD- cisto dentígero; E – escore de imunomarcção

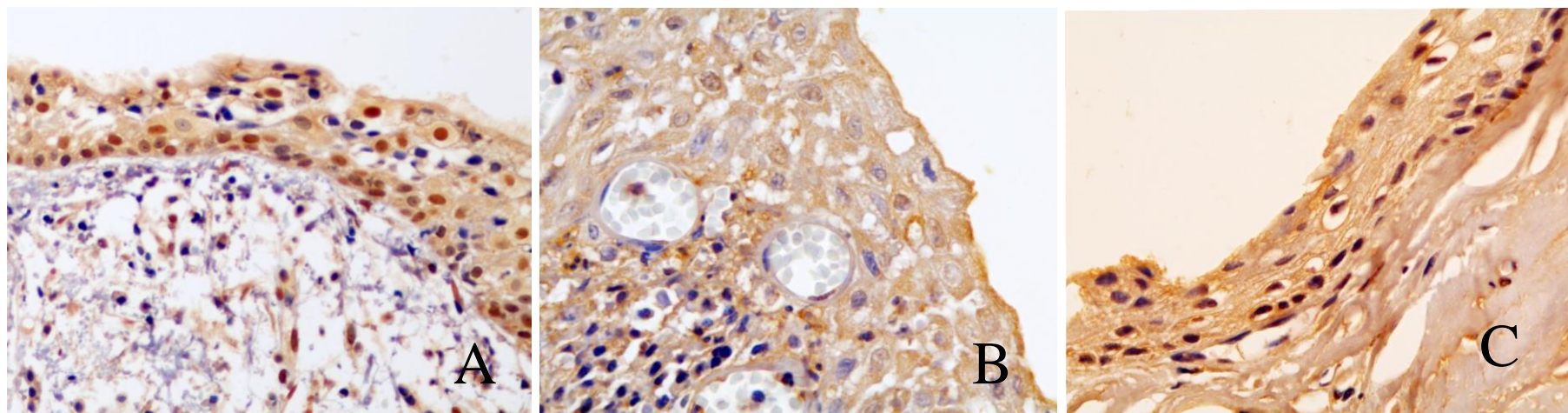


Figura 8 Expressão imuno-histoquímica da proteína RANK (A), RANKL (B) e OPG (C) no epitélio de CR (LSAB – A – 400×, B, C -1000×)

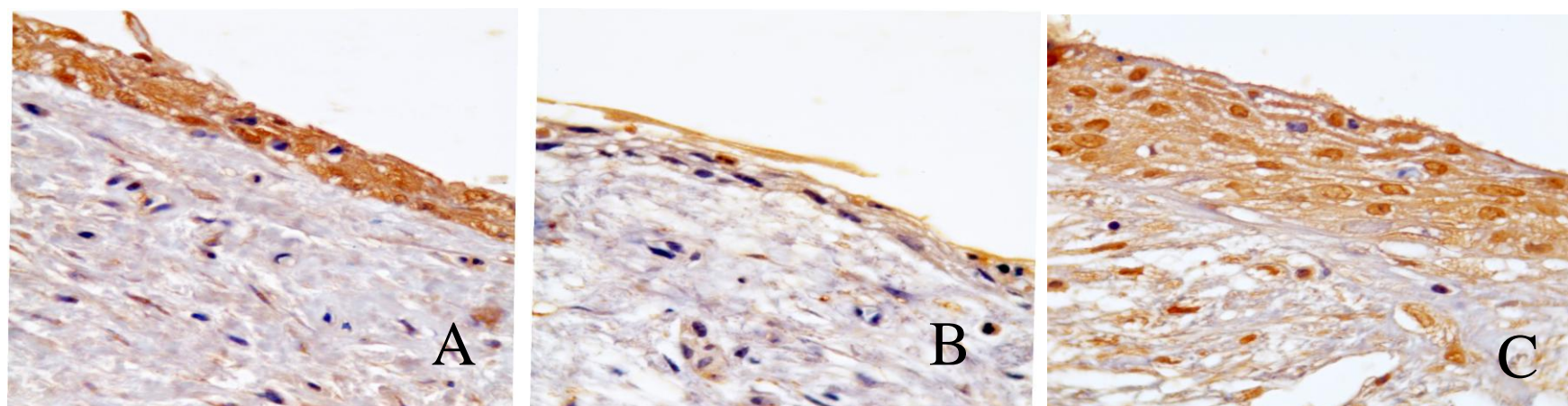


Figura 9 Expressão imuno-histoquímica da proteína RANK (A), RANKL (B) e OPG (C) no epitélio de CD (LSAB -1000×)

5.3.2 Na cápsula

Com os resultados obtidos por meio da análise do percentual de células imunopositivas (%) em cada campo estabeleceu-se o percentual médio de células imunopositivas (P_{RANK} , P_{RANKL} , P_{OPG}) nos 20 casos. De posse deste percentual, foram estabelecidos adicionalmente escores de imunomarcção (E) para a cápsula dos cistos. Ao avaliarmos as medidas do centro da distribuição observamos dados assimétricos e por isso utilizamos as medianas para os resultados estatísticos.

5.3.2.1 Cistos radiculares

A expressão imuno-histoquímica do RANK, RANKL e OPG localizou-se no citoplasma de células com características de linfócitos e plasmócitos, bem como no núcleo e no citoplasma de células com características da linhagem monocítica-macrofágica, células endoteliais e fibroblastos.

O RANK exibiu um padrão de marcação citoplasmática em linfócitos, fibroblastos, plasmócitos e neutrófilos. Adicionalmente, as células de linhagem monocítica-macrofágica exibiram marcação nuclear. A quantidade de células imunorreativas variou de 0 a 74 (Apêndice C) com o percentual médio de células imunomarcadas (P_{RANK}) variando de 0,95% a 87,66% (Tabela 2) com uma média de $34,17 \pm 24,51$.

Para o imunomarcador RANKL, observou-se que as principais células que exibiram positividade foram linfócitos, plasmócitos e fibroblastos, todos com um padrão de marcação citoplasmática (Figura 10). Ocasionalmente, observou-se imunomarcção em neutrófilos e células endoteliais, além de alguns casos apresentarem marcação em matriz extracelular. A quantidade de células imunorreativas variou de 0 a 57 (Apêndice D) com o percentual médio de células imunomarcadas (P_{RANKL}) variando de 12,06% a 73,71% (Tabela 2) com uma média de $35,73 \pm 18,38$.

Para a OPG, foi observada imunomarcção citoplasmática, nuclear e ainda marcação em matriz extracelular. As células que apresentaram marcação nuclear foram da linhagem monocítica-macrofágica (Figura 11). Os principais tipos celulares imunomarcados foram: plasmócitos, linfócitos, além de fibroblastos e células endoteliais (Figura 12). A quantidade

de células imunorreativas variou de 1 a 117 (Apêndice E) com o percentual médio de células imunomarcadas (P_{OPG}) variando de 16,47% a 89,77% (Tabela 2) com uma média de $44,72 \pm 22,24$. Quando comparamos as médias dos percentuais na cápsula observamos valores maiores de OPG comparados às do RANKL.

A razão entre o P_{RANKL}/P_{OPG} variou de 0,29 a 2,78 com uma média de $0,96 \pm 0,66$ (Tabela 2).

Tabela 2 Distribuição do percentual médio de células imunopositivas para o anticorpo anti-RANK, -RANKL, -OPG e razão RANKL/OPG na cápsula do cisto radicular. Natal, RN – 2010.

CASOS	RANK	RANKL	OPG	RANKL/OPG
	P_{RANK}	P_{RANKL}	P_{OPG}	P_{RANKL}/P_{OPG}
1	9,03	26,13	58,96	0,44
2	13,4	21,53	56,62	0,38
3	11,39	14,35	49,86	0,29
4	12,59	27,93	38,23	0,73
5	25,56	48,95	35,53	1,38
6	10,76	12,06	35,27	0,34
7	20,65	18,3	25,4	0,72
8	17,43	35	37,85	0,92
9	28,06	25,16	58,08	0,43
10	38,7	61,46	37,01	1,66
11	46,26	46,46	24,63	1,89
12	29,19	53,44	19,21	2,78
13	47,68	30,19	17	1,78
14	0,95	27,52	54,64	0,5
15	25,55	16,86	17,76	0,95
16	63,65	25,41	16,47	1,54
17	61,96	28,28	69,02	0,41
18	59,69	65,18	71,26	0,91
19	87,66	73,71	89,77	0,82
20	73,39	56,83	81,99	0,69

Legenda: P_{RANK} - percentual médio de células imunopositivas para RANK; P_{RANKL} - percentual médio de células imunopositivas para RANKL; P_{OPG} - percentual médio de células imunopositivas para OPG; P_{RANKL}/P_{OPG} - razão entre os percentuais médios

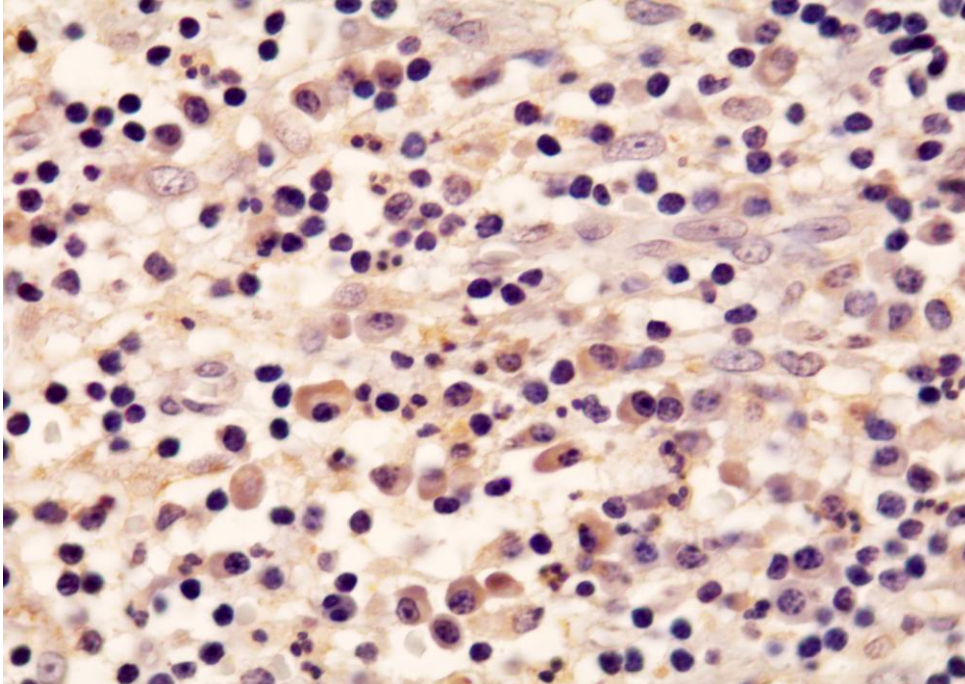


Figura 10 Expressão imuno-histoquímica do RANKL na cápsula do cisto radicular. Observe imunomarcagem em células inflamatórias do tipo mononuclear. LSAB (1000×)

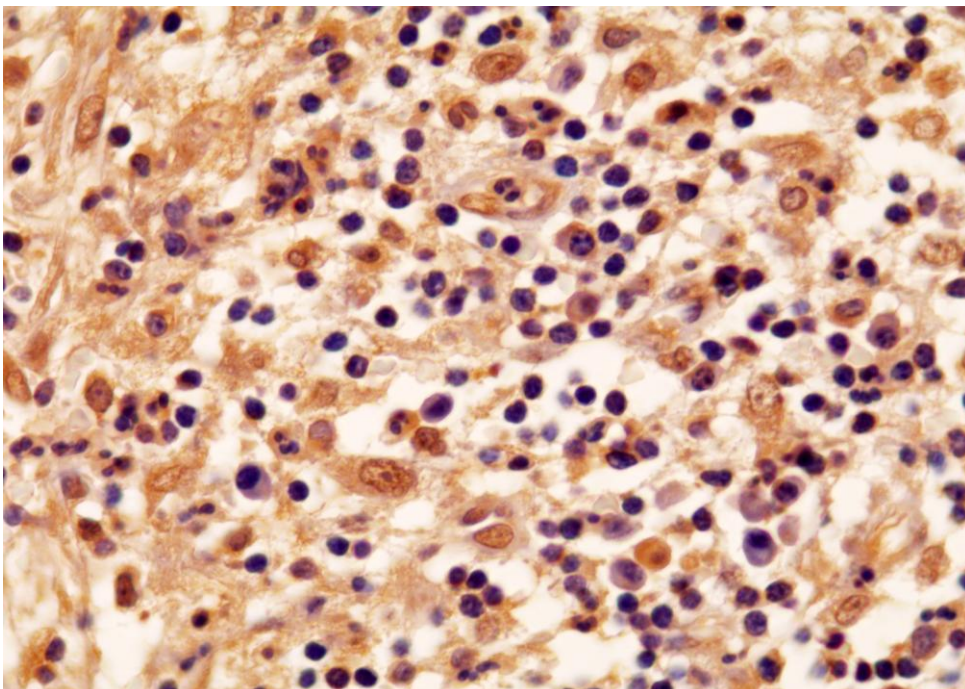


Figura 11 Expressão imuno-histoquímica da OPG na cápsula do cisto radicular. Observe imunomarcagem em células inflamatórias do tipo mononuclear e polimorfonuclear. LSAB (1000×)

Os resultados relativos aos escores de imunomarcção para a cápsula do CR encontram-se dispostos na Tabela 3. A frequência do escore de imunomarcção do RANK na cápsula do CR foi de 11 casos (55%) com escore 2, seguidos de 6 casos (30%) com escore 1, 2 casos (10%) com escore 0 e apenas 1 caso (5%) com escore 3. Para o RANKL a frequência foi de 15 casos (75%) com escore 2 e 5 casos (25%) com escore 1. Para a OPG observou-se uma frequência de 13 casos (65%) com escore 2, 5 casos (25%) com escore 1 e 2 casos (10%) com escore 3. Houve um predomínio do escore 2 para os três imunomarcadores.

Ademais, o escore médio de imunomarcção do RANK na cápsula de CR foi de $1,55 \pm 0,75$, do RANKL foi de $1,75 \pm 0,44$ e da OPG foi de $1,85 \pm 0,58$.

Tabela 3 Distribuição dos escores da marcação imuno-histoquímica para o anticorpo anti-RANK, -RANKL e -OPG na cápsula do cisto radicular. Natal, RN – 2010.

Caso	CR		
	RANK	RANKL	OPG
	E	E	E
1	0	2	2
2	1	1	2
3	1	1	2
4	1	2	2
5	2	2	2
6	1	1	2
7	1	1	2
8	1	2	2
9	2	2	2
10	2	2	2
11	2	2	1
12	2	2	1
13	2	2	1
14	0	2	2
15	2	1	1
16	2	2	1
17	2	2	2
18	2	2	2
19	3	2	3
20	2	2	3

Legenda: CR – cisto radicular; E- escores de imunomarcção

5.3.2 Cistos dentígeros

A expressão imuno-histoquímica do RANK, RANKL e OPG localizou-se no citoplasma das células mononucleadas da cápsula cística, bem como no núcleo de células de linhagem monocítica-macrofágica.

A imunomarcagem para o anticorpo RANK foi observada no citoplasma de células com características de linfócitos, plasmócitos, epitélio odontogênico e neutrófilos (Figura 13); e no citoplasma e núcleo de fibroblastos, células de linhagem monocítica-macrofágica e células endoteliais. A quantidade de células imunorreativas variou de 1 a 86 (Apêndice F) com um percentual médio de células imunopositivas variando de 18,22% a 97,89% (Tabela 4) com uma média relativa aos casos de $62,01 \pm 22,54$.

Observou-se imunomarcagem para RANKL no citoplasma de células com características de linfócitos, plasmócitos, fibroblastos e células endoteliais. Houve um predomínio da imunomarcagem em células mononucleares (Figura 14). A quantidade de células imunorreativas variou de 0 a 71 (Apêndice G) com um percentual médio de células imunopositivas variando de 13,60% a 91,24% (Tabela 4) com uma média de $58,20 \pm 24,08$.

Para a OPG observamos marcação citoplasmática em células com características linfócitos, plasmócitos, epitélio odontogênico (Figura 15) e neutrófilos bem como no núcleo e citoplasma de células de linhagem monocítica-macrofágica e fibroblastos. A quantidade de células imunorreativas variou de 1 a 56 (Apêndice H) com um percentual médio de células imunopositivas variando de 9,59% a 87,62% (Tabela 4) com uma média de $58,24 \pm 24,43$. Quando comparamos a média dos percentuais observou-se um valor maior para OPG comparado à RANKL.

A razão entre o P_{RANKL}/P_{OPG} variou de 0,66 a 3,23 com uma média de $1,11 \pm 0,57$ (Tabela 4).

Tabela 4 Distribuição do percentual médio de células imunopositivas para o anticorpo anti - RANK, -RANKL, -OPG e razão RANKL/OPG em cisto dentífero. Natal, RN – 2010.

CASOS	RANK	RANKL	OPG	RANKL/OPG
	P_{RANK}	P_{RANKL}	P_{OPG}	P_{RANKL}/P_{OPG}
1	51,69	71,1	77,47	0,92
2	80,12	85,1	81,79	1,04
3	71	47	49,08	0,96
4	36,37	59,3	65,13	0,91
5	89,58	72,9	84,37	0,86
6	89,26	81,6	87,62	0,93
7	61,8	20,5	30,13	0,68
8	65,71	31,6	48,09	0,66
9	63,63	65,1	41,46	1,57
10	90,99	87,9	85,65	1,03
11	77,92	47,3	66,97	0,71
12	44,32	32,9	10,19	3,23
13	71,21	73,3	62,37	1,18
14	41,86	91,2	52,34	1,74
15	29	47,9	51,45	0,93
16	97,89	81,8	85,75	0,95
17	70,58	70,6	79,71	0,89
18	18,22	22,2	31,52	0,7
19	51,49	13,6	9,59	1,42
20	37,7	61	64,11	0,95

Legenda: P_{RANK} - percentual médio de células imunopositivas para RANK; P_{RANKL} – percentual médio de células imunopositivas para RANKL; P_{OPG} - percentual médio de células imunopositivas para OPG; P_{RANKL}/ P_{OPG} – razão entre os percentuais médios

Os resultados referentes aos escores de imunomarcção na cápsula do CD encontram-se dispostos na Tabela 5. A frequência do escore de imunomarcção do RANK na cápsula foi de 13 casos (65%) com escore 2, seguidos de 6 casos (30%) com escore 3. Para o RANKL a frequência foi de 12 casos (60%) com escore 2, seguidos de 5 casos (15%) com escore 3. Para a OPG observou-se uma frequência de 11 casos (55%) com escore 2, 7 casos (35%) com escore 3. Houve um predomínio do escore 2 para os três imunomarcadores.

O escore médio de imunomarcção do RANK na cápsula do CD foi de $2,25 \pm 0,55$ do RANKL foi de $2,10 \pm 0,64$ e da OPG foi de $2,25 \pm 0,63$.

Tabela 5 Distribuição dos escores da marcação imuno-histoquímica para o anticorpo anti-RANK, -RANKL e -OPG na cápsula do cisto dentífero. Natal, RN – 2010.

Caso	CD		
	RANK	RANKL	OPG
	E	E	E
1	2	2	3
2	3	3	3
3	2	2	2
4	2	2	2
5	3	2	3
6	3	3	3
7	2	1	2
8	2	2	2
9	2	2	2
10	3	3	3
11	3	2	2
12	2	2	1
13	2	2	2
14	2	3	2
15	2	2	2
16	3	3	3
17	2	2	3
18	1	1	2
19	2	1	1
20	2	2	2

Legenda: CD- cisto dentífero; E- escores de imunomarcção

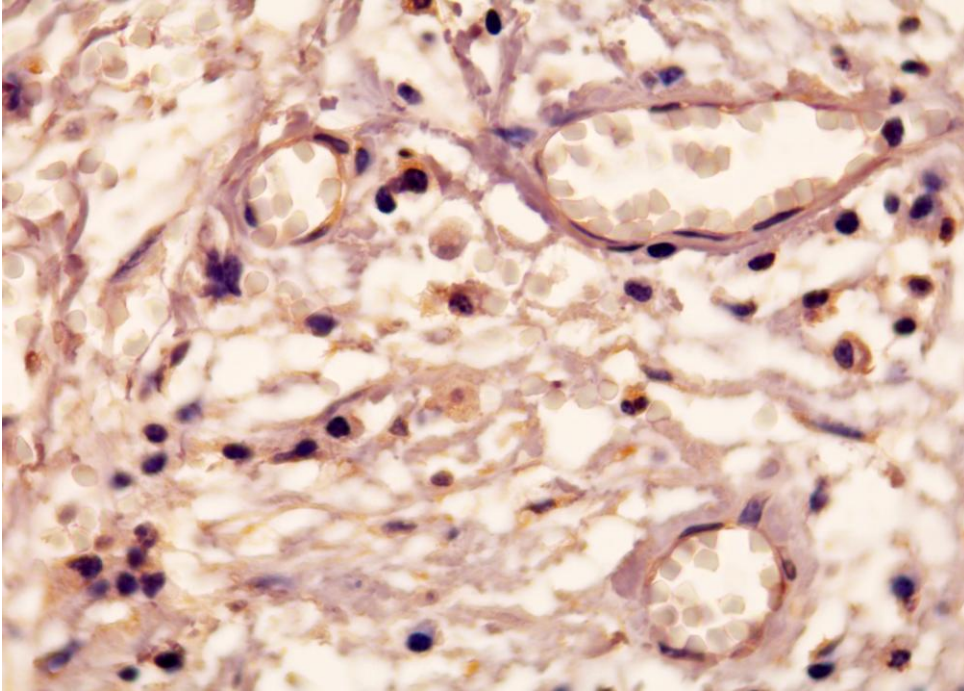


Figura 12 Expressão imuno-histoquímica de OPG na cápsula do cisto radicular. Observe imunomarcção em células endoteliais e células inflamatórias. LSAB (1000×)

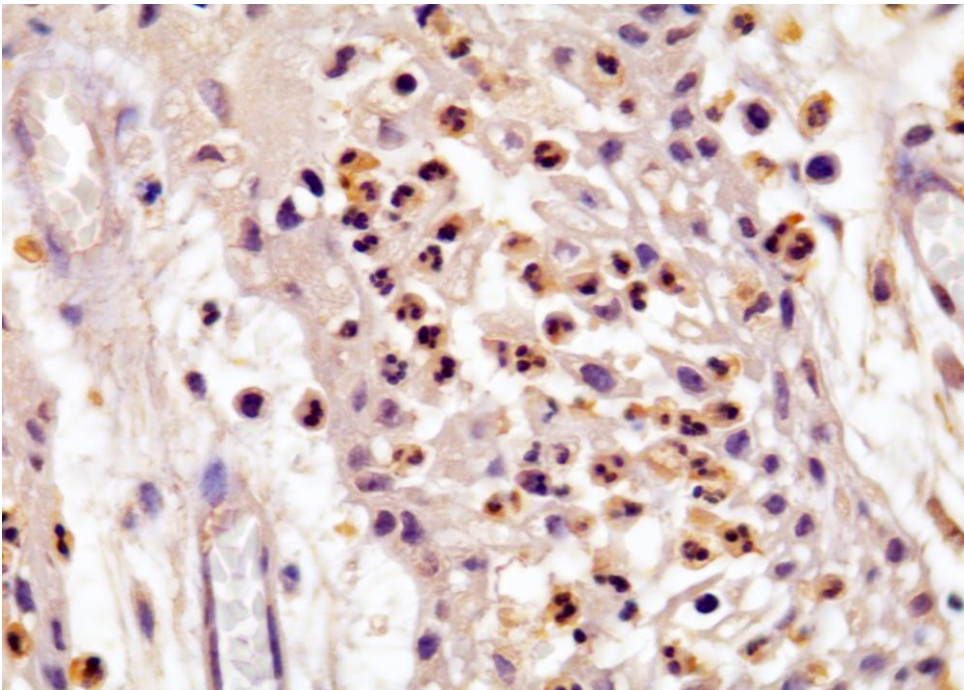


Figura 13 Expressão imuno-histoquímica de RANK na cápsula do cisto dentígero. Observe imunomarcção em células inflamatórias do tipo polimorfonucleares. LSAB (1000×)

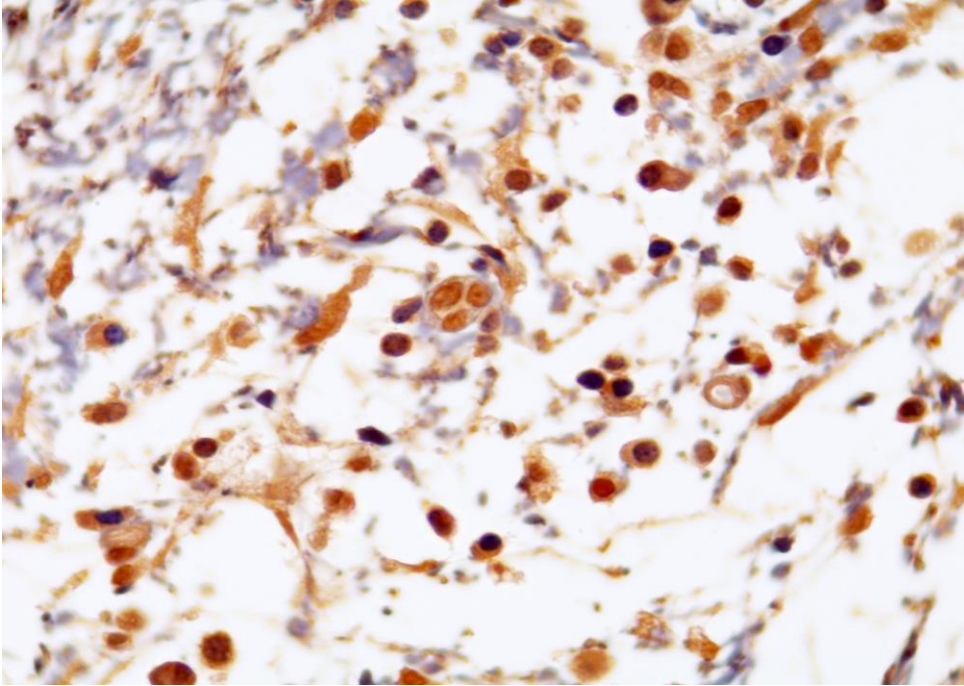


Figura 14 Expressão imuno-histoquímica de RANKL na cápsula do cisto dentífero. Observe imunomarcção em células inflamatórias do tipo mononuclear. LSAB (1000×)

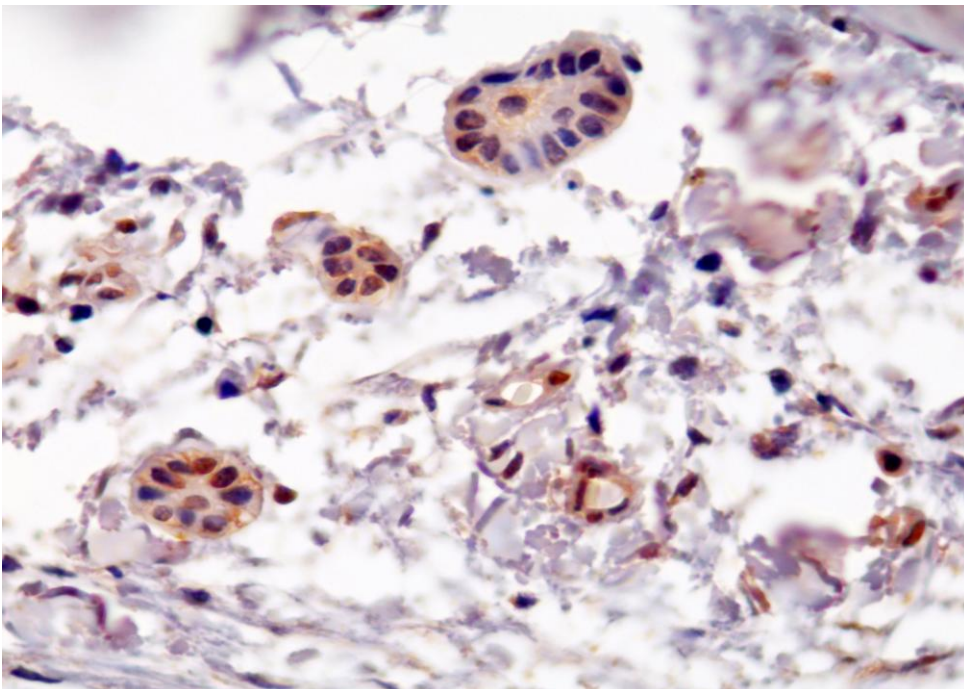


Figura 15 Expressão imuno-histoquímica da OPG na cápsula do cisto dentífero. Observe imunomarcção em ninhos de epitélio odontogênico. LSAB (1000×)

5.4 Resultados estatísticos

5.4.1 Associação da expressão dos escores de imunomarcção do RANK, RANKL e da OPG no epitélio com o tipo de lesão

Ao comparar as medianas dos escores do CR e CD para RANK, RANKL e OPG não se observou diferença significativa ($p=0.589$; $p=0.688$ e $p=0.709$, respectivamente) (Tabela 6) entre a expressão destes marcadores no epitélio destes cistos.

Tabela 6 Parâmetros utilizados no cálculo do teste de *Mann-Whitney* para a avaliação dos escores de células imunorreativas para o RANK, RANKL e OPG no epitélio, segundo o tipo de lesão. Natal, RN – 2010.

Marcador	Tipo de lesão	n	Mediana	Soma dos postos	Média dos postos	U	<i>p</i> *
RANK							
	CR	20	2	391	19,55	181	0.589
	CD	20	2	429	21,45		
RANKL							
	CR	20	1,5	424	21,2	186	0.688
	CD	20	1	396	19,8		
OPG							
	CR	20	2	397	19,85	187	0.709
	CD	20	2	423	21,15		

Legenda: CR – cisto radicular; CD – cisto dentífero; **Mann Whitney*

5.4.2 Associação da expressão dos percentuais médios do RANK, RANKL e da OPG na cápsula com o tipo de lesão

Ao comparar as medianas dos percentuais médios de imunomarcção do RANK, RANKL e da OPG na cápsula dos cistos notou-se diferença significativa entre os percentuais médios de expressão do RANK e do RANKL ($p=0.001$ e $p=0.005$, respectivamente). Não

houve diferença estatística significativa para o imunomarcador OPG entre os dois tipos de cistos (Tabela 7). Os percentuais médios de células RANK+ e RANKL+ foram maiores no CD em relação ao CR.

Tabela 7 Parâmetros utilizados no cálculo do teste de *Mann-Whitney* para a avaliação do percentual médio de células imunorreativas para o RANK, RANKL, OPG na cápsula cística, segundo o tipo de lesão. Natal, RN – 2010.

Marcador	Tipo de lesão	n	Mediana	Soma dos postos	Média dos postos	U	p*
RANK							
	CR	20	26,81	289	14,45	79	0.001
	CD	20	64,67	531	26,55		
RANKL							
	CR	20	28,1	306	15,3	96	0.005
	CD	20	63,05	514	25,7		
OPG							
	CR	20	38,04	347	17,35	137	0.088
	CD	20	63,24	473	23,65		

Legenda: CR – cisto radicular; CD – cisto dentígero; **Mann Whitney*

5.4.3 Correlação da expressão dos escores de imunomarcção de RANKL e OPG no epitélio e na cápsula dos cistos

Ao correlacionar os escores de imunomarcção de RANKL e OPG no epitélio e na cápsula dos cistos, observou-se diferença estatística significativa no epitélio do CR e do CD ($p = 0.003$ e $p=0.005$, respectivamente). No entanto, quando se correlacionou os escores de imunomarcção RANKL e OPG na cápsula do CR e do CD não houve diferença significativa (Tabela 8).

Quando comparamos a distribuição dos casos com relação aos escores de imunomarcção RANKL/OPG no epitélio e na cápsula observou-se que no epitélio do CR 55% dos casos apresentavam escores de imunomarcção de OPG maiores comparados aos do RANKL e, na cápsula 50% dos casos apresentavam similaridades nos escores de imunomarcção (OPG=RANKL). No epitélio do CD, 70% dos casos exibiram um maior

escore de imunomarcção para OPG comparado ao RANKL e, na cápsula 65% dos casos exibiram igual imunoexpressão de RANKL e OPG (Tabela 8). Os resultados apontam similaridades no padrão de distribuição dos casos no epitélio e na cápsula dos cistos.

Tabela 8 Distribuição dos casos com relação aos postos de escores de imunomarcção para OPG e RANKL no epitélio e na cápsula cística. Natal, RN – 2010.

Tipo de lesão	Posto			p*
	OPG<RANKL	OPG>RANKL	OPG=RANKL	
CR (n=20)				
Epitélio	1 (5%)	11 (55%)	8 (40%)	0,005
Cápsula	4 (20%)	6 (30%)	10 (50%)	0,527
CD (n=20)				
Epitélio	2 (10%)	14 (70%)	4 (20%)	0,003
Cápsula	2 (10%)	5 (25%)	13 (65%)	0,257

Legenda: CR – cisto radicular, CD – cisto dentígero; **Non Parametric Wilcoxon signed rank test*

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A pesquisa científica busca constantemente por meio do estudo imuno-histoquímico novas descobertas que sejam capazes de compreender o papel dos biomarcadores e sua relação com a etiopatogênese das doenças. Diversos estudos tentam correlacionar dados clínicos, radiográficos e histopatológicos com um padrão de expressão imuno-histoquímica, o que poderia estar relacionado com estimativa de prognóstico, expansão tumoral e ainda, à compreensão dos mecanismos relacionados com o desenvolvimento e a descobertas de medicamentos capazes de conter ou eliminar as doenças. No entanto, pouco se conhece sobre a atuação e presença destes marcadores nas lesões. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo principal comparar a expressão imuno-histoquímica do RANK, RANKL e OPG entre cisto radicular e cisto dentífero.

A descoberta e caracterização do sistema RANK, RANKL e OPG têm mudado os conceitos relativos ao metabolismo ósseo, levando a um melhor entendimento da patogênese das doenças ósseas metabólicas e alavancando novas estratégias terapêuticas. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que estas três moléculas são essenciais para a vida dos osteoclastos e ainda, como mediadores de doenças ósseas, sendo importantes alvos moleculares para o diagnóstico e intervenção terapêutica. Devido à escassa publicação de trabalhos sobre expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores RANK, RANKL e OPG em cistos, não se encontra bem estabelecido o papel destas proteínas no processo de reabsorção óssea relacionado com a formação cística. A expressão de RANKL e OPG vem sendo identificada em cistos e tumores odontogênicos (ANDRADE et al., 2008; KUMAMOTO; OOYA, 2004; SILVA et al., 2008), granulomas periapicais (MENEZES et al., 2006; MENEZES et al., 2008; VERNAL et al., 2006), doença periodontal (BOSTANCI et al., 2007; CROTTI et al., 2003) e carcinoma de células escamosas (CHUANG et al., 2009). Entretanto, uma análise comparativa da expressão imuno-histoquímica destes marcadores em cistos radiculares e cistos dentíferos ainda não havia sido estabelecida.

Em decorrência dos inúmeros mecanismos responsáveis pelo processo de reabsorção óssea (hormonais, infecciosos, mecânicos, etc.), optamos por selecionar apenas espécimes de CD que apresentavam escasso infiltrado inflamatório, para assim conseguirmos estabelecer diferenças entre estas duas entidades. Para isso, foi feita uma seleção em todo o acervo do laboratório de Patologia Oral e, as lâminas coradas em hematoxilina-eosina foram examinadas com intuito de garantir que as características histopatológicas para os dois tipos de cistos

estavam de acordo com os aspectos pré-estabelecidos. Cabe ressaltar aqui, que embora não haja evidências de intensa inflamação no exame do espécime, nenhuma conclusão definitiva pode ser feita sem se saber as alterações que estavam presentes no início da formação do cisto. Além disso, foram considerados para cada caso os dados radiográficos das lesões, uma vez que este dado é essencial para o diagnóstico. Deste modo, foram incluídos na amostra apenas aqueles casos que continham as informações completas relativas aos dados radiográficos.

Acredita-se que o processo de formação dos cistos, sejam eles de origem inflamatória ou de desenvolvimento, esteja relacionado com a proliferação de restos epiteliais que se tornam ativos quando há a liberação de citocinas e fatores de crescimento (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). Os eventos imunopatológicos que levam à atividade proliferativa dos restos epiteliais levam concomitantemente à liberação de fatores de reabsorção óssea, mas a compreensão de como e de que maneira estes eventos estariam envolvidos no processo de formação da cavidade cística e reabsorção do osso adjacente ainda continua sendo alvo de intensa pesquisa e discussão.

As citocinas e os fatores de crescimento (ILs-1, -6, -11, TNF) liberados nas regiões que sofrem estímulos, sejam eles infecciosos ou mecânicos, levam à diferenciação e maturação de osteoclastos. Isto pode ocorrer por meio do estímulo direto de células mesenquimais indiferenciadas ou por um mecanismo parácrino, onde as células presentes expressam ou liberam os receptores RANK, RANKL e OPG que atuam levando à osteoclastogênese (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Assim, podemos notar que o estímulo que dá origem aos CRs e aos CDs é diferente, mas leva ao final a liberação de fatores que possuem ação comum, isto é, o desenvolvimento do cisto com reabsorção do osso adjacente.

O processo de destruição óssea nas lesões císticas ainda não se encontra bem estabelecido. Existem muitas controvérsias com relação à patogênese destas lesões, principalmente no que diz respeito à presença e papel das células inflamatórias. A expressão e ação de mediadores pró-inflamatórios capazes de reabsorver o osso, em particular a IL-1, são reguladas por uma variedade de outras citocinas. Esta cadeia é facilmente compreendida quando analisamos as respostas Th1 e Th2. As células Th1 medeiam a hipersensibilidade do tipo tardia, produzindo INF- γ , IL-2, TNF- α e FSC-GM, e são super-reguladas pela IL-12. As células Th2 promovem a proliferação e diferenciação de células B que produzem anticorpos e citocinas Th2, as quais incluem IL-2, -4, -5, -6, -10 e -13 (FUKADA et al., 2009;

STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). Estas respostas são inter-relacionadas, e as citocinas que participam desempenham papéis antagonistas, umas delas favorecendo a diferenciação e maturação dos osteoclastos, e outras inibindo sua atividade (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). Segundo Fukada et al. (2009), embora haja uma concomitância nestas respostas Th1 e Th2, em cistos periapicais, a resposta Th2 parece ser mais importante. Entretanto, o papel das respostas Th1 e Th2 na reabsorção óssea não está completamente compreendido e resultados controversos têm sido obtidos.

O osteoclasto é a célula responsável pela reabsorção óssea. Ele é derivado de células progenitoras hematopoiéticas de linhagem monocítica. A proliferação e sobrevivência dos seus precursores dependem da presença do fator estimulante de colônias de macrófagos (FSC-M) (AESCHLIMANN; EVANS, 2004). Em resposta a vários fatores osteotrópicos, as células mesenquimais e os osteoblastos expressam em sua superfície o receptor RANKL. Este ligante estimula a osteoclastogênese e a atividade dos osteoclastos quando se liga ao seu receptor RANK presente na superfície de pré-osteoclastos. A OPG, por sua vez, atua como um receptor inibitório, bloqueando a interação RANK-RANKL inibindo assim a diferenciação osteoclástica (HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; KHOSLA, 2001). Assim, a formação osteoclástica é regulada pelo balanço entre OPG e RANKL e as células que expressam estas moléculas podem contribuir para esta atividade osteolítica.

De acordo com os nossos resultados, os principais tipos de células que expressaram imunoreatividade para proteína RANK foram células com características de células da linhagem monocítica-macrofágica, fibroblastos e linfócitos conforme já citado por outros autores (ANDRADE et al., 2008; HOFBAUER, 2006; KHOSLA, 2001; MENEZES et al., 2006). Além destes, observamos outros tipos celulares imunomarcados os quais exibiam características microscópicas de células endoteliais, células dendríticas, neutrófilos, plasmócitos e ainda, células do revestimento epitelial. Para o RANKL e a OPG, a imunopositividade foi identificada em células que exibiam características microscópicas de linfócitos, neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e epiteliais, o que também foi verificado em outros estudos (ANDRADE et al., 2008; SILVA et al., 2008; MENEZES et al., 2006). Corroborando os resultados obtidos por estes autores, o padrão de expressão foi predominantemente citoplasmático. Salientam-se ainda para o RANKL e a OPG, a presença de imunopositividade citoplasmática em plasmócitos, células dendríticas e em ninhos de epitélio odontogênico dispersos na cápsula dos CDs. Os nossos achados de imunopositividade

para células do epitélio odontogênico acrescentam informações aos resultados de Silva et al. (2008) que apontam a expressão de RANK no epitélio odontogênico.

Muitos dos casos por nós analisados apresentaram adicionalmente uma marcação em matriz extracelular para os anticorpos anti-OPG e anti-RANKL; o que ainda não havia sido estabelecido em outros estudos. Segundo Khosla (2001) e Hofbauer (2006) tanto o RANKL como a OPG podem ser liberados como fatores solúveis. Talvez seja isso que justifique a presença destes receptores solúveis exibindo esta marcação em matriz nas lâminas tratadas pelo método imuno-histoquímico. Acreditamos que a análise quantitativa da imunopositividade destes marcadores por esta técnica, pode muitas vezes falhar pela dificuldade em se quantificar esta porção solúvel.

A expressão imuno-histoquímica do RANK, RANKL e da OPG no epitélio do CR e CD foi predominantemente citoplasmática, entretanto, observou-se adicionalmente em muitos casos o padrão de marcação nuclear para as células do revestimento epitelial. Quando avaliada a diferença de imunomarcação entre os escores de RANK, RANKL e OPG no epitélio do CR e do CD não obtivemos resultados estatísticos significantes, uma vez que os casos encontram-se bem distribuídos dentro da frequência dos escores. Silva et al. (2008), não encontraram resultados significativos quando compararam a imunoexpressão no epitélio de ameloblastoma, tumor odontogênico ceratocístico e cisto dentífero. Adicionalmente, Andrade et al. (2008) demonstraram similaridades na imunoexpressão epitelial entre os tumores odontogênicos por eles avaliados. Estes resultados se assemelham aos obtidos por nós, onde demonstramos que os escores de imunomarcação destes marcadores no revestimento epitelial foram similares, não havendo diferença estatística significativa. A utilização de escores de imunomarcação para o epitélio justifica-se pelo fato de que as lesões císticas que são recebidas para exame anátomo-patológico nem sempre apresentam uma quantidade de revestimento epitelial suficiente para permitir uma análise quantitativa das células imunopositivas.

Quando avaliamos a distribuição dos casos em relação aos escores de imunomarcação no epitélio do CR e do CD, observamos que grande parte das amostras apresentava um padrão de expressão epitelial onde os escores de imunomarcação da OPG eram maiores que os do RANKL, o que pode indicar mínima atividade osteolítica. Esta relação, no caso das lesões císticas sugere ainda o papel que as células epiteliais poderiam estar desempenhando; como uma barreira na tentativa de conter a invasão no osso subjacente, impedindo a expansão cística. Este achado pode ser justificado pelos experimentos de Katagiri e Takahashi (2002), Hofbauer (2006) e Khosla (2001) que observaram que uma super-expressão de OPG inibia a

osteoclastogênese e, por conseguinte a reabsorção óssea. Sugere-se ainda, que esta maior imunoposição da OPG no epitélio pode, no caso dos CRs, estar relacionada com a teoria do abscesso, uma vez que as células inflamatórias no interior do tecido de granulação liberariam RANKL e, as células epiteliais circundantes, em resposta a este aumento poderiam liberar OPG numa tentativa de conter a expansão do cisto. Além disso, poderíamos supor um papel para estas células epiteliais OPG+ na regressão da lesão e restabelecimento do tecido periapical tendo em vista que o tratamento endodôntico para os casos de CRs é, na maioria dos casos, suficiente para a regressão da lesão cística (LIN; HUANG; ROSENBERG, et al., 2007).

Quando comparamos os percentuais médios de imunomarcção de RANK, RANKL e OPG na cápsula dos CRs e CDs observamos que houve diferença significativa para o RANK e o RANKL entre os cistos. Observou-se que a cápsula dos CDs apresentou um maior número de células RANK+ e RANKL+ comparada à cápsula dos CRs. Pode-se especular que esta maior imunoposição na cápsula dos CDs esteja relacionada com um maior potencial de expansão destes cistos uma vez que pode estar indicando a presença de uma maior quantidade de células precursoras osteoclásticas expressando RANK e, assim capazes de interagir com seus receptores específicos (RANKL), levando à diferenciação e maturação osteoclástica. Silva et al. (2008) demonstraram diferenças significantes quando compararam a imunopositividade do RANK e RANKL nas células mesenquimais de CDs e ameloblastomas sólidos; sendo que suas amostras de ameloblastoma apresentaram um maior número de células RANK e RANKL positivas. Este resultado, também sugere a atuação destes marcadores na atividade osteolítica relacionada com a expansão tumoral.

Hofbauer (2006) e Baud'huin et al. (2007) realizaram experimentos *in vivo* que demonstraram o RANKL como um fator pró-reabsorção. Segundo estes autores, o aumento na expressão do RANKL estaria relacionado com um aumento da atividade osteoclástica, favorecendo assim a reabsorção. Embora Menezes et al. (2008) apontem que em condições inflamatórias há uma maior liberação de RANKL, nem sempre estas células estarão guiando o processo de reabsorção óssea, pois muitas vezes, a presença do receptor inibitório OPG influencia decisivamente o processo de reabsorção óssea. Desta maneira uma análise da correlação do escores de RANKL e OPG é muitas vezes recomendada para o entendimento do metabolismo ósseo.

Em nosso estudo, ao correlacionar os escores de imunopositividade de RANKL e OPG no epitélio de CR e CD encontramos a maioria dos casos (55% e 70%, respectivamente) exibindo níveis de OPG>RANKL. Na cápsula dos CRs e CDs, encontramos valores maiores

ou similares para a OPG comparada ao RANKL. A análise da distribuição do RANKL e OPG por pontos confirma esta tendência. Quando comparamos CRs e CDs, observamos que os resultados relativos ao epitélio e cápsula dos cistos são muito semelhantes, no entanto, apenas para o epitélio esta correlação foi significativa. Silva et al. (2008) encontraram valores significativos para a cápsula dos CDs, onde 100% dos casos estavam distribuídos no grupo $OPG > RANKL$; no epitélio, seus resultados não foram significativos. Esta discrepância nos resultados obtidos pelos autores supracitados pode se dever em parte à metodologia utilizada na realização do teste estatístico, uma vez que aqui utilizamos os valores relativos aos escores de imunomarcagem no epitélio e na cápsula quando eles utilizaram o percentual de células imunopositivas para estabelecer as correlações RANKL/OPG. Outros fatores que se deve levar em conta são a técnica e os tipos de anticorpos utilizados nas pesquisas e, além disso, o universo de onde foi retirada a amostra dos estudos, uma vez que as diferenças existentes em relação à faixa etária, gênero, localização e tipo de lesão podem de alguma forma influenciar e modificar os resultados.

A ausência de correlação entre RANKL/OPG na cápsula dos cistos sugere que diferentes padrões de expressão destes marcadores podem estar associados com diferentes estágios de progressão da doença. Embora não tenhamos encontrados valores significantes para esta correlação, nossa amostra como um todo indica casos onde há um estágio de homeostasia do tecido ósseo ($OPG = RANKL$) e outros onde se sugere atividade óssea mínima ($OPG > RANKL$).

Para a análise da razão RANKL/OPG, acreditamos que a avaliação da cinética de expressão como realizado por Kawashima et al. (2007) seja interessante, uma vez que faz um esboço das alterações da expressão dos marcadores quando do desenvolvimento da lesão. A avaliação da razão por médias pode muitas vezes falhar por encontrar resultados relativos a um momento estático, no qual as lesões já estão estabelecidas no indivíduo. Por isso, deve-se ter cuidado em relação ao rigor metodológico e o seu propósito ao comparar os resultados obtidos por diversos estudos.

Embora grande parte dos estudos (KAWASHIMA et al. 2007; MENEZES et al., 2006; MENEZES et al., 2008; VERNAL et al., 2006) apontem um aumento da imunoreatividade do RANKL comparada à da OPG em lesões osteolíticas, nós acreditamos que este desequilíbrio RANKL/OPG talvez ocorra durante a fase inicial de formação da cavidade cística, o que do ponto de vista da pesquisa *in vivo* fica difícil de ser comprovado. Embora acreditemos que em algum momento haja a atuação do sistema RANK/RANKL/OPG, não foi encontrado na lesão cística estabelecida um desequilíbrio dos marcadores que favoreça a atividade ósteo-

reabsortiva. Talvez uma análise da interface entre a lesão e o osso subjacente possa trazer resultados mais significativos, uma vez que teríamos a presença das células do tecido ósseo. Para as lesões císticas fica difícil uma análise desta interface, tendo em vista que o tratamento utilizado é conservador, onde a endodontia na maioria dos casos é capaz de reparar o tecido doente. Entretanto, para as lesões tumorais, onde o tratamento geralmente é mais agressivo, com extensas ressecções em bloco, poderíamos sim obter uma análise da expressão destes marcadores na interface osso-tumor. Ainda, acrescentamos que uma avaliação da cinética de expressão parece ser mais razoável para o entendimento do sistema, uma vez que estabelece os níveis destes biomarcadores em todas as fases de evolução da lesão.

Embora muitos autores apontem que um aumento da atividade do RANKL associado a uma diminuição da atividade regulatória da OPG esteja relacionado com diversas doenças como osteoporose; artrite; doença periodontal; cistos e tumores odontogênicos; e, mais recentemente carcinoma de células escamosas (CHUANG et al., 2009; HOUFBAUER; HEUFELDER, 2001; MENEZES et al., 2006; VERNAL et al., 2006; SILVA et al., 2008), nós aqui não obtivemos resultados compatíveis com estes achados no epitélio e na cápsula destes cistos. Embora uma elevada reatividade para RANKL, comparada com a OPG, seja esperada em lesões osteolíticas conforme supracitado, alguns estudos (ANDRADE et al., 2008; KUMAMOTO; OOYA, 2004; SILVA et al. 2008; TAY et al., 2004) têm mostrado lesões osteolíticas que exibem maior imunopositividade para OPG comparada à do RANKL. Em concordância com estes resultados prévios, os nossos achados indicam que a maioria das lesões císticas apresenta valores maiores ou similares de OPG comparado aos do RANKL. Como o osso é um tecido dinâmico, as relações estabelecidas entre estes receptores que culminam com diferenciação e maturação dos osteoclastos ocorrem a todo instante na medida em que se desenvolvem alterações nos níveis de expressão destes marcadores.

Este estudo permitiu assim a identificação dos principais tipos de células que produzem RANK, RANKL e OPG, além de ser o primeiro trabalho a apresentar a expressão comparativa destes marcadores entre cistos dentígeros e cistos radiculares. A identificação destes marcadores nas células pode indicar que elas estejam relacionadas com o processo de ativação osteoclástica e perda óssea nestas lesões. Estudos de biologia molecular que avaliem os níveis destas proteínas e a cinética de expressão nestas lesões são necessários para comprovar não apenas a presença, mais também para validar a quantidade de transcritos presentes em cada uma destas lesões. Estudos adicionais são necessários com o objetivo de esclarecer se o sistema RANK/RANKL/OPG estaria envolvido no desenvolvimento de lesões císticas, para assim no futuro podermos compreender o mecanismo pelo qual isto ocorre e

ainda estabelecer novas estratégias terapêuticas capazes de melhorar o tratamento destas lesões que podem muitas vezes ser amplamente destrutivas.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Diante deste experimento podemos concluir que:

- 1) Não há evidências que suportem uma diferença de imunomarcção entre os escores de imunomarcção de RANK, RANKL e OPG no epitélio dos cistos radiculares e cisto dentígeros.
- 2) Existem evidências que sugerem uma diferença entre os percentuais médios de imunomarcção de RANK e RANKL na cápsula dos cistos radiculares e cisto dentígeros.
- 3) Não há evidências que comprovem uma diferença entre os percentuais médios de OPG na cápsula dos cistos radiculares e cisto dentígeros.
- 4) Existem evidências que suportem uma diferença entre a correlação dos escores de imunomarcção do RANKL e da OPG no epitélio dos cistos radiculares e cistos dentígeros. Existe uma tendência de as células epiteliais dos CRs e CDs apresentarem escores de imunomarcção da OPG maiores que o do RANKL.
- 5) Não há evidências que suportem uma diferença entre os escores de RANKL e OPG na cápsula dos cistos radiculares e cisto dentígeros. Existe uma tendência na cápsula cística dos CRs e CDs apresentarem valores maiores ou similares para os escores de imunomarcção da OPG comparado aos do RANKL, o que poderia estar indicando mínima atividade osteolítica nesta região.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

AESCHLIMANN, D.; EVANS, B.A.J. The vital osteoclast: how is it regulated? **Cell Death Differ**, v.11, p. S5-S7, 2004.

ANDRADE, F. R.; et al. Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. **Oral Surg Oral Med Oral Radiol Endod**, v.106, n.4, p. 548-555, 2008.

BAUD'HUIN, M.; et al. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. **Cell Mol Life Sci**, v.64, p.2334-2350, 2007.

BOSTANCI, N.; et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. **J Clin Periodontol**, v. 34, p. 370–376, 2007.

BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, p. 139–146, 2008.

BROWNE, R. M. The pathogenesis of odontogenic cysts: a review. **J Oral Pathol**, v.4, p.31-46, 1975.

CHUANG, F-H.; et al. Immunohistochemical expression of RANKL, RANK e OPG in human oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.38, n.10, p. 753-8, 2009.

COHEN, S.; BURNS, R.C. Caminhos da Polpa. 7ª Edição, Guanabara-koogan 2000.

CROTTI, T.; et al. Receptor activator NFκB ligand (RANKL) and osteoprotegerina (OPG) protein expression in periodontitis. **J Periodontol Res**, v. 38, p. 380-7, 2003.

CURY, V. C.; et al. Immunohistochemical study of apical periodontal cysts. **J Endod**. v. 24, n.1, p. 36-7, 1998.

DOUGALL, W. C.; CHAISSON, M. The RANK/RANKL/OPG triad in cancer-induced bone diseases. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, p.541–549, 2006.

FIGUEIREDO, C.R.L.V.; SANTOS, J.N.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R.L.C. Mecanismos imunopatológicos de formação e expansão do cisto radicular: uma abordagem atual. **RPG Rev Pós Grad**, v.6, n.2, p. 180-187, 1999.

*Segundo a normalização realizada pela Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT-NBR 6023:2002)

FUKADA, S. Y.; et al. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. **Oral Microbiol Immunol**, v. 24, p. 25-31, 2009.

GODOY, G. P.; FIGUEIREDO, C.R.L.V.; QUEIROZ, L.M. G.; et al. Cisto dentígero: estudo epidemiológico, correlação clinicopatológica e caracterização de uma possível variante inflamatória. **RPG. Revista de Pós-Graduação (USP)**, v. 11, n. 1, p. 29-38, 2004.

GONDIM, J. O.; et al. Conservative management of a dentigerous cyst secondary to primary tooth trauma. **Dent Traumat**, v. 24, p. 676-679, 2008.

GROSSMAN, S. M.; et al. Demographic profile of odontogenic and selected nonodontogenic cysts in a Brazilian population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.107, n.104, p. 35-41, 2007.

HOFBAUER, L. C. Pathophysiology of RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). **Ann Endocrinol**, v. 67, n. 2, p.139-141, 2006.

HOFBAUER, L. C.; HEUFELDER, A. E. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. **J Mol Med**, v. 79, p. 243–253, 2001.

HOLMLUND, A.; et al. Ameloblastomas originating from odontogenic cysts. **J Oral Pathol Med**, v. 20, p. 318-21, 1991.

HREN, N. I.; IHAN, A. T lymphocyte activation and cytokine expression in radicular granulomas and radicular cysts. **Arch Oral Biol**, v.54, p.156-161, 2009.

JONES, A. V.; CRAIG, G. T.; FRANKLIN, C. D. Range and demographics of odontogenic cysts diagnosed in a UK population over a 30-year period. **J Oral Pathol Med**, v. 35, p. 500-7, 2006.

KACTHBURIAN, E.; ARANA, V. *Histologia e Embriologia Oral*. 1ª edição. São Paulo. Panamericana, 1999.

KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. **Oral Dis**, v. 8, p. 147–159, 2002.

KAWASHIMA, N.; et al. Kinetics of *RANKL*, *RANK* and *OPG* expressions in experimentally induced rat radicular lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Radiol Endod**, v.103, p. 707-711, 2007.

KHOSLA, S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. **Endocrinol**, v.142, n. 12, p.5050-55, 2001.

KUMAMOTO, H.; OOYA, K. Expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP), osteoclast differentiation factor (ODF)/receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANKL) and osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)/osteoprotegerin (OPG) in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med**, v. 33, p. 46-52, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Patologia – Bases Patológicas da Doença- Robbins e Cotran. 5ª edição. Rio de Janeiro. Elsevier, 2005.

LEONARDI, R.; et al. Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF)/ vascular permeability factor in periapical lesions. **J Endod**, v. 29, p. 180-3, 2003.

LIN, L. M.; et al. Detection of epidermal growth factor receptor in inflammatory periapical lesions. **Int Endod J**. v.29, p.179–84, 1996.

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. **JOE**, v. 33, n.8, p. 908-16, 2007.

MEGHJI, S.; et al. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. **Arch Oral Biol** v.41, p.523–31, 1996.

MENEZES, R.; et al. Receptor activator NF- κ B-ligand and osteoprotegerin protein expression in human radicular cysts and granulomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, p. 404-9, 2006.

MENEZES, R.; et al. Differential Patterns of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand/Osteoprotegerin Expression in Human Radicular Granulomas: Possible Association with Progressive or Stable Nature of the Lesions. **JOE**, v. 34, n. 8, p. 932-8, 2008.

NAIR, P. N. R; PAJAROLA, G.; SCHROEDER, H. E. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 81, p. 93–102, 1996.

NAIR, P. N. R et al. Experimental evidence supports the abscess theory of development of radicular cysts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 106, p. 294–303, 2008.

NEVILLE, B. W.; et al. Patologia Oral e Maxilofacial. 2ª edição. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, 2004.

NETO, M. N.; DANESI, C. C.; UNFER, D. T. Contribuição ao estudo do cisto radicular revisão da literatura. **Saúde**, v. 30(1-2), p. 90-99, 2004.

OCHSENIUS, G.; et al. Odontogenic Cysts: Analysis of 2.944 cases in Chile. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.12, p. E85-91, 2007.

OSLON, J. W.; et al Odonotgenic carcinoma occuring in a dentigerous cyst case report and clinic management. **J Periodontol**, v.71, n.8, p:1365-1370, 2000.

RAITZ, R.; et al. Cisto radicular uma análise epidemiológica de 1507 casos. **RPG Rev Pós Grad**, v.7, n.1, p.27-39, 2000.

RASBAND, W.S. ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2004

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J.; JORDAN R. C. K. Patologia oral: correlações clinicopatológicas. 5 edição. Rio de Janeiro. Elsevier, 2008. p. 237-244.

SHAND, J. M.; HEGGIE, A. A. Cysts of the Jaws and Advances in the Diagnosis and Management of Nevroid Basal Cell Carcinoma Syndrome. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 17, p. 403 – 414, 2005.

SHEAR, M. Cistos da região bucomaxilo-facial – diagnóstico e tratamento. 2 edição. São Paulo. Santos, p.146-151, 1989

SHEAR, M. Developmental odontogenic cysts. An update. **J Oral Pathol Med**, v.23, p.1-11, 1994.

SILVA, T. A.; et al. Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. **Oral Surg Oral Med Oral Radiol Endod**, v.106, n.3, p. 333-341, 2008.

SOUZA, C.V.C.; SOUZA, L.B.; PEREIRA PINTO, L. Estudo epidemiológico do cisto dentífero. **Rev Saúde**, v.9, n.1, p.41-9, 1994.

STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 9(4), p.498-521,1998.

TAY, J. Y. Y.;et al. Identification of RANKL in osteolytic lesions of the facial skeleton. **J Dent Res**, v. 83, p. 349-53, 2004.

TSAI, C. H.; et al. Immunohistochemical localization of tissue-type plasminogen activator and type I plasminogen activator inhibitor in radicular cysts. **J Oral Pathol Med**, v.33, p. 156-61, 2004.

TYROVOLA, J. B.; et al. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. **J Oral Sci**, v. 50, n.4, p. 367-76 ET AL, 2008.

VEGA, D.; MAALOUF, N. M.; SAKHAE, K. The Role of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B (RANK)/RANK Ligand/Osteoprotegerin: Clinical Implications. **J Clin Endocrinol Metab**, v.92, n. 12, p. 4514–4521, 2007.

VERNAL, R.; et al. RANKL in human radicular granuloma: possible involvement in radicular bone destruction. **Oral Dis**, v. 12, p.283-9, 2006.

WITRANT, Y.; et al. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1704, p. 49–57, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE A - Ficha clínica

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Odontologia

Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral

Projeto de Pesquisa:

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS RANK, RANKL E OPG
EM CISTOS RADICULARES E CISTOS DENTÍGEROS**

Ficha Clínica

Nome do paciente: _____ Tel: _____

Biópsia: _____

Idade: _____ Sexo: () 1- masc. Cor da pele: () 1 - branco

2 - fem 2 - pardo

9 – não informado 3 - negro

9 – não informado

Localização da lesão: ()

1- Maxila anterior; 2 – maxila posterior; 3 – mandíbula anterior; 4- mandíbula posterior; 9- não informado

Sintomatologia: () 1 – sintomático; 2 – assintomático; 9 – não informado

Diagnóstico histopatológico: () 1- cisto radicular; 2 - cisto dentígero.

Dados radiográficos: () 1 - área radiolúcida unilocular na região periapical; 2 - área radiolúcida associada à coroa de um dente não-erupcionado ou incluso; 9 – não informado

Observações:

APÊNDICE B - Ficha de avaliação dos escores de imunomarcção da expressão imuno-histoquímica de RANK, RANKL e OPG no epitélio de CR e CD

LESÃO	CR			CD		
	RANK	RANKL	OPG	RANK	RANKL	OPG
1	2	1	3	2	1	2
2	2	0	2	3	2	3
3	1	0	3	2	0	1
4	2	2	3	1	0	3
5	2	0	1	3	2	3
6	3	2	3	2	0	0
7	1	2	2	1	0	1
8	0	1	2	2	1	2
9	3	2	2	3	2	1
10	1	0	2	3	1	2
11	2	2	2	3	1	3
12	1	2	1	1	1	1
13	3	2	2	2	1	2
14	1	1	2	2	3	2
15	1	1	1	1	3	3
16	1	1	1	3	2	3
17	2	1	1	3	1	3
18	3	2	2	1	2	3
19	3	2	3	0		1
20	3	2	3	2	1	3

CR – cisto radicular; CD - Cisto dentífero

Escore de imunomarcção

0 - < 10% de células imunomarcadas

1 – 11 a 25%

2 – 26 a 75%

3 - >76%

APÊNDICE C - Ficha de avaliação da expressão imuno-histoquímica de RANK na cápsula de cisto radicular

CASOS	1			2			3			4			5			6			7			8			9			10			P	E
	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%		
1	2	39	5,12	1	34	2,94	2	34	5,88	2	31	6,45	2	54	3,7	2	25	8	17	73	23,3	9	71	12,7	2	26	7,69	7	48	14,6	9,03	0
2	11	101	10,9	17	131	13	2	57	3,5	16	65	24,6	16	57	28,1	16	93	17,2	4	83	4,81	7	64	10,9	8	119	6,72	20	140	14,3	13,40	1
3	2	27	7,4	9	56	16,1	9	113	7,96	10	32	31,3	7	38	18,4	6	49	12,2	1	57	1,75	4	66	6,06	9	113	7,96	5	105	4,76	11,39	1
4	17	145	11,7	12	142	8,45	23	188	12,2	25	170	14,7	30	168	17,9	27	164	16,5	23	192	12	11	147	7,48	20	192	10,4	26	178	14,6	12,59	1
5	67	169	39,6	52	130	40	59	169	34,9	56	143	39,2	74	168	44	19	96	19,8	9	70	12,9	9	166	5,42	22	159	13,8	9	150	6	25,56	2
6	11	86	12,8	16	101	15,8	16	107	15	23	97	23,7	19	95	20	2	126	1,58	9	101	8,91	2	114	1,75	4	93	4,3	4	107	3,73	10,76	1
7	6	30	20	26	109	23,9	4	32	12,5	3	24	12,5	14	53	26,4	18	64	28,1	18	67	26,9	9	43	20,9	8	50	16	11	57	19,3	20,65	1
8	14	89	15,7	22	108	20,4	18	110	16,4	13	91	14,3	17	100	17	12	90	13,3	23	109	21,1	14	76	18,4	10	49	20,4	17	98	17,3	17,43	1
9	20	149	13,4	20	58	34,5	29	115	25,2	28	119	23,5	36	81	44,4	19	105	18,1	19	46	41,3	14	37	37,8	5	50	10	11	34	32,4	28,06	2
10	25	114	21,9	21	76	27,6	35	84	41,7	33	64	51,6	13	49	26,5	23	71	32,4	35	64	54,7	24	49	49	27	51	52,9	21	73	28,8	38,70	2
11	36	98	36,7	14	43	32,6	34	63	54	27	46	58,7	29	59	49,2	35	90	38,9	21	35	60	33	82	40,2	24	49	49	23	53	43,4	46,26	2
12	10	51	19,6	23	56	41,1	13	56	23,2	13	55	23,6	12	42	28,6	21	55	38,2	19	62	30,6	31	77	40,3	27	101	26,7	11	55	20	29,19	2
13	14	23	60,9	16	40	40	33	42	78,6	29	55	52,7	32	57	56,1	33	53	62,3	15	39	38,5	8	49	16,3	15	40	37,5	18	53	34	47,68	2
14	0	12	0	0	17	0	0	16	0	0	12	0	0	18	0	0	10	0	2	21	9,52	0	10	0	0	10	0	0	16	0	0,95	0
15	46	154	29,9	41	127	32,3	18	105	17,1	25	97	25,8	16	64	25	22	98	22,4	21	107	19,6	37	119	31,1	33	104	31,7	16	78	20,5	25,55	2
16	54	63	85,7	29	37	78,4	63	74	85,1	64	110	58,2	21	50	42	26	41	63,4	24	38	63,2	23	38	60,5	25	43	58,1	18	43	41,9	63,65	2
17	71	107	66,4	59	89	66,3	71	80	88,8	32	44	72,7	20	27	74,1	25	41	61	34	55	61,8	20	45	44,4	12	29	41,4	9	21	42,9	61,96	2
18	36	53	67,9	48	90	53,3	50	83	60,2	31	63	49,2	35	58	60,3	19	32	59,4	29	40	72,5	47	57	82,5	36	59	61	22	72	30,6	59,69	2
19	24	26	92,3	21	23	91,3	20	23	87	21	21	100	21	23	91,3	20	21	95,2	31	42	73,8	48	63	76,2	37	42	88,1	35	43	81,4	87,66	3
20	34	55	61,8	25	38	65,8	40	51	78,4	16	22	72,7	36	46	78,3	31	38	81,6	32	35	91,4	31	43	72,1	48	72	66,7	28	43	65,1	73,39	2

(+) células imunopositivas; (T) Total de células no campo; (%) Percentual de células imunopositivas; (P) Percentual médio de células imunopositivas; (E) Escore de imunomarcção.

Escore de imunomarcção

0 – P<10%

1 – 10% < P > 25%

APÊNDICE D - Ficha de avaliação da expressão imuno-histoquímica de RANKL na cápsula de cisto radicular

CASOS	1			2			3			4			5			6			7			8			9			10			P	E
	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%		
1	12	33	36,36	11	51	21,56	27	69	39,13	15	45	33,33	14	38	36,84	10	52	19,23	3	41	7,31	13	50	26	4	36	11,11	14	46	30,43	26,13	2
2	7	104	6,73	9	79	11,39	23	101	22,77	37	54	68,51	8	65	12,3	16	90	17,77	14	91	15,38	22	102	21,56	16	91	17,58	22	103	21,35	21,53	1
3	16	120	13,33	7	75	9,33	10	97	10,3	10	114	8,77	7	82	8,53	6	99	6,06	13	110	11,81	9	51	17,64	9	38	23,68	15	44	34,09	14,35	1
4	37	162	22,83	27	142	19,01	33	167	19,76	55	182	30,21	48	162	29,62	41	179	22,9	48	153	31,37	57	151	37,74	45	141	31,91	38	112	33,92	27,93	2
5	61	92	66,3	41	92	44,56	37	67	55,22	34	57	59,64	25	67	37,31	20	51	39,21	30	78	38,46	37	79	46,83	42	80	52,5	44	89	49,43	48,95	2
6	36	124	29	8	72	11,1	12	92	13	12	44	27,3	3	75	4	2	72	2,778	9	65	13,85	2	64	3,12	4	80	5	10	88	11,36	12,06	1
7	11	113	9,73	15	98	15,3	19	101	18,81	26	119	21,84	25	98	25,51	12	94	12,76	11	97	11,34	40	99	40,4	9	113	7,96	18	90	20	18,30	1
8	28	58	48,27	7	23	30,43	24	47	51,06	18	50	36	8	56	14,28	19	77	24,67	21	56	37,5	18	64	28,12	22	57	38,59	23	56	41,07	35,00	2
9	13	42	30,95	6	28	21,42	14	41	34,14	22	57	38,59	7	56	12,5	11	42	26,19	11	28	39,28	6	41	14,63	9	51	17,64	7	43	16,27	25,16	2
10	15	27	55,55	16	23	69,56	16	24	66,66	20	25	80	11	18	61,11	27	38	71,05	25	45	55,55	37	67	55,22	30	63	47,61	34	65	52,3	61,46	2
11	33	109	30,27	47	99	47,47	34	85	40	38	72	52,77	43	63	68,25	28	55	50,9	39	71	54,92	25	47	53,19	16	51	31,37	11	31	35,48	46,46	2
12	14	30	46,66	16	45	35,55	15	32	46,87	12	28	42,85	34	47	72,34	34	47	72,34	20	44	45,45	21	37	56,75	33	53	62,26	32	60	53,33	53,44	2
13	13	39	33,33	9	34	26,47	14	65	21,53	13	44	29,54	8	54	14,81	14	47	29,78	13	41	31,7	12	40	30	15	52	28,84	19	34	55,88	30,19	2
14	0	0	0	3	5	60	0	0	0	0	0	0	4	10	40	10	14	71,42	19	32	59,37	0	0	0	4	9	44,44	0	0	0	27,52	2
15	3	37	8,1	4	76	5,26	18	103	17,47	10	76	13,15	13	97	13,4	20	93	21,5	31	114	27,19	23	86	26,74	9	71	12,67	18	78	23,07	16,86	1
16	24	79	30,37	7	78	8,97	18	82	21,95	23	78	29,48	9	68	13,23	14	85	16,47	26	82	31,7	41	102	40,19	35	73	47,94	8	58	13,79	25,41	2
17	2	74	2,7	2	25	8	5	40	12,5	6	32	18,75	18	79	22,78	6	27	22,22	14	30	46,66	13	22	59,09	11	20	55	13	37	35,13	28,28	2
18	29	42	69,04	27	41	65,85	30	40	75	42	52	80,76	48	56	85,71	33	58	56,89	19	34	55,88	24	72	33,33	43	63	68,25	22	36	61,11	65,18	2
19	11	21	52,38	18	30	60	13	24	54,16	15	21	71,42	12	15	80	15	17	88,23	14	19	73,68	16	19	84,21	15	19	78,94	16	17	94,11	73,71	2
20	21	45	46,66	14	29	48,27	18	29	62,06	15	32	46,87	9	18	50	25	36	69,44	21	33	63,63	8	20	40	12	19	63,15	18	23	78,26	56,83	2

(+) células imunopositivas; (T) Total de células no campo; (%) Percentual de células imunopositivas; (P) Percentual médio de células imunopositivas; (E) Escore de imunomarcção.

APÊNDICE E - Ficha de avaliação da expressão imuno-histoquímica de OPG na cápsula de cisto radicular

CASOS	1			2			3			4			5			6			7			8			9			10			P	E
	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%		
1	43	79	54,43	40	81	49,38	36	70	51,42	27	47	57,44	30	54	55,55	40	61	65,57	28	49	57,14	24	37	64,86	28	50	56	28	36	77,77	58,96	2
2	31	91	34,06	43	60	71,66	48	94	51,06	46	74	62,16	27	52	51,92	24	51	47,05	37	58	63,79	22	43	51,16	28	46	60,86	29	40	72,5	56,62	2
3	30	53	56,6	31	52	59,61	23	52	44,23	25	55	45,45	28	51	54,9	48	81	59,25	41	90	45,55	40	74	33,96	37	71	52,11	46	98	46,93	49,86	2
4	77	218	35,32	74	234	31,62	75	202	37,12	72	204	35,29	82	202	40,59	117	259	45,17	103	240	42,91	72	212	33,96	73	176	41,47	49	126	38,88	38,23	2
5	82	189	43,38	19	138	13,76	22	122	18,03	11	54	20,37	5	31	16,12	27	49	55,1	21	31	67,74	37	94	39,36	35	99	35,35	35	76	46,05	35,53	2
6	45	133	33,83	40	90	44,44	25	95	26,31	42	106	39,62	51	151	33,77	46	132	34,84	32	137	23,35	45	116	38,79	56	135	41,48	53	146	36,3	35,27	2
7	7	57	12,28	12	56	21,42	16	62	25,8	23	94	24,46	17	86	19,76	17	91	18,68	24	105	22,85	37	98	37,75	33	92	35,86	33	94	35,1	25,40	2
8	12	36	33,33	18	50	36	13	43	30,23	17	38	44,73	30	70	42,85	31	84	36,9	18	58	31,03	20	52	38,46	61	98	62,24	33	145	22,75	37,85	2
9	29	46	63,04	11	20	55	22	37	59,45	14	26	53,84	12	22	54,54	30	40	75	31	47	65,95	14	24	58,33	12	33	36,36	16	27	59,25	58,08	2
10	26	56	46,42	29	75	37,66	34	71	47,88	28	66	42,42	22	54	40,74	15	34	44,11	28	108	25,92	25	103	24,27	38	108	35,18	24	94	25,53	37,01	2
11	37	111	33,33	18	81	22,22	26	91	28,57	29	64	45,31	28	86	32,55	8	63	12,69	32	94	34,04	1	39	2,56	5	58	8,62	38	144	26,38	24,63	1
12	4	39	10,25	15	50	30	6	50	12	12	51	23,52	4	41	9,75	10	71	14,08	37	130	28,46	31	179	17,31	29	150	19,33	29	106	27,35	19,21	1
13	14	100	14	6	46	13,04	13	46	28,26	22	76	28,94	10	66	15,15	11	81	13,58	8	30	26,66	2	16	12,5	2	23	8,69	7	76	9,21	17,00	1
14	0	0	0	5	7	71,42	3	4	75	2	4	50	1	1	100	0	0	0	4	4	100	1	2	50	5	5	100	0	0	0	54,64	2
15	23	117	19,65	22	99	22,22	25	105	23,8	23	128	17,96	17	87	19,54	11	106	10,37	9	92	9,78	5	29	17,24	6	45	13,33	9	38	23,68	17,76	1
16	11	137	8,02	27	121	22,31	20	81	24,69	14	108	12,96	18	137	13,13	17	110	15,45	15	71	21,12	20	104	19,23	7	111	6,3	20	93	21,5	16,47	1
17	19	39	48,71	17	23	73,91	14	20	70	8	14	57,14	7	9	77,77	8	12	66,66	10	15	66,66	13	18	72,22	16	21	76,19	17	21	80,95	69,02	2
18	55	64	85,93	67	80	83,75	40	57	70,17	41	60	68,33	42	64	65,62	31	59	52,54	30	52	57,69	64	84	76,19	58	77	75,32	47	61	77,04	71,26	2
19	26	29	89,65	39	46	84,78	22	24	91,66	25	27	92,59	26	27	96,29	28	28	100	21	25	84	29	33	87,87	21	24	87,5	30	36	83,33	89,77	3
20	42	47	89,36	30	44	68,18	38	45	84,44	41	48	85,41	18	26	69,23	31	39	79,48	28	33	84,84	38	42	90,47	37	41	90,24	36	46	78,26	81,99	3

(+) células imunopositivas; (T) Total de células no campo; (%) Percentual de células imunopositivas; (P) Percentual médio de células imunopositivas; (E) Escore de imunomarcção.

APÊNDICE F - Ficha de avaliação da expressão imuno-histoquímica de RANK na cápsula de cisto dentífero

CASOS	1			2			3			4			5			6			7			8			9			10			P	E
	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%		
1	33	63	52,38	31	106	29,25	24	62	38,71	13	37	35,14	15	40	37,5	22	37	59,46	24	39	61,54	40	57	70,18	40	55	72,73	24	40	60	51,69	2
2	32	35	91,43	8	10	80	8	9	88,89	10	12	83,33	7	9	77,78	5	7	71,43	6	8	75	10	14	71,43	11	14	78,57	20	24	83,33	80,12	3
3	14	18	77,78	9	11	81,82	14	20	70	19	24	79,17	11	16	68,75	15	20	75	19	27	70,37	15	22	68,18	10	24	41,67	17	22	77,27	71,00	2
4	9	17	52,94	4	11	36,36	3	10	30	3	4	75	8	19	42,11	1	8	12,5	3	16	18,75	3	23	13,04	6	16	37,5	5	11	45,45	36,37	2
5	17	19	89,47	8	10	80	9	11	81,82	9	10	90	19	19	100	15	15	100	11	14	78,57	20	24	83,33	25	27	92,59	10	10	100	89,58	3
6	20	22	90,91	8	8	100	8	10	80	23	25	92	20	22	90,91	7	8	87,5	13	13	100	21	23	91,3	28	30	93,33	10	15	66,67	89,26	3
7	18	26	69,23	22	40	55	16	51	31,37	20	28	71,43	22	40	55	26	44	59,09	29	40	72,5	26	42	61,9	29	43	67,44	42	56	75	61,80	2
8	23	33	69,7	30	42	71,43	47	68	69,12	43	54	79,63	64	82	78,05	56	71	78,87	43	101	42,57	57	104	54,81	50	71	70,42	34	80	42,5	65,71	2
9	57	101	56,44	57	85	67,06	35	45	77,78	72	142	50,7	54	79	68,35	64	101	63,37	86	132	65,15	49	87	56,32	57	75	76	59	107	55,14	63,63	2
10	21	28	75	14	18	77,78	27	29	93,1	24	26	92,31	24	25	96	15	15	100	16	16	100	14	17	82,35	14	15	93,33	21	21	100	90,99	3
11	13	16	81,25	13	17	76,47	11	13	84,62	12	15	80	9	11	81,82	15	18	83,33	28	33	84,85	14	24	58,33	18	23	78,26	26	37	70,27	77,92	3
12	16	30	53,33	11	18	61,11	3	16	18,75	13	36	36,11	19	30	63,33	6	17	35,29	13	22	59,09	2	9	22,22	23	44	52,27	10	24	41,67	44,32	2
13	16	22	72,73	21	35	60	14	20	70	18	25	72	20	22	90,91	18	21	85,71	15	23	65,22	21	29	72,41	15	20	75	13	27	48,15	71,21	2
14	14	28	50	4	17	23,53	10	31	32,26	3	12	25	3	5	60	14	35	40	8	12	66,67	4	11	36,36	9	16	56,25	4	14	28,57	41,86	2
15	19	38	50	13	53	24,53	5	37	13,51	9	34	26,47	10	39	25,64	10	34	29,41	17	39	43,59	14	45	31,11	18	66	27,27	7	38	18,42	29,00	2
16	68	68	100	43	46	93,48	37	37	100	18	18	100	16	16	100	21	21	100	15	16	93,75	28	28	100	22	24	91,67	20	20	100	97,89	3
17	40	47	85,11	38	48	79,17	21	36	58,33	24	31	77,42	26	38	68,42	20	39	51,28	24	35	68,57	23	32	71,88	34	51	66,67	30	38	78,95	70,58	2
18	16	56	28,57	16	52	30,77	18	50	36	9	73	12,33	3	60	5	24	74	32,43	9	101	8,911	8	92	8,696	7	75	9,333	8	79	10,13	18,22	1
19	16	30	53,33	15	29	51,72	16	44	36,36	17	38	44,74	36	59	61,02	23	45	51,11	27	46	58,7	27	52	51,92	20	49	40,82	30	46	65,22	51,49	2
20	12	35	34,29	11	26	42,31	18	30	60	29	35	82,86	29	44	65,91	8	37	21,62	7	22	31,82	5	36	13,89	2	20	10	4	28	14,29	37,70	2

(+) células imunopositivas; (T) Total de células no campo; (%) Percentual de células imunopositivas; (P) Percentual médio de células imunopositivas; (E) Escore de imunomarcção.

APÊNDICE G - Ficha de avaliação da expressão imuno-histoquímica de RANKL na cápsula de cisto dentífero

CASOS	1			2			3			4			5			6			7			8			9			10			P	E
	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%		
1	16	22	72,7	19	22	86,4	16	22	72,7	31	46	67,4	13	19	68,4	10	20	50	9	11	81,8	16	19	84,2	21	31	67,7	16	27	59,3	62,6	2
2	23	28	82,1	29	37	78,4	28	34	82,4	31	38	81,6	34	39	87,2	20	23	87	30	33	90,9	22	25	88	10	13	76,9	61	63	96,8	85,1	3
3	7	24	29,2	7	27	25,9	10	19	52,6	5	12	41,7	17	27	63	6	21	28,6	13	16	81,3	10	19	52,6	9	16	56,3	7	18	38,9	47	2
4	3	17	17,6	14	16	87,5	14	18	77,8	6	9	66,7	12	28	42,9	10	18	55,6	5	7	71,4	9	15	60	17	28	60,7	9	17	52,9	59,3	2
5	20	26	76,9	16	20	80	12	15	80	13	20	65	14	19	73,7	19	30	63,3	16	25	64	19	22	86,4	13	17	76,5	12	19	63,2	72,9	2
6	23	25	92	8	13	61,5	10	13	76,9	14	17	82,4	20	25	80	12	14	85,7	22	24	91,7	30	36	83,3	20	28	71,4	31	34	91,2	81,6	3
7	20	53	37,7	12	46	26,1	8	67	11,9	5	63	7,94	16	36	44,4	11	77	14,3	5	48	10,4	6	62	9,68	12	39	30,8	4	33	12,1	20,5	1
8	12	30	40	3	16	18,8	14	27	51,9	17	38	44,7	17	43	39,5	13	59	22	14	53	26,4	12	73	16,4	17	73	23,3	22	66	33,3	31,6	2
9	33	43	76,7	24	42	57,1	29	42	69	36	52	69,2	43	72	59,7	25	34	73,5	31	48	64,6	34	54	63	34	60	56,7	34	55	61,8	65,1	2
10	21	24	87,5	16	18	88,9	16	18	88,9	19	21	90,5	20	22	90,9	17	18	94,4	27	34	79,4	28	32	87,5	25	29	86,2	22	26	84,6	87,9	3
11	10	31	32,3	12	25	48	11	23	47,8	12	23	52,2	7	12	58,3	6	17	35,3	23	36	63,9	21	51	41,2	9	16	56,3	8	21	38,1	47,3	2
12	12	30	40	9	22	40,9	6	27	22,2	3	12	25	6	17	35,3	7	12	58,3	3	21	14,3	6	15	40	3	15	20	9	27	33,3	32,9	2
13	29	33	87,9	30	40	75	32	47	68,1	71	94	75,5	38	65	58,5	12	15	80	19	21	90,5	11	18	61,1	16	31	51,6	39	46	84,8	73,3	2
14	4	5	80	14	15	93,3	11	11	100	21	27	77,8	8	8	100	12	12	100	26	28	92,9	17	21	81	7	8	87,5	7	7	100	91,2	3
15	10	32	31,3	5	27	18,5	16	24	66,7	32	45	71,1	19	38	50	17	33	51,5	15	32	46,9	19	39	48,7	18	63	28,6	27	41	65,9	47,9	2
16	21	22	95,5	7	8	87,5	2	3	66,7	39	57	68,4	6	6	100	0	0	0	3	3	100	4	4	100	2	2	100	6	6	100	81,8	3
17	53	75	70,7	22	28	78,6	39	57	68,4	16	18	88,9	20	27	74,1	18	28	64,3	18	31	58,1	14	27	51,9	18	23	78,3	11	15	73,3	70,6	2
18	18	42	42,9	23	69	33,3	14	53	26,4	15	62	24,2	16	53	30,2	13	86	15,1	8	76	10,5	11	82	13,4	7	72	9,72	12	74	16,2	22,2	1
19	6	33	18,2	5	30	16,7	6	55	10,9	8	37	21,6	4	35	11,4	3	39	7,69	6	42	14,3	4	35	11,4	6	36	16,7	2	27	7,41	13,6	1
20	11	15	73,3	9	12	75	13	15	86,7	21	24	87,5	19	28	67,9	18	23	78,3	9	21	42,9	10	23	43,5	4	20	20	8	23	34,8	61	2

(+) células imunopositivas; (T) Total de células no campo; (%) Percentual de células imunopositivas; (P) Percentual médio de células imunopositivas; (E) Escore de imunomarcção.

APÊNDICE H - Ficha de avaliação da expressão imuno-histoquímica de OPG na cápsula de cisto dentífero

CASOS	1			2			3			4			5			6			7			8			9			10			P	E
	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%	+	T	%		
1	17	18	94,4	17	23	73,9	13	17	76,5	22	31	71	23	32	71,9	13	15	86,7	26	32	81,3	14	20	70	22	30	73,3	22	29	75,9	77,47	3
2	11	16	68,8	20	26	76,9	27	34	79,4	25	32	78,1	18	21	85,7	26	29	89,7	19	21	90,5	56	60	93,3	18	23	78,3	17	22	77,3	81,79	3
3	14	27	51,9	11	25	44	13	27	48,1	12	27	44,4	0	0	0	6	13	46,2	9	15	60	10	19	52,6	10	13	76,9	18	27	66,7	49,08	2
4	21	27	77,8	19	25	76	11	21	52,4	8	12	66,7	9	19	47,4	26	40	65	21	30	70	29	49	59,2	20	23	87	5	10	50	65,13	2
5	15	15	100	7	8	87,5	39	42	92,9	13	16	81,3	11	16	68,8	6	8	75	11	13	84,6	13	15	86,7	22	23	95,7	15	21	71,4	84,37	3
6	8	9	88,9	4	5	80	7	9	77,8	6	8	75	11	15	73,3	8	9	88,9	13	14	92,9	26	25	104	21	22	95,5	17	17	100	87,62	3
7	9	30	30	7	11	63,6	4	30	13,3	4	38	10,5	5	19	26,3	6	34	17,6	13	40	32,5	9	33	27,3	12	31	38,7	12	29	41,4	30,13	2
8	10	20	50	8	14	57,1	9	15	60	11	19	57,9	18	31	58,1	18	54	33,3	18	44	40,9	27	57	47,4	29	70	41,4	23	66	34,8	48,09	2
9	26	52	50	27	71	38	41	67	61,2	24	68	35,3	18	59	30,5	13	61	21,3	39	69	56,5	24	68	35,3	16	35	45,7	22	54	40,7	41,46	2
10	11	15	73,3	12	16	75	15	17	88,2	11	13	84,6	13	14	92,9	24	27	88,9	22	27	81,5	27	30	90	23	28	82,1	29	29	100	85,65	3
11	30	52	57,7	22	44	50	9	21	42,9	14	23	60,9	25	32	78,1	18	24	75	15	18	83,3	8	11	72,7	21	28	75	23	31	74,2	66,97	2
12	0	3	0	3	17	17,6	1	5	20	1	13	7,69	0	8	0	3	23	13	7	22	31,8	0	18	0	4	34	11,8	0	24	0	10,19	1
13	43	53	81,1	49	70	70	47	70	67,1	26	58	44,8	29	59	49,2	39	75	52	39	109	35,8	54	99	54,5	33	64	51,6	20	17	118	62,37	2
14	5	6	83,3	0	0	0	10	13	76,9	10	13	76,9	11	14	78,6	9	27	33,3	9	13	69,2	4	10	40	7	25	28	13	35	37,1	52,34	2
15	18	33	54,5	22	35	62,9	19	35	54,3	17	32	53,1	13	30	43,3	12	25	48	25	50	50	20	54	37	29	44	65,9	15	33	45,5	51,45	2
16	18	22	81,8	29	36	80,6	23	28	82,1	26	30	86,7	18	20	90	38	38	100	33	34	97,1	40	54	74,1	23	32	71,9	28	30	93,3	85,75	3
17	27	39	69,2	35	50	70	26	36	72,2	38	43	88,4	29	33	87,9	29	35	82,9	43	52	82,7	39	51	76,5	37	46	80,4	47	54	87	79,71	3
18	8	96	8,33	19	86	22,1	29	117	24,8	35	114	30,7	25	65	38,5	22	54	40,7	32	56	57,1	12	40	30	21	47	44,7	20	109	18,3	31,52	2
19	0	53	0	0	48	0	7	53	13,2	8	48	16,7	2	42	4,76	9	49	18,4	11	60	18,3	5	53	9,43	5	33	15,2	0	35	0	9,59	1
20	5	17	29,4	13	16	81,3	15	15	100	12	12	100	21	21	100	29	37	78,4	14	23	60,9	6	15	40	7	21	33,3	5	28	17,9	64,11	2

(+) células imunopositivas; (T) Total de células no campo; (%) Percentual de células imunopositivas; (P) Percentual médio de células imunopositivas; (E) Escore de imunomarcção.

APÊNDICE I – Termo de Consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este é um convite para você participar da pesquisa “Expressão imuno-histoquímica das proteínas RANK, RANKL e OPG em Cistos radiculares e Cistos dentígeros” que é coordenada pela Prof Dr Antonio de Lisboa Lopes Costa. Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Essa pesquisa procura estudar o processo de reabsorção do osso que ocorre nas lesões apresentadas por você e diagnosticadas como tal. Caso decida aceitar o convite, a lesão removida por indicação cirúrgica será utilizada para a confecção de lâminas para o estudo, não havendo qualquer prejuízo para você e objetivando no futuro uma melhora nos tratamentos empregados até o momento para estes tipos de lesão.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários.

Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito à indenização.

Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para a Dr Antônio de Lisboa Lopes Costa, na Faculdade de Odontologia (em frente ao Nordeste da Av. Salgado Filho) na disciplina de Patologia Oral, ou pelo telefone (84) 3215-4108.

Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa.

Nome do Voluntário

Assinatura do voluntário

Prof Dr Antonio de Lisboa Lopes Costa

ANEXO

ANEXO

ANEXO A Documento de aprovação do projeto de pesquisa (153/2009) pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.



MINISTÉRIO DE EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

PARECER Nº 153/2009
(Final)

Prof.	056/09 – CEP-UFRN
CAAE	058.0.051.000-09
Projeto de Pesquisa	Expressão Imuno-histoquímica das proteínas RANK, RANK-L e OPG em cistos radiculares e cistos dentígeros
Área de Conhecimento	Ciências da Saúde – Odontologia - Grupo - III
Pesquisador Responsável	Antônio de Lisboa Lopes Costa
Instituição Onde Será Realizado	UFRN
Instituição Sediadora	UFRN – Departamento de Odontologia - Laboratório de Patologia Oral.
Nível de Abrangência do Projeto de Pesquisa	Dissertação de Mestrado
Período de Realização	Início: junho – 2009 Término: agosto/2010
Revisão ética em	26 de junho de 2009

RELATO

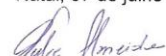
Considerando que as pendências expostas por este Comitê, foram adequadamente cumpridas, o Protocolo de Pesquisa em pauta enquadra-se na categoria de APROVADO.

ORIENTAÇÕES AO PESQUISADOR: em conformidade com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa (Brasília, 2002) e Resol. 196/96 – CNS o pesquisador responsável deve:

1. entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), na íntegra, por ele assinada (Resol. 196/96 – CNS – item IV.2d);
2. desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após a análise das razões da descontinuidade pelo CEP/UFRN (Resol. 196/96 – CNS – item III.3z);
3. apresentar ao CEP/UFRN eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p.41);
4. apresentar ao CEP/UFRN relatório final após conclusão da pesquisa - (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa - CONEP – Brasília – 2002 – p.65);

Os formulários para os Relatórios Parciais e Final estão disponíveis na página do CEP/UFRN (www.etica.ufrn.br).

Natal, 07 de julho de 2009.


Dulce Almeida

COORDENADORA DO CEP-UFRN

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)