

Avaliação do metabolismo epitelial em cistos radiculares pela técnica de AgNORS

Epithelial metabolism evaluation in radicular cysts by the AGNOR technique

Daiana CAVALLI^a, Filipe MODOLO^a, Elena Riet Correa RIVERO^a

^aUFSC – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

Resumo

Introdução: A formação do Cisto Radicular (CR) está associada à proliferação dos restos epiteliais de Malassez por estímulos inflamatórios, provenientes da proliferação bacteriana do canal radicular de um dente não vital. Quando o dente é removido, esse cisto passa a ser denominado Cisto Residual (CRe). O tratamento de escolha para o CR é endodôntico, com o objetivo de eliminar a inflamação presente no periápice. No entanto, em alguns casos, o cisto pode continuar a crescer, necessitando de tratamento cirúrgico, o que ocorre na maioria dos casos de CRe. **Objetivo:** Avaliar o metabolismo do epitélio de revestimento de CR e CRe, utilizando a quantificação das AgNORS, e verificar a influência da presença de inflamação sobre o crescimento desses cistos. **Material e método:** Vinte casos de CR e dez de CRe foram submetidos à técnica de AgNOR. A análise quantitativa das NORs foi realizada utilizando-se o *software* 'Contando células'. O teste estatístico pós-hock de Newman-keuls foi realizado para a comparação do número médio de AgNORS entre CR e CRe, e entre áreas inflamadas e não inflamadas. **Resultado:** Diferença estatisticamente significativa ($p=0,0094$) foi observada entre áreas inflamadas ($1,86\pm 0,26$) e não inflamadas ($1,65\pm 0,20$). Na comparação entre CR ($1,81\pm 0,28$) e CRe ($1,73\pm 0,16$), não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,37$). **Conclusão:** A inflamação interfere no metabolismo epitelial de CR e CRe, o que reflete a ação de fatores de crescimento na proliferação do epitélio, contribuindo para o crescimento do cisto, independentemente da presença do fator etiológico associado com a origem da lesão.

Descritores: Cisto radicular; cisto residual; inflamação; AgNOR.

Abstract

Introduction: Radicular Cyst (RC) development is associated with the activation and proliferation of epithelial rests of Malassez. This occurs due to inflammatory stimuli resulting from bacteria proliferation in the root canal of a non-vital tooth. When the tooth is removed, the cyst becomes known as Residual Cyst (ReC). The RC common treatment is the endodontic therapy, with the aim of eliminating the inflammation in the periapical region. Nonetheless, this treatment is not always effective and the cyst may continue to grow, what happens in most cases of ReC. **Objective:** To evaluate the metabolism of the RC and ReC epithelial lining through the technique of AgNOR quantification and of the influence of the presence of inflammation in the growth of these cysts. **Material and method:** 20 cases of RC and 10 of ReC, were processed by the AgNOR technique. The AgNOR quantitative analysis was performed using the "Counting cells" software. The statistical post-hock Newman-Keuls test was applied to compare the RC and ReC mean number of AgNORS in inflamed and non-inflamed areas. **Result:** Statistically significant difference ($p=0.0094$) was observed between inflamed (1.86 ± 0.26) and non-inflamed (1.65 ± 0.20) areas. No statistically significant difference ($p=0.37$) was observed in the comparison between RC (1.81 ± 0.28) and ReC (1.73 ± 0.16). **Conclusion:** Inflammation interferes in the epithelial metabolism of RC and ReC, reflecting the action of growth factors in epithelial proliferation and contributing to the growth of the cyst, regardless the presence of the etiologic factor associated with the injury origin.

Descriptors: Root cyst; residual cyst; inflammation; AgNOR.

INTRODUÇÃO

Considerando-se que a necrose pulpar, em decorrência de cárie dental, com consequente pulpíte, é um evento frequente na clínica odontológica, o cisto radicular (CR) é o cisto mais frequente nos ossos maxilares¹. A formação do CR está associada à ativação e à proliferação dos restos epiteliais de

Malassez por estímulos inflamatórios, devido à proliferação bacteriana no interior do canal radicular de um dente com necrose pulpar^{2,3}. Quando o dente junto ao qual o cisto se desenvolveu é removido, esse cisto passa a ser denominado Cisto Residual (CRe).

Sabe-se que a presença de fatores de crescimento junto à cápsula conjuntiva de um cisto inflamado influencia na proliferação do epitélio de revestimento do mesmo, contribuindo para o crescimento deste. Dentre estes fatores, podem-se citar citocinas inflamatórias, como as interleucinas 1 e 6 (IL-1 α , IL-1 β , IL-6), e o Fator de Necrose Tumoral (TNF)³. Devido a isso, a primeira linha de tratamento para os CR é o tratamento endodôntico, para eliminar a inflamação presente e permitir a involução da lesão^{4,7}. No entanto, nem sempre esse tratamento é suficiente e o cisto pode continuar a crescer, necessitando de tratamento cirúrgico, o que ocorre na maioria dos casos de CRE que continuam a crescer mesmo na ausência do fator etiológico (canal radicular infectado)^{6,8}.

Uma das formas de se avaliar o metabolismo celular é por meio da técnica de AgNOR. Essa técnica se baseia na ligação da prata coloidal às proteínas ácidas, não histônicas, associadas às Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs). As NORs são fragmentos de DNA localizados sobre a constrição secundária dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 no nucléolo da célula, que transcrevem o RNA ribossômico⁹. Uma vez que as NORs estão diretamente relacionadas com síntese proteica, estas se encontram aumentadas em número de acordo com o aumento do metabolismo celular, o que ocorre quando a célula entra no ciclo celular. O nitrato de prata marca proteínas específicas ligadas à transcrição das NORs, denominadas então de proteínas argirofílicas nucleolares (AgNORs), podendo assim ser vistas como pontos escurecidos no núcleo celular. Logo, quanto mais AgNORs são coradas, maior é a atividade proliferativa daquele tipo celular⁹⁻¹².

Baseado no exposto acima, o objetivo deste trabalho foi avaliar o metabolismo do epitélio de revestimento de cistos radiculares e residuais, utilizando-se a técnica de quantificação das AgNORs, e verificar a influência da presença de inflamação sobre o crescimento desses cistos.

MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina sob o número 131.490.

1. Seleção dos Casos

Por meio de levantamento retrospectivo dos casos de CR e CRE diagnosticados pelo Laboratório de Patologia Bucal (LPB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no período de 2007 a 2012, foram selecionadas lâminas histopatológicas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação em microscopia óptica. Como critério de inclusão, considerou-se a presença de epitélio de revestimento em pelo menos três quartos da lesão. Ao final, obteve-se uma amostra de 20 casos de CR e dez casos de CRE. Os casos selecionados foram também classificados quanto à presença ou não de inflamação na cápsula cística (próximo ao epitélio).

2. Técnica Histoquímica das AgNORs

Cortes histológicos de 3 μ m foram obtidos em lâminas previamente sinalizadas para a realização da técnica de AgNOR. Primeiramente, os cortes histológicos foram desparafinados em banhos de xilol e reidratados, em cadeia descendente de etanol. A seguir, os cortes foram abundantemente lavados em água deionizada e submetidos à técnica do AgNOR, de acordo com Ploton et al.¹³ modificada por Rivero, Aguiar¹⁴.

3. Análise Quantitativa das AgNORs

A análise quantitativa das AgNORs foi realizada em imagens microscópicas captadas por microcâmera e digitalizadas no aumento de 1000 \times , utilizando-se o *software* 'Contando Células'¹⁵. O número médio de AgNORs foi calculado nos casos de CR e de CRE, assim como nas áreas inflamadas e não inflamadas. Para cada área representativa (com e sem inflamação), foram usados de três a oito imagens, totalizando ao menos cem núcleos por área (com e sem inflamação).

4. Análise Estatística das AgNORs

Foram realizadas duas comparações, uma entre os CR e CRE, considerando-se tanto as áreas inflamadas como as não inflamadas; e outra, comparando as áreas inflamadas com as áreas não inflamadas, de ambas as lesões.

Para comparação entre os grupos, foi realizado o teste estatístico pós-hoc de Newman-Keuls, sendo considerado o valor de $p \leq 0,05$ para os dados com significância estatística.

RESULTADO

A média de AgNORs/núcleo em CR e CRE foi de 1.81 ± 0.28 e 1.73 ± 0.16 , respectivamente. Embora a média de NORs/núcleo tenha sido maior nos casos de CR (Figura 1), não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,37$).

Considerando-se os casos de CR e de CRE, em conjunto, foram obtidas 23 áreas inflamadas e 17 áreas não inflamadas. A média de AgNORs/núcleo foi de 1.86 ± 0.26 e 1.65 ± 0.20 , respectivamente, sendo observada diferença estatisticamente significativa ($p=0,0094$) (Figura 2).

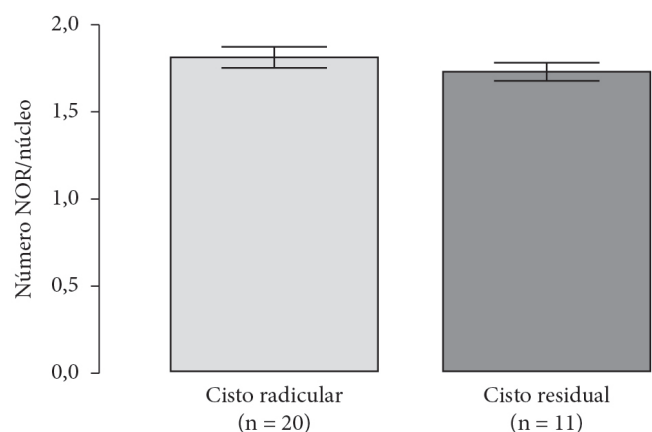


Figura 1. Número médio de NORs/núcleo em CR e CRE.

Na Figura 3, é possível visualizar a histologia do cisto radicular (inflamado) e residual (não inflamado), assim como as AgNORs no núcleo das células epiteliais.

DISCUSSÃO

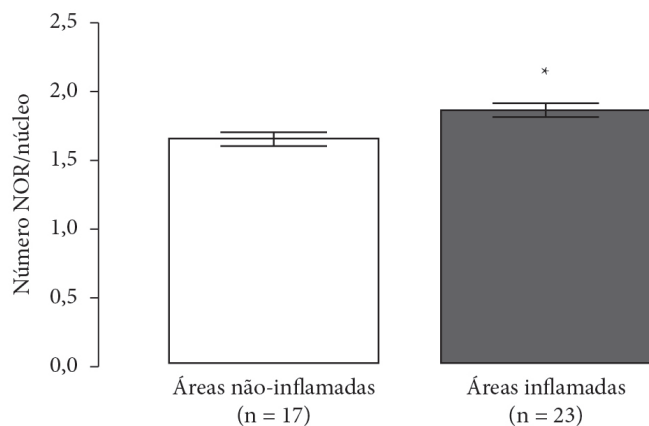
As periodontites apicais se originam pela colonização progressiva de microrganismos e seus produtos nos tecidos periapicais, provenientes da infecção e da necrose pulpar em

decorrência da cárie dentária^{2,3}. Os CRs são os mais comuns dos cistos maxilares¹ e representam de 6% a 55% das periodontites apicais⁴. A sua formação ocorre devido a ativação e proliferação dos restos epiteliais de Malassez por estímulos inflamatórios².

Uma vez que o cisto radicular é um cisto de origem inflamatória, é esperado que, removido o agente etiológico por meio de tratamento endodôntico ou exodontia, a lesão regrida. Alguns estudos têm apresentado índices de sucesso entre 85% e 95% de lesões radiograficamente compatíveis com CR que repararam, após o tratamento endodôntico do dente envolvido^{4,7,16}. Biologicamente, há muitas hipóteses para explicar os mecanismos de reparo após a terapia endodôntica. As células epiteliais do revestimento dos cistos podem parar de proliferar, devido à redução de mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e citocinas inflamatórias, além de os mecanismos de apoptose serem ativados, inibindo, dessa forma, o crescimento da lesão^{17,18}.

A relação entre a proliferação epitelial e a presença de inflamação nos CR é bem estabelecida¹⁸. Considerando-se que a privação de fatores de crescimento – como as citocinas dos processos inflamatórios – estimula as células a entrar em apoptose, é esperado que a remoção do fator etiológico, como no caso do CRe, implique no desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular do revestimento epitelial dos cistos odontogênicos inflamatórios, resultando no reparo dos tecidos periapicais.

Neste trabalho, avaliou-se o metabolismo celular no revestimento epitelial de CRs e CRes, utilizando a técnica



* $p \leq 0,05$

Figura 2. Número médio de NORs/núcleo em áreas que apresentavam regiões inflamadas e não inflamadas de CR e CRe.

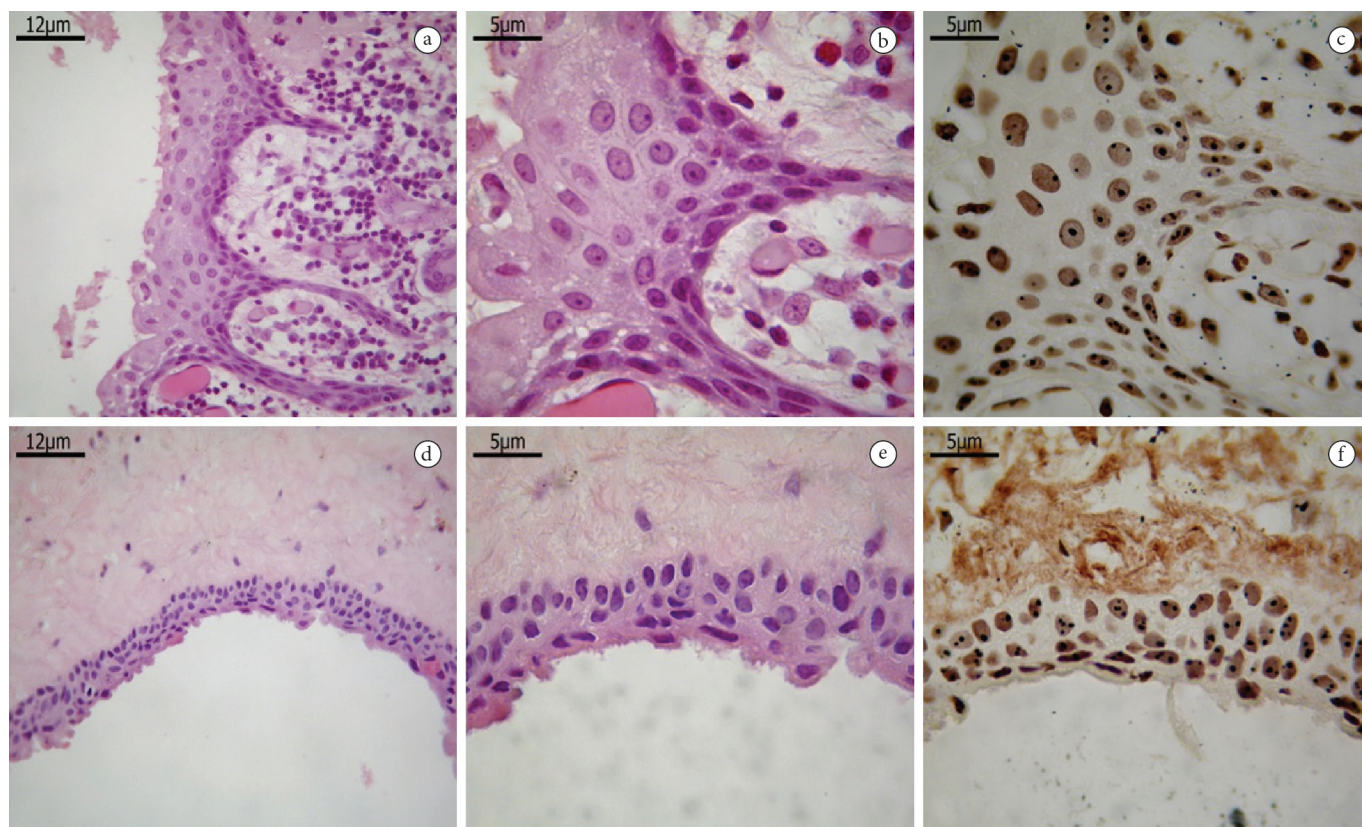


Figura 3. Cisto Radicular: a) Cápsula de tecido conjuntivo intensamente inflamada (H&E, 400×, barra 12 µm); b) Epitélio pavimentoso estratificado com áreas de acantose (H&E, 1000×, barra 5 µm); c) AgNORs evidenciadas no núcleo das células epiteliais (AgNOR, 1000×, barra 5 µm). Cisto Residual: d) cápsula de tecido conjuntivo sem presença de infiltrado inflamatório (H&E, 400×, barra 12 µm); e) Epitélio pavimentoso estratificado (H&E, 1000×, barra 5 µm); f) AgNORs evidenciadas no núcleo das células epiteliais (AgNOR, 1000×, barra 5 µm).

de AgNOR, a fim de relacionar a proliferação celular com o crescimento dessas lesões. Na comparação entre CR e CRe, não foi observada diferença estatisticamente significativa no número médio de AgNORs entre as lesões. Esse resultado sugere uma atividade proliferativa semelhante no revestimento epitelial de CRs e CRes, o que leva a pensar que o CRe continua a crescer mesmo sem o agente contaminante, uma vez que a infecção que gerou o cisto não está mais presente, em contato com a lesão. De acordo com Walton¹⁹, uma vez cessado o estímulo inflamatório, o CRe tende a diminuir de tamanho até a total reparação do tecido ósseo, chegando até mesmo a questionar a real existência do CRe. No entanto, mesmo sem a presença do fator etiológico, outros irritantes – como, por exemplos, cristais de colesterol e presença de material obturador extravasado nos tecidos periapicais – fazem a inflamação persistir, estimulando o cisto a crescer, sem que ocorra a esperada regressão⁵.

De acordo com Nair⁵, a presença ou não de agente infeccioso na lesão inflamatória não é decisiva para determinar a cura ou a progressão da doença, uma vez que as células de defesa do organismo se acumulam nos locais de reação do corpo, produzindo citocinas inflamatórias que reabsorvem osso e dão espaço para que a lesão continue a crescer. No estudo de Muglali et al.²⁰, foi demonstrado que a concentração de algumas citocinas inflamatórias – IL-1 α , TNF- α , proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e RANTES (Regulada sob Ativação, expressa e secretada por células T normais) – era significativamente menor nos fluidos de CRe quando comparada

à concentração dos fluidos de CR, o que justifica o crescimento mais lento dos CRe.

A imunexpressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), citocina relacionada a angiogênese, indução de proliferação, diferenciação e migração celular, também é menor em CRe, quando comparada com granulomas periapicais e CR, o que também contribui para o crescimento mais lento dessa lesão²¹. Embora o CRe tenha um crescimento mais lento quando comparado ao CR, há relatos na literatura de CRes que atingiram grandes proporções^{22,23}.

No presente trabalho, o número médio de AgNORs foi estatisticamente maior nas regiões inflamadas, quando comparadas com áreas não inflamadas. Regiões inflamadas possuem um maior grau de proliferação celular devido a citocinas secretadas por leucócitos, que estimulam a reabsorção óssea, sendo as mais importantes para o crescimento do cisto a IL-1 α e o TNF- α ^{24,25}, ambas encontradas em CR e CRe²⁰.

CONCLUSÃO

A presença de inflamação na cápsula conjuntiva de CRs e CRes estimula a proliferação do epitélio, com conseqüente influência no crescimento do cisto. Embora no CRe não haja mais o fator etiológico presente (canal radicular infectado), a manutenção da inflamação na cápsula, por outros motivos, pode explicar a não regressão de algumas lesões.

REFERÊNCIAS

1. Ramachandran Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;81(1):93-102. [http://dx.doi.org/10.1016/S1079-2104\(96\)80156-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1079-2104(96)80156-9)
2. Lin LM, Huang GT, Rosenberg PA. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *J Endod.* 2007;33(8):908-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2007.02.006>
3. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(6):348-81. <http://dx.doi.org/10.1177/154411130401500604>
4. Nair PN. New perspectives on radicular cysts: do they heal? *Int Endod J.* 1998;31(3):155-60. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2591.1998.00146.x>
5. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review *Int Endod J.* 2006;39(4):249-81. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01099.x>
6. Oehlers FA. Periapical lesions and residual dental cysts. *Br J Oral Surg.* 1970;8(2):103-13. [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-117X\(70\)80001-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-117X(70)80001-4)
7. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Riche FN, Provenzano JC. Clinical outcome of the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using an antimicrobial protocol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(5):757-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.06.007>
8. High AS, Hirschmann PN. Age changes in residual radicular cysts. *J Oral Pathol.* 1986;15(10):524-8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.1986.tb00570.x>
9. Trerè D. AgNOR staining and quantification. *Micron.* 2000;31(2):127-31. [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00069-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00069-4)
10. Coleman HG, Altini M, Groeneveld HT. Nucleolar organizer regions (AgNORs) in odontogenic cysts and ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 1996;25(8):436-40. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.1996.tb00293.x>
11. Pich A, Chiusa L, Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron.* 2000;31(2):133-41. [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00070-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00070-0)
12. Rivero ER, Caliarì MV, Tarquínio SB, Loyola AM, de Aguiar MC. Proliferative activity in oral salivary gland tumors: the role of PCNA and AgNOR assessed by a double staining technique. *J Oral Sci.* 2004;46(2):87-92. <http://dx.doi.org/10.2334/josnusd.46.87>
13. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J.* 1986;18(1):5-14. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01676192>

14. Rivero ERC, Aguiar MCF. Análise quantitativa das AgNORs no carcinoma adenoide cístico intra-oral através da técnica de dupla marcação PCNA/AgNOR. *J Bras Patol Med Lab.* 2002;38(1): 39-44. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442002000100008>
15. Ferreira AA, Krause CI, Costa MH, Rivero ER, Tarquínio SB. An image processing software applied to oral pathology. *Pathol Res Pract.* 2011;207(4):232-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2011.02.002>
16. Soares J, Santos S, Silveira F, Nunes E. Nonsurgical treatment of extensive cyst-like periapical lesion of endodontic origin. *Int Endod J.* 2006;39(7):566-75. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01109.x>
17. Loyola AM, Cardoso SV, Lisa GS, Oliveira LJ, Mesquita RA, Carmo MA, et al. Apoptosis in epithelial cells of apical radicular cysts. *Int Endod J.* 2005;38(7):465-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.00971.x>
18. Martins CA, Rivero ER, Dufloth RM, Figueiredo CP, Vieira DS. Immunohistochemical detection of factors related to cellular proliferation and apoptosis in radicular and dentigerous cysts. *J Endod.* 2011;37(1):36-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2010.09.010>
19. Walton RE. The residual radicular cyst: does it exist? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;82(5):471. [http://dx.doi.org/10.1016/S1079-2104\(96\)80185-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1079-2104(96)80185-5)
20. Muglali M, Komerik N, Bulut E, Yarim GF, Celebi N, Sumer M. Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cyst fluids. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(3):185-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00595.x>
21. Nonaka CF, Maia AP, Nascimento GJ, de Almeida Freitas R, Batista de Souza L, Galvão HC. Immunoexpression of vascular endothelial growth factor in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(6):896-902. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.06.028>
22. Dimitroulis G, Curtin J. Massive residual dental cyst: case report *Aust Dent J.* 1998;43(4):234-7.
23. Strickland M, Singer SR, Rinaggio J, Kim IH, Mupparapu M. Large, expansile odontogenic cyst with bilateral maxillary sinus involvement. *N Y State Dent J.* 2013;79(2):38-40.
24. Bando Y, Henderson B, Meghji S, Poole S, Harris M. Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 1993;22 (5): 221-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.1993.tb01060.x>
25. Meghji S, Qureshi W, Henderson B, Harris M. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. *Arch Oral Biol.* 1996;41(6):523-31. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9969\(96\)00032-5](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9969(96)00032-5)

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Elena Riet Correa Rivero

Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Campus Universitário, Trindade, 88040-970 Florianópolis - SC, Brasil
e-mail: riet.elena@gmail.com

Recebido: Setembro 26, 2013

Aprovado: Dezembro 23, 2013