

Avaliação do índice apoptótico em epitélio atrófico e hiperplásico dos cistos periapicais

Apoptotic index in periapical cysts with atrophic and hyperplastic epithelium

Luis Felipe Lukschal ^I | Rosana Maria Leal ^{II}

RESUMO

Objetivos: este estudo identifica a ocorrência de apoptose em cistos periapicais com epitélio atrófico e hiperplásico, faz um estudo morfológico quantificando os índices apoptóticos e verifica diferenças quantitativas entre eles. **Metodologia:** foram selecionadas 15 amostras de cisto periapical com a maior parte do revestimento epitelial representado pelo epitélio atrófico e 15 amostras de cisto periapical com a maior parte do revestimento epitelial representado pelo epitélio hiperplásico, todas provenientes do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Os blocos foram cortados em seções de 4µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE), para realização do diagnóstico histopatológico e com Metil-Green-Pironina (MGP), para a avaliação da ocorrência de células apoptóticas. Para a confirmação da apoptose, utilizou-se o método do TUNEL. **Resultados:** a análise estatística entre o IA dos epitélios atrófico e hiperplásico dos cistos periapicais mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre esses dois tipos de epitélio ($p > 0,05$).

91

Descritores: Fisiologia celular; Morte celular; Apoptose; Doenças estomatognáticas; Doenças maxilomandibulares; Cistos maxilomandibulares; Cistos odontogênicos; Cisto radicular.

ABSTRACT

Objectives: This study describes the occurrence of apoptosis in periapical cysts with atrophic and hyperplastic epithelium, making a morphologic study quantifying the apoptotic indices and verifying the quantitative differences between them. **Methodology:** 15 samples of periapical cyst with most of the epithelial lining represented by the atrophic type and 15 samples with most of the epithelium lining represented by the hyperplastic type were selected, all originating in the Anatomical Pathology Laboratory of the Dental School, Pontificia Universidade Católica of Minas Gerais. The blocks were cut into 4µm-thick sections and stained with hematoxilina and eosine (HE) for performing the histopathologic diagnosis and with methyl (MGP) for evaluation of the occurrence of apoptotic cells. For the confirmation of apoptosis the tunnel method was used. **Results:** The statistical analysis comparing the atrophic and hyperplastic epithelium of the periapical cysts showed that there were no statistically significant differences between these two types of ephelium ($p > 0.05$).

I. Especialista em Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial pela PUC Minas - FHEMIG - Hospital da Baleia.

II. Cirurgiã-Dentista, especialista em Radiologia, Estomatologia e Patologia Bucal. Mestre em Estomatologia. Professora de Estomatologia e Clínica Integrada do Departamento de Odontologia da PUC Minas, MG.

Descriptors: Cell physiology, Cell death, Apoptosis, Stomatognathic diseases, Jaw diseases, Jaw cysts, Odontogenic cysts, radicular cyst.

INTRODUÇÃO

A manutenção da homeostasia tecidual nos organismos multicelulares é assegurada por diferentes mecanismos biológicos regulatórios, entre eles, a apoptose. O termo apoptose, descrito pela primeira vez por KERR, WYLLIE & CURRIE ¹, em 1972, é de origem grega (apo=separação, ptosis=queda) e significa a queda de folhas das árvores ou das pétalas de uma flor em analogia, para representar a morte celular fisiológica que implica renovação. ^{2, 3, 4, 5}

A apoptose é uma forma de morte celular, que se distingue da necrose por dois aspectos básicos: primeiro, porque é um processo ativo, durante o qual os componentes celulares se reorganizam e se agrupam, formando, posteriormente, fragmentos celulares envoltos por membrana (corpos apoptóticos), os quais não sofrem autólise, mas são fagocitados por células vizinhas; o outro aspecto básico é que a apoptose acomete células individualmente ou em pequenos grupos celulares. ^{2, 3}

O mecanismo de apoptose é encontrada nos processos fisiológicos, como os que ocorrem durante a morfogênese dos órgãos, tanto na vida embrionária como após o nascimento. Como processo patológico, a apoptose é observada em lesões induzidas por agressão imunitária celular, por radiações ionizantes ou por drogas citotóxicas e por neoplasias malignas. ^{6, 7, 8}

Os cistos periapicais representam quase a metade de todos os cistos relatados na literatura. Acomete mais pessoas do gênero masculino, entre a terceira e sexta década de vida, embora seja relativamente incomum na primeira década, ainda que cárie e dentes sem vitalidade sejam frequentes nesse grupo etário. ^{9, 10} A maioria dos cistos periapi-

cais localiza-se na maxila, região anterior, seguido da região maxilar posterior, região posterior da mandíbula e região anterior inferior. ¹¹

Na literatura, os cistos periapicais são muito bem reconhecidos e descritos, inclusive com relação ao índice mitótico, entretanto os estudos sobre apoptose nessas lesões são escassos. Portanto, com este trabalho, pretendeu-se aumentar o conhecimento sobre apoptose, analisando-se e comparando-se o índice apoptótico entre o epitélio atrófico e hiperplásico dessas lesões.

METODOLOGIA

Para este estudo, foram selecionadas 15 amostras de cisto periapical com a maior parte do revestimento epitelial representado pelo epitélio atrófico e 15 amostras de cisto periapical com a maior parte do revestimento epitelial representado pelo epitélio hiperplásico, todas provenientes do laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. O material já se encontrava fixado em formol a 10%, processado e incluído em blocos de parafina. Os blocos foram cortados em secções de 4µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE), para realização do diagnóstico histopatológico e com Metil-Green-Pironina (MGP), para a avaliação da ocorrência de células apoptóticas respectivamente. Para a confirmação da apoptose, utilizou-se o método do TUNEL. O número de campo a ser contado foi determinado pelo método descrito por SAMPAIO ¹², e foram contados 6 campos para os cistos periapicais com epitélio atrófico e 8 campos para os cistos periapicais com epitélio hiperplásico em um

microscópio de luz, marca Karl Zeiss utilizando-se a objetiva de imersão de 1000X que proporciona uma área total de contagem de 8.533,37 mm². O critério proposto por LIPPONEN & AALTOMAA¹³, para identificação e contagem das células e corpos apoptóticos foi utilizado, quantificando-se as células que apresentavam condensação nuclear e citoplasmática e fragmento de citoplasma contendo densa condensação de cromatina. Foi realizada uma análise não paramétrica na comparação de dois grupos independentes, com distribuição normal, utilizando-se o teste de Mann Whitney ao nível de significância de 0,05, adotando-se recursos compu-

tacionais dos programas Excell 2007 e SPSS versão 10 para os cálculos estatísticos a fim de testar as hipóteses de haver ou não diferenças significantes entre o índice apoptótico de cistos periapicais com o epitélio atrófico e com o epitélio hiperplásico.

RESULTADOS

Os dados relativos a sexo, à cor, à idade, à localização e ao tempo da doença para as amostras do cisto periapical com epitélio atrófico e hiperplásico estão representados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Relação dos pacientes do cisto periapical com epitélio atrófico com os dados relativos ao gênero, à cor, à idade, à localização e ao tempo da doença.

Casos	Gênero	Cor	Idade	Localização	Tempo da Doença
1	F	L	37	17	INDETERMINADO
2	M	L	20	28	INDETERMINADO
3	F	L	43	14	INDETERMINADO
4	F	F	25	36	INDETERMINADO
5	M	F	34	22	4 ANOS
6	M	L	21	46	INDETERMINADO
7	F	M	65	11 e 12	INDETERMINADO
8	M	L	53	13	INDETERMINADO
9	F	M	61	22	INDETERMINADO
10	M	L	36	26	INDETERMINADO
11	M	F	43	12 e 13	7 MESES
12	F	L	24	16	INDETERMINADO
13	F	L	42	26	2 ANOS
14	M	F	24	17	INDETERMINADO
15	M	L	59	34	6 ANOS

M=masculino, F=feminino, L=leucoderma, F=feoderma, M=melanoderma.

Tabela 2- Relação dos pacientes do cisto periapical com epitélio hiperplásico com os dados relativos ao gênero, à cor, à idade, à localização e ao tempo da doença

Casos	Gênero	Cor	Idade	Localização	Tempo da Doença
1	F	L	16	11	5 MESES
2	F	L	28	25	INDETERMINADO
3	M	F	43	36	INDETERMINADO
4	F	L	51	23	5 ANOS
5	M	L	24	12 e 13	2 ANOS
6	M	L	32	22	INDETERMINADO
7	F	F	35	27	INDETERMINADO
8	M	M	19	11 e 12	4 MESES
9	M	M	24	12	5 ANOS
10	F	L	43	12	6 ANOS
11	M	M	68	42	INDETERMINADO
12	M	F	57	13	INDETERMINADO
13	F	F	43	26	INDETERMINADO
14	M	M	22	22	INDETERMINADO
15	M	M	26	11 e 12	8 MESES

94 M=masculino, F=feminino, L=leucoderma, F=feoderma, M=melanoderma.

Uma amostra de cisto periapical apresentando os dois tipos de epitélio (atrófico e hiperplásico), corados em HE, utilizada para diagnóstico, pode ser observada na Fig.1. As células do revestimento epitelial dos cistos periapicais coradas em metil-green-pironina (MGP) apresentaram-se de cor rosa. As células epiteliais em apoptose mostraram-se condensadas e com os núcleos corados mais intensamente e um halo claro ao redor (FIG. 2 e 3).

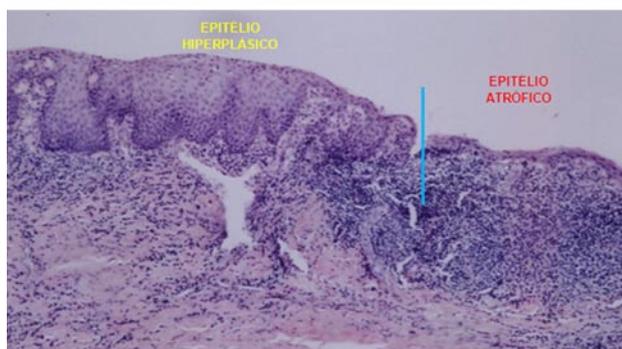
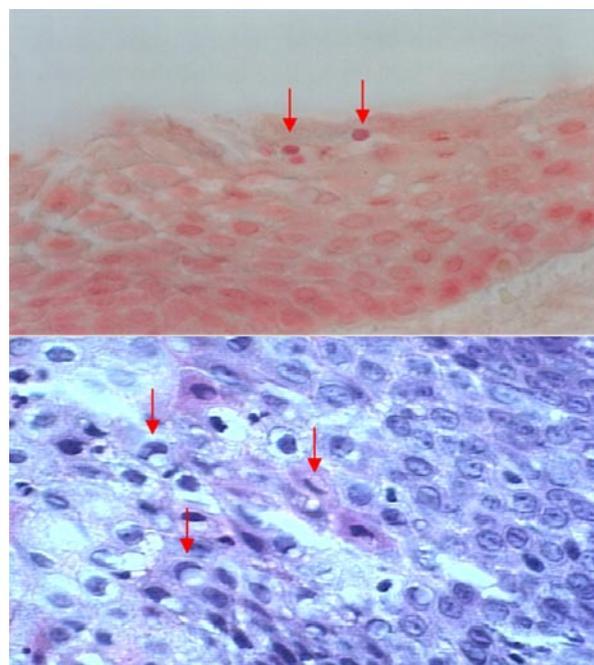
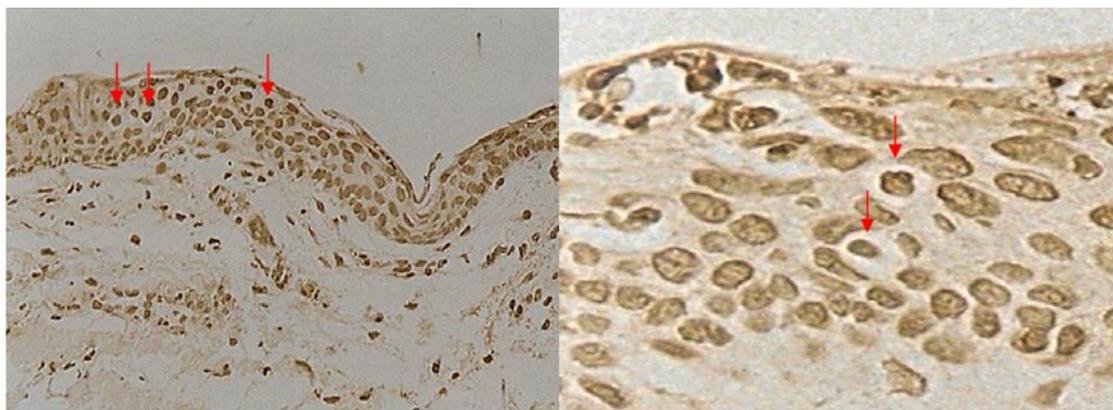


Figura 1 – Amostra de cisto periapical exibindo epitélio atrófico e hiperplásico corada em HE (aumento de 100x).



Figuras 2 e 3 – Células apoptóticas do revestimento epitelial dos cistos periapicais coradas em MGP (1000X).

A confirmação do processo de apoptose foi feita pela técnica do TUNEL (Fig. 4).



Figuras 4 e 5 – Marcação positiva dos fragmentos de DNA em células do revestimento epitelial dos cistos periapicais corado pelo TUNEL (400X e 1000X).

O índice apoptótico (IA) dos cistos periapicais com epitélio atrófico e hiperplásico, respectivamente, variou de 0,07804 a 0,10032 ($p > 0,05$) e de 0,07631 a 0,10862 ($p > 0,05$). A análise estatística mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre esses dois tipos de epitélio ($p > 0,05$) (GRAF. 1).

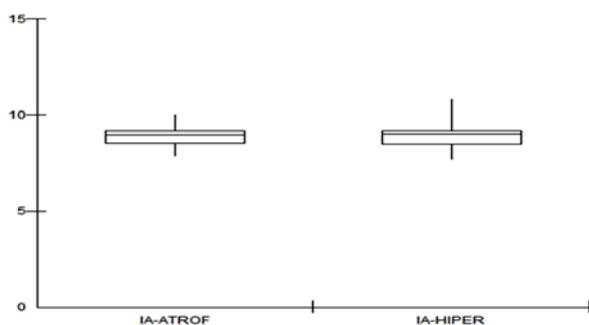


Gráfico 1 – IA entre epitélio atrófico e hiperplásico dos cistos periapicais.

DISCUSSÃO

A apoptose é um processo fisiológico, que tem como finalidade o controle da população celular e eliminação de células envelhecidas que perderam a sua função, que sofreram algum tipo de alteração no seu genoma e em diversos processos inflamatórios agudos ou crônicos.^{2, 3, 4, 5, 6, 7, 8}

Nos maxilares, as lesões inflamatórias mais comumente encontradas são os cistos e os granulomas

periapicais, pois são formados nos ápices de dentes com polpas necróticas. Até o presente momento, os trabalhos relacionados à apoptose nessas lesões foi o de TAKAHASKI et al.¹⁴, avaliando apoptose em leucócitos no tecido conjuntivo fibroso e SUZUKI et al.¹⁵ e LOYOLA et al.¹⁶. Dessa forma, a apoptose foi analisada neste estudo, particularmente nos epitélios atróficos e hiperplásicos dos cistos periapicais, de forma a contribuir para o entendimento da patogenia desta.

As secções coradas em HE apresentaram os achados histológicos principais para o diagnóstico dos cistos periapicais. Esses cistos são considerados sequelas diretas dos granulomas. A proliferação dos restos epiteliais de Malassez com posterior destruição das células mais centrais por atividades enzimáticas que causam alterações celulares morfológicas características de necrose com consequente formação da cavidade cística, não obstante, pode ser capaz de induzir à apoptose muito mais do que à necrose.^{17, 18, 19, 20, 21}

Para a quantificação das células e corpos apoptóticos, foi utilizado o critério proposto por LIPPONEN & AALTOOMAA¹³, que é baseado nas características morfológicas de condensação nuclear e citoplasmática e fragmentos de citoplasma contendo cromatina. Nas células epiteliais do revestimento da cavidade cística, as alterações

morfológicas das células apoptóticas foram bem reconhecidas em HE, entretanto se utilizou, para a contagem das células e corpos apoptóticos, as secções coradas em Metil-Green-Pironina, que é específica para ácidos nucleicos, pois esses corantes ligam-se aos grupos fosfóricos do DNA, tornando as modificações nucleares das células em apoptose mais facilmente detectáveis.²²

Em análise imunohistoquímica de fatores relacionados à apoptose no revestimento epitelial de cistos radiculares, SUZUKI et al.¹⁵ sugeriram que a atividade apoptótica no revestimento epitelial cístico é diferente da que ocorre no epitélio normal, provavelmente relacionada ao processo inflamatório. Demonstraram que a expressão do p53 pode refletir tanto no potencial proliferativo quanto na indução da apoptose nos cistos periapicais. Detectaram também a presença de bax e bcl-2 em células da camada basal. Nos cistos periapicais com intenso infiltrado inflamatório, houve maior expressão do bax, e, nos cistos com infiltrado inflamatório escasso, menor expressão do bcl-2, sugerindo que esses membros da família Bcl-2 contribuem para a proliferação e a morte celular programada no revestimento epitelial das lesões inflamatórias periapicais e que são afetados pelo processo inflamatório nessas lesões. A presença da caspase-3 foi observada nas células superficiais do epitélio cístico, sugerindo que o aumento da expressão dessas proteases reflète na regulação não só da apoptose mas na proliferação do revestimento epitelial cístico. A expressão de Fas e Fas-L foi baixa no epitélio dos cistos radiculares, sugerindo pouca importância na proliferação celular e na apoptose.

LOYOLA et al.¹⁶ investigaram o IA nas células epiteliais de cistos radiculares apicais divididos em dois grupos, de acordo com o estágio funcional: atróficos, considerados cistos estáticos e hiperplásicos, considerados cistos ativos. Células apoptóticas foram observadas no epitélio de todos os cistos. Apoptose foi mais frequente nos cistos com epitélio

atrófico do que nos cistos com epitélio hiperplásico, embora diferenças estatísticas não tenham sido significantes.

A média do IA entre o epitélio hiperplásico e o epitélio atrófico não mostrou haver diferenças estatisticamente significativas entre esses dois tipos de revestimento epitelial cístico, resultado semelhante ao relatado por LOYOLA et al.¹⁶. Tal fato demonstra que as células epiteliais sofrem o processo de diferenciação e terminam por descamar na superfície, o que, no caso dos cistos, ocorreria dentro da cavidade destes.

CONCLUSÕES

1. As células apoptóticas foram observadas morfologicamente, no epitélio atrófico e hiperplásico dos cistos periapicais.
2. Embora a apoptose tenha sido mais observada em cistos periapicais com epitélio hiperplásico, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os IA's dos dois tipos de revestimento epitelial cístico. O fato de ocorrer mais apoptose no epitélio hiperplásico poderia estar relacionado a um maior índice de proliferação celular e à presença de um infiltrado inflamatório mononuclear mais intenso neste tipo de revestimento epitelial.
3. No processo de formação da cavidade cística, a presença de isquemia moderada induz ativações enzimáticas que causam alterações celulares. Essas são características de necrose e são possíveis ocorrer muito mais à apoptose do que à necrose, entretanto outros trabalhos devem ser realizados para investigar esse fenômeno na patogênese dos cistos periapicais bem como no comportamento biológico e nas modalidades de tratamento dessas lesões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Kerr, J.F.R.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 1972;26(7):239-257.
- 2) Diamantis, A.; Maglorkinis, E.; Sakorafas, G.H.; Androustos, G. A brief history of apoptosis: from ancient to modern times. *Onkologie* 2008 Dec;31(12):702-706.
- 3) Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4), 495-516.
- 4) Häcker, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000 Jun;301(1):5-17.
- 5) Vaughan, A.T.M.; Betti, C.J.; Villalobos, M.J. Surviving apoptosis. *Apoptosis* 2002;7(2):173-177.
- 6) Ameisen, J. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death and Differentiation* 2002;9(4):367-393.
- 7) Jiang, Z.F.; Zhao, Y.; Hong, X.; Zhai, Z.H. Nuclear apoptosis induced by isolated mitochondria. *Cell Research* 2000;10(3):221-232.
- 8) Stepien, A.; Izdebska, M.; Grzanka, A. The types of cell death. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007 Jul;61:420-428.
- 9) Gomez, R.S.; Figueiredo, P.F.; Capistrano, H.M.; Loyola, A.M. Levantamento das biópsias bucais realizadas na Faculdade de Odontologia da UFMG. *Arq. Centr Est. Odont. B. Hor.* 1992 Jul/Dez;29(2):105-113.
- 10) Raitz, R.; Nardi, H.; Almeida, T.E.; Araújo, V.C. Cisto radicular: uma análise epidemiológica de 1.507 casos. *RPG rev. Pos-grad.* 2000 Jan/Mar;7(1):27-30.
- 11) Souza, M.E.; Torres, M.A.; Duarte, A.H.S.; Sobral, A.P.V. Lesões periapicais: estudo epidemiológico. *RBPO* 2003 Jan/Mar;2(1):39-46.
- 12) Sampaio, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Fundação de ensino e pesquisa em medicina veterinária e zootecnia. Belo Horizonte 1998, cap.2, 7-13.
- 13) Lipponen, P.K.; Aaltomaa, S. Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *J. Pathol.* 1994;173(6):333-339.
- 14) Takahashi, K.; MacDonald, D.; Murayama, Y.; Kinane, D. Cell synthesis, proliferation and apoptosis in human dental periapical lesions analysed by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Oral Dis.* 1999 Oct;5(4):313-320.
- 15) Suzuki, T.; Kumamoto, H.; Kunimori, K.; Ooya, K. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(1):46-52.
- 16) Loyola, A.M.; Cardoso, S.V.; Lisa, G.S.; Oliveira, L.J.; Mesquita, R.A.; Carmo, M.A.V.; Aguiar, M.C.F. Apoptosis in epithelial cells of apical radicular cysts. *Int Endod J.* 2005;38(7):465-69.
- 17) Blagosklonny, M.V. Apoptosis, proliferation, differentiation: in search of the order. *Seminars in Cancer Biology* 2003;13(2):97-105.
- 18) Chu, D.; Qui, J.; Grafe, M.; Fabian, R.; Kent, T.A.; Rassin, D.; Nestic, O.; Werrbach-Perz, K.; Perez-Polo, R. Delayed cell death signaling in traumatized central nervous system: hypoxia. *Neurochemical Research* 2002;27(1-2):97-106.
- 19) Figueiredo, C.R.L.V.; Santos, J.N.; Albuquerque, J.; Cavalcanti, R.L. Immunopathological mechanisms involved in the growth and expansion of radicular cysts. *RPG rev. pos-grad.* 1999 Abr/Jun;6(2):180-187.
- 20) Lin, L.M.; Huang, G.T.; Rosenberg, P.A. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *J Endod.* 2007 Aug;33(8):908-916.
- 21) Ricucci, D.; Pascon, E.A.; Ford, T.R.; Langgeland, K. Epithelium and bacteria in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Feb;101(2):239-249.

22) McElroy, D.A.; Prophet, E.B.; Mills, B.; Arrington, J.B. Methyl green-pyronin method for DNA and RNA. Laboratory methods in histotechnology. Washington: American Registry of Pathology 1992;143-144.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Luis Felipe Lukschal

Rua Afonso Pena, 19 - Conselheiro Lafaiete

Minas Gerais

(31) 3763-3241 / (31) 9930-1001

Email: luislukschal@yahoo.com.br