

**PATRÍCIA ALVAREZ RUIZ**

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA MMP-9, VEGF E FVW EM  
GRANULOMAS PERIAPICAIS, CISTOS PERIAPICAIS E CISTOS  
PERIAPICAIS RESIDUAIS.**

**BRASÍLIA, D.F.**

**2008**

**PATRÍCIA ALVAREZ RUIZ**

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA MMP-9, VEGF E FVW EM  
GRANULOMAS PERIAPICAIS, CISTOS PERIAPICAIS E CISTOS  
PERIAPICAIS RESIDUAIS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Orlando Ayrton de Toledo.

**BRASÍLIA, D.F.**

**2008**

À minha família, meus queridos avós Tomás e Maria Jesus, meus pais Ronaldo e Yolanda, meus irmãos Paloma e Eduardo e meu cunhado Rodrigo, pelo amor e apoio incondicionais, essenciais para todas as conquistas de minha vida. Amo vocês!

Ao querido e saudoso Mestre Sérgio Valmor Barbosa, pessoa ímpar, indescritível e insubstituível, não só por ter acreditado no meu potencial, mas, principalmente, pela oportunidade de convivência que muito somou à minha existência e que certamente modificou minha conduta em relação à vida.

*“Não sei se a vida é curta ou longa demais pra nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocamos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita. Alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura. Enquanto durar.”*

*Cora Coralina*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador querido Professor Orlando Ayrton de Toledo, pela disposição em me acolher a despeito de toda dificuldade do momento, pela imensurável ajuda, e, principalmente, pela confiança em mim depositada. Meus sinceros agradecimentos.

À querida Professora Lélia Batista de Souza pelo carinho e colo maternos, pela amizade e pela infindável atenção, paciência e disponibilidade a mim dedicada. Serei sempre grata.

*“Um professor afeta a eternidade. Ele nunca será capaz de dizer quando a sua influência se detém.” Henry Adanson.*

## AGRADECIMENTOS

*"Não existe esta coisa de homem feito por si mesmo. Somos formados por milhares de outros. Cada pessoa que alguma vez tenha feito um gesto bom por nós, ou dito uma palavra de encorajamento para nós, entrou na formação do nosso caráter e nossos pensamentos, tanto quanto do nosso sucesso." George Matthew Adams.*

Ao amigo Cassiano Nonaka, companheiro infalível desta empreitada. Não existem palavras que expressem verdadeiramente minha gratidão à sua imensurável ajuda desde a idealização desta pesquisa até sua etapa final, sempre de forma prestativa e entusiasmada. Além de tudo, pelos momentos compartilhados, os quais, apesar de árduos, deixaram saudade. Sem sua ajuda certamente esta pesquisa não se concretizaria. Serei infinitamente grata.

Às queridas amigas Érica Coutinho, Érica Rodrigues, Gabriela Borba, Katia Gramelisch, Mônica Afonso, Patrícia Duarte, Taia Rezende e Tayza Sousa pela verdadeira amizade, pelo carinho, incentivo e otimismo para que tudo desse certo. Por compreenderem minha ausência e relevarem minha chatice em algumas ocasiões.

*"Amigo fiel é poderosa proteção: quem o encontrou, encontrou um tesouro. Ao amigo fiel não há nada que se compare, pois nada equivale ao bem que ele é. O amigo fiel é bálsamo de vida; os que temem ao Senhor vão encontrá-lo." Eclo 6, 14-16.*

À amiga Gertrude Craesmeyer pelas palavras de conforto e perseverança nos momentos de maior incerteza quanto à exequibilidade desta pesquisa e por sua disposição em ajudar na superação de todas as dificuldades. Muito Obrigada!

À minha grande amiga Karina Maciel pela amizade e companheirismo, reafirmados com a distância, e à sua família pela calorosa acolhida em Natal. Saudade amiga!

Às amigas Ângela Medeiros, Karuza Pereira e Márcia Miguel pela maneira que me receberam e pelos bons momentos compartilhados em Natal.

Ao querido amigo Kenio Lima pela valiosa contribuição na análise estatística desse trabalho e pelos saudosos momentos de outrora revividos neste período.

*“Sou um pouco de todos que conheci, um pouco dos lugares que fui, um pouco das saudades que deixei, sou muito das coisas que gostei. Entre umas e outras errej, entre muitas e outras conquistei.” Ramon Hasman.*

Às funcionárias da Disciplina de Patologia Oral, Gracinha e Sandrinha pela pronta disponibilidade, por toda a atenção e a forma carinhosa com que sempre me trataram.

Ao biólogo Hévio Freitas de Lucena pela incansável ajuda na etapa laboratorial dessa pesquisa, sempre de forma solícita e solidária.

Aos professores Ana Cristina Barreto Bezerra, Soraya Coelho Leal e Carlos Gramani Guedes pelas considerações acerca do projeto que originou esta pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte que gentilmente cedeu o material e as instalações para a realização dessa pesquisa.

Àqueles que porventura a traição da memória tenha-me feito omitir e que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização de mais esse desafio.

A Deus por sempre ter-me oferecido motivos pelos quais agradecer.

*“Se eu falasse a língua dos homens e dos anjos, mas não tivesse amor, eu seria como um bronze que soa ou um címbalo que retine. Se eu tivesse o dom da profecia, se conhecesse todos os mistérios da ciência, se tivesse toda a fé, a ponto de remover montanhas, mas não tivesse amor, eu nada seria.” I Cor 13, 1-2.*

*De tudo ficarão três coisas:  
A certeza de que estamos começando,  
A certeza de que é preciso continuar,  
A certeza de que podemos ser  
interrompidos antes de terminar.*

*Fazer da interrupção, um caminho  
novo.  
Fazer da queda, um passo de dança.  
Do sonho, uma ponte.*

*Fica a promessa do reencontro...  
Fica o desejo de boa sorte...  
Fica a vontade de lutar e vencer...*

*Fernando Sabino*

## RESUMO

A angiogênese tem sido implicada na patogênese das lesões periapicais e para que ela ocorra é necessária a atuação de potentes fatores pró-angiogênicos e a participação das MMPs na degradação da matriz extracelular. O objetivo deste estudo foi investigar a imunexpressão da MMP-9, do VEGF e do FvW em granulomas periapicais (GP), cistos periapicais (CP) e cistos periapicais residuais (CPR) no intuito de verificar a participação da angiogênese no desenvolvimento destas lesões. A análise quantitativa do VEGF nas células do tecido conjuntivo revelou número de médio de células imunorreativas semelhante nos GP e CP (564,9 e 565,0, respectivamente) e maior que nos CPR (443,9), não havendo diferença estatisticamente significativa. Lesões com intenso infiltrado inflamatório apresentaram maior número de células imunorreativas ao VEGF em comparação com lesões que apresentavam leve infiltrado inflamatório ( $p < 0.01$ ). No revestimento epitelial, o VEGF revelou forte expressão tanto em CP (55%) quanto em CPR (70%), padrão observado também nos casos de epitélio atrófico (66,7%) e hiperplásico (55,6%), não havendo diferença estatisticamente significativa entre o dois tipos de cistos ( $p > 0.05$ ) e entre os cistos de revestimento epitelial atrófico e hiperplásico ( $p > 0.05$ ). O número médio de vasos imunorreativos ao FvW foi maior nos CP (250,8) que nos GP (210,4) e nos CPR (217,0), sem haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0.05$ ). Lesões que apresentavam intenso infiltrado inflamatório exibiram maior número de vasos imunomarcados que aquelas com leve ou moderado infiltrado inflamatório ( $p < 0.05$ ). Não houve correlação entre a quantidade de células imunorreativas para o VEGF e o número de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW ( $r = 0.224$ ;  $p = 0,118$ ). A MMP-9 revelou marcada tendência à forte expressão na maioria dos casos de GP (70%) e CP (70%) e fraca expressão nos casos de CPR (60%). Houve associação entre a forte expressão da MMP-9 nas células endoteliais e um intenso infiltrado inflamatório ( $p = 0,055$ ). Além disso, foi observado maior número de células imunopositivas para o VEGF ( $p < 0.01$ ) e maior número de vasos imunorreativos para o FvW ( $p = 0,051$ ) em lesões com forte expressão de MMP-9. Os resultados do presente estudo sugerem que o VEGF pode atuar como importante estímulo à expressão de MMP-9 em células endoteliais de vasos sanguíneos, influenciando o processo de angiogênese em granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais. Adicionalmente, a intensidade do infiltrado inflamatório desempenha importante influência no número de vasos sanguíneos, identificados através da expressão do FvW, na expressão de MMP-9 em células endoteliais e na expressão de VEGF em células do tecido conjuntivo, nas lesões do presente estudo. Por fim, a forte expressão do VEGF no revestimento epitelial dos cistos periapicais residuais sugere a existência de um potencial de crescimento nestas lesões, provavelmente em virtude da manutenção de um status de permeabilidade vascular aumentada.

**Palavras-chave:** Granuloma periapical. Cisto periapical. Cisto periapical residual. MMP-9. VEGF. FvW. Angiogênese.

## ABSTRACT

Angiogenesis has been related to the pathogenesis of periapical lesions. So that it occurs is necessary the action of powerful angiogenic factors and the participation of MMPs in the degradation of the extracellular matrix. The purpose of this study was to investigate the immunoreexpression of MMP-9, VEGF and vWF in periapical granulomas (PG), periapical cysts (PC) and residual periapical cysts (RPC) to ensure the participation of angiogenesis in the development of these injuries. The quantitative analysis of VEGF in the connective tissue cells revealed similar average number of cells expressing this factor in PG and PC (564,9 e 565,0, respectively) and higher than in RPC (443,9), without statistically significant difference. There was a positive association between the intensity of the inflammatory infiltrate and the average number of cells expressing VEGF ( $p < 0.01$ ). In the epithelial lining, VEGF was strongly expressed by both PC (55%) as RPC (70%), pattern observed also in cases of atrophic (66,7%) and hyperplastic epithelium (55,6%), without difference statistically significant between the two types of cysts ( $p > 0.05$ ) and between atrophic and hyperplastic epithelial lining cysts ( $p > 0.05$ ). The average number of vessels expressing vWF was higher in PC (250,8) than in PG (210,4) and the RPC (217,0), without statistically significant difference between groups ( $p > 0.05$ ). Injuries showing intense inflammatory infiltrate exhibited greater number of vessels immunoreactive than those with mild or moderate inflammatory infiltrate ( $p < 0.05$ ). There was no correlation between the number of cells immunoreactive to VEGF and the number of vessels immunoreactive to the anti-vWF ( $r = 0.224$ ,  $p = 0.118$ ). The MMP-9 showed marked tendency to strong expression in most cases of GP (70%) and PCs (70%) and low expression in cases of CPR (60%). There was strong association between the expression of MMP-9 on endothelial cells and an intense inflammatory infiltrate ( $p = 0.0055$ ). Moreover, it was observed greater number of cells immunoreexpressing VEGF ( $p < 0.01$ ) and highest number of vessels immunoreactive to vWF ( $p = 0.0051$ ) in lesions with strong expression of MMP-9. The results of this study suggest that VEGF can act as an important stimulus for expression of MMP-9 in endothelial cells of blood vessels, influencing the angiogenic process in PG, PC and PRC. Additionally, the intensity of the inflammatory infiltrate plays important influence on the number of blood vessels, identified by the expressions of vWF, in the expression of MMP-9 in endothelial cells and the expression of VEGF in connective tissue cells in the lesions of this study. Finally, the strong expression of VEGF in the epithelial lining of the RPC suggests that there is a potential for growth in these injuries, probably because of the maintenance of a increased vascular permeability status.

**Keywords:** Periapical granuloma. Periapical cyst. Residual periapical cyst. MMP-9. VEGF. vWF. Angiogenesis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura das MMPs: S, sinal peptídeo - pré-prepítideo; Pro, pró-peptídeo; Cat, domínio catalítico; Zn, sítio ativo de zinco; Hpx, domínio hemopexina; Fn, domínio fibronectina; V, inserção vitronectina; I, domínio transmembrana tipo I; II, domínio transmembrana tipo II; G, domínio de ancoragem; Cp, domínio citoplasmático; Ca, região de cisteína; e Ig, domínio Ig-G. Um sítio de reconhecimento <i>furin-like</i> está marcado por um traço preto entre o domínio pró-peptídeo e catalítico. Fonte: Visse e Nagase (2003).....	57
Figura 2	Box-Plot da quantidade de células imunopositivas para o VEGF em granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais. Natal, RN – 2008.....	93
Figura 3	Box-Plot da quantidade de células imunopositivas para o VEGF de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório nas lesões. Natal, RN – 2008.....	94
Figura 4	Box-Plot da quantidade de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW em granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais. Natal, RN – 2008.....	97
Figura 5	Box-Plot da quantidade de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório nas lesões. Natal, RN – 2008.....	98
Figura 6	Box-Plot da quantidade de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório nas lesões. Natal, RN – 2008.....	99
Figura 7	Box-Plot da quantidade de células imunopositivas para o VEGF de acordo com a intensidade de expressão de MMP-9 em vasos sangüíneos. Natal, RN – 2008.....	102
Figura 8	Box-Plot da quantidade de vasos imunomarcados com anticorpo anti-FvW de acordo com a intensidade de expressão de MMP-9 em vasos sangüíneos. Natal, RN – 2008.....	103
Figura 9	Granuloma periapical constituído por tecido conjuntivo fibroso frouxamente organizado, entremeado por fibroblastos e vasos sangüíneos com células endoteliais volumosas. De peremeio, intenso infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos (Hematoxilina/ Eosina – 400x).....	104
Figura 10	Cisto periapical exibindo revestimento epitelial do tipo hiperplásico, com áreas de exocitose e espongiöse. Na cápsula fibrosa,	

	constatam-se feixes de fibras colágenas, numerosos vasos sangüíneos ingurgitados e, em posição justaepitelial, infiltrado inflamatório de predomínio mononuclear (Hematoxilina/ Eosina – 200x).....	104
Figura 11	Cisto periapical residual exibindo revestimento epitelial do tipo atrófico, com focos de degeneração hidrópica. Na cápsula fibrosa, constatam-se feixes de fibras colágenas, densamente organizados, vasos sangüíneos ingurgitados e, em posição justaepitelial, infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (Hematoxilina/ Eosina – 200x).....	105
Figura 12	Expressão imuno-histoquímica de VEGF em espécime de granuloma periapical com intenso infiltrado inflamatório, revelando numerosas células imunopositivas (Estreptoavidina-Biotina – 400x).....	105
Figura 13	Expressão imuno-histoquímica de VEGF nas células do revestimento epitelial, classificado como atrófico, em espécime de cisto periapical (Estreptoavidina-Biotina – 400x).....	106
Figura 14	Expressão imuno-histoquímica de VEGF nas células do revestimento epitelial, classificado como hiperplásico, em espécime de cisto periapical residual (Estreptoavidina-Biotina – 400x).....	106
Figura 15	Expressão imuno-histoquímica do FvW em espécime de cisto periapical, revelando numerosos vasos sangüíneos ao longo da cápsula fibrosa (Estreptoavidina-Biotina – 200x).....	107
Figura 16	Expressão imuno-histoquímica de MMP-9 nas células endoteliais dos vasos sangüíneos, em espécime de granuloma periapical (Estreptoavidina-Biotina – 400x).....	107

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos casos de granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais, segundo intensidade do infiltrado inflamatório. Natal, RN – 2008.....	90
Tabela 2	Parâmetros utilizados no cálculo do teste exato de Fisher para avaliação da espessura do revestimento epitelial de acordo com o tipo de cisto. Natal, RN – 2008.....	91
Tabela 3	Parâmetros utilizados no cálculo do teste exato de Fisher para análise da espessura do revestimento epitelial de cistos periapicais e cistos periapicais residuais, de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal, RN – 2008.....	92
Tabela 4	Parâmetros utilizados para o cálculo do teste de Kruskal-Wallis para avaliação do número de células imunopositivas para o VEGF em granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais. Natal, RN – 2008.....	93
Tabela 5	Parâmetros utilizados para o cálculo do teste de Kruskal-Wallis para avaliação do número de células imunopositivas para o VEGF de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal, RN – 2008.....	94
Tabela 6	Parâmetros utilizados no cálculo do teste exato de Fisher para análise da intensidade de expressão epitelial de VEGF de acordo com o tipo de cisto periapical. Natal, RN – 2008.....	95
Tabela 7	Parâmetros utilizados no cálculo do teste exato de Fisher para análise da intensidade de expressão epitelial de VEGF de acordo com a espessura do revestimento epitelial de cistos periapicais e cistos periapicais residuais. Natal, RN – 2008.....	96
Tabela 8	Parâmetros utilizados para o cálculo do teste de Kruskal-Wallis para avaliação do número de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW em granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais. Natal, RN –2008.....	97
Tabela 9	Parâmetros utilizados para o cálculo do teste de Kruskal-Wallis para avaliação do número de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW, de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal, RN – 2008.....	96
Tabela 10	Parâmetros utilizados para o cálculo do teste de Mann-Whitney para avaliação do número de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW, de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal, RN – 2008.....	99

Tabela 11	Parâmetros utilizados no cálculo do teste exato de Fisher para análise da intensidade de expressão da MMP-9 de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal, RN – 2008.....	101
Tabela 12	Parâmetros utilizados para o cálculo do teste de Mann-Whitney para avaliação do número de células imunopositivas para o VEGF, de acordo com a intensidade de expressão de MMP-9. Natal, RN – 2008.....	102
Tabela 13	Parâmetros utilizados para o cálculo do teste de Mann-Whitney para avaliação do número de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW, de acordo com a intensidade de expressão de MMP-9. Natal, RN – 2008.....	103

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Especificidade do anticorpo, clone, diluição, fabricante, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo imuno-histoquímico.....	85
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ang: angiopoetina.

AP: proteína ativadora.

CSF: fator estimulador de colônia.

Ig: imunoglobulina.

IL: interleucina.

EGF: fator de crescimento epidérmico.

ELAM: molécula de adesão endotelial.

FGF: fator de crescimento fibroblástico.

FGFb: fator de crescimento fibroblástico básico.

FvW: fator de Von Willebrand.

G-CSF: fator estimulador de granulócitos.

GM-CSF: fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos.

HGF: fator de crescimento dos hepatócitos.

HIF: fator induzido por hipóxia.

ICAM: molécula de adesão intercelular.

ISRE: elemento responsivo pelo estímulo de interferon.

IFN: interferon.

IRF: fator regulador do interferon.

KGF: fator de crescimento de ceratinócito.

KRE-M9: elemento responsivo do fator-1 de diferenciação de ceratinócitos.

LPS: lipopolissacarídeo bacteriano.

MAC: complexo de ataque à membrana.

M-CSF: fator estimulador de colônia de macrófagos.

MEC: matriz extracelular.

MHC: complexo principal de histocompatibilidade.

MMP: metaloproteinase.

MT-MMP: metaloproteinase tipo membrana.

MVC: contagem microvascular.

MVD: densidade microvascular.

MVV: volume microvascular.

NGF: fator de crescimento neural.

NF- $\kappa$ B: fator nuclear  $\kappa$ B.

NIP: proteína de importação nuclear.

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas.

PIGF: fator de crescimento placentário.

PG: prostaglandina.

SP: proteína estimuladora.

TGF: fator de crescimento transformador.

TIE: fator inibitório do fator de crescimento transformante.

TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinase.

TNF: fator de necrose tumoral.

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular.

VEGFR: receptor do fator de crescimento do endotélio vascular.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
2.1 GRANULOMA PERIAPICAL .....	23
2.2 CISTO PERIAPICAL .....	27
2.3 CISTO PERIAPICAL RESIDUAL .....	36
2.4 ANGIOGÊNESE .....	39
2.4.1 Considerações gerais .....	39
2.4.2 VEGF .....	41
2.4.3 Biodinâmica da angiogênese .....	43
2.4.4 Mensuração da angiogênese .....	47
2.4.5 Angiogênese e lesões periapicais .....	51
2.5 MMPs .....	54
2.5.1 Considerações gerais .....	54
2.5.2 MMPs e angiogênese .....	62
2.5.3 MMP-9 .....	67
2.5.3. MMP-9 e angiogênese .....	71
2.5.4 MMPs e lesões periapicais .....	74
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	80
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	81
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO .....	81
4.2 POPULAÇÃO .....	81
4.3 AMOSTRA .....	81
4.4 ESTUDO MORFOLÓGICO .....	82
4.5 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO .....	83

4.5.1 Análise da imunexpressão do VEGF .....	86
4.5.2 Análise da imunexpressão do FvW .....	87
4.5.3 Análise da imunexpressão da MMP-9 .....	87
4.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....	88
4.7 IMPLICAÇÕES ÉTICAS .....	88
<b>5 RESULTADOS</b> .....	90
5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA .....	90
5.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DO VEGF .....	92
5.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DO FvW .....	96
5.4 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA MMP-9 .....	100
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	108
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	125
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	126
<b>APÊNDICES</b> .....	145
<b>ANEXO</b> .....	151

## 1 INTRODUÇÃO

As lesões periapicais são as lesões osteolíticas mais comuns na maxila e na mandíbula e representam, essencialmente, uma reação defensiva secundária no intuito de conter o avanço da infecção microbiana do sistema de canais radiculares em direção à região periapical. Para isso, são mobilizados mecanismos de defesa incluindo reações inflamatórias e imunológicas que culminam em destruição tecidual e indução de reabsorção óssea, com conseqüente formação de um granuloma periapical. Uma seqüela da formação do granuloma é a proliferação epitelial dos restos de Malassez associada à inflamação, o que pode conduzir ao desenvolvimento do cisto periapical. O tratamento indicado para ambos é o endodôntico convencional, se o dente puder ser mantido. Os elementos dentais sem possibilidades reabilitadoras devem ser extraídos e todo tecido mole periapical deve ser curetado. Caso contrário pode originar-se um cisto periapical residual (NAIR, 2007; NEVILLE et al., 2004).

Dessa maneira, pode-se inferir que os granulomas e os cistos periapicais representam diferentes estágios de desenvolvimento do mesmo processo inflamatório. São lesões assintomáticas que se caracterizam radiograficamente por uma área radiolúcida geralmente circular ou ovóide, de tamanho variável, bem circunscrita, associada ao ápice radicular ou lateralmente à raiz com perda da integridade da lâmina dura nos granulomas e cistos periapicais ou no sítio de uma extração prévia nos cistos periapicais residuais. São constituídos, basicamente, por um infiltrado inflamatório do tipo crônico, associado a elementos de reparação, como fibroblastos, fibras nervosas e vasos sangüíneos neoformados, e uma cápsula fibrosa bem desenvolvida, composta de fibras colágenas densas, que delimita a lesão. Nos cistos, esta cápsula encontra-se circundando um tecido epitelial de variável espessura que reveste total ou parcialmente uma cavidade patológica (NEVILLE et al., 2004; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

Os estudos realizados sobre estas lesões nas últimas décadas têm enfatizado o papel das reações imunológicas na indução à proliferação dos restos epiteliais de Malassez, à formação da cavidade cística e à destruição óssea (PIRES et al., 2007; TAKAHASHI, 1998). A angiogênese tem sido apontada como fator essencial na patogênese das lesões periapicais crônicas, estando relacionada ao

estabelecimento e manutenção da lesão, uma vez que os vasos sanguíneos neoformados suprem a contínua demanda de nutrientes e oxigênio pelas células em proliferação e contribuem para a inflamação por serem uma fonte constante de citocinas, quimiocinas e proteases, estando também relacionada ao reparo tecidual que segue a sua resolução (GRIFFOEN; MOLENA, 2000; MAJNO, 1998).

As células endoteliais pré-existentes nestas lesões são induzidas à proliferação, migração e formação de novos vasos sanguíneos pelos fatores angiogênicos, principalmente o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), secretados em resposta às citocinas geradas pelo processo inflamatório (DVORAK et al., 1995). Para que as células endoteliais formem novos vasos a proteólise extracelular realizada pelas metaloproteinases de matriz (MMPs) é de fundamental importância (BELLON; MARTINY; ROBINET, 2004).

As MMPs são um grupo de enzimas capazes de degradar a maior parte, se não todos, os componentes da matriz extracelular (MEC). Na patogênese das lesões periapicais estas enzimas participam ativamente da regulação da proliferação, maturação e migração do tecido epitelial, destruição tecidual, remodelação da cápsula fibrosa e parede cística, e reabsorção óssea, solubilizando a matriz óssea e regulando o início da reabsorção (LEONARDI; CALTABIANO; LORETO, 2005; LIN et al., 2002; SOARES et al., 2007; WAHLGREN et al., 2002).

Na angiogênese, as MMPs facilitam a migração das células endoteliais pelos tecidos adjacentes através da interrupção das barreiras físicas da MEC e permitem que os brotamentos vasculares se formem devido à degradação da membrana basal de vasos sanguíneos, realizada especialmente pela MMP-9, uma vez que entre os substratos desta enzima estão o colágeno tipo IV e a laminina (HAAS et al., 2000; KENAGY et al., 1997; PEPPER, 2001; RUNDHAUG, 2003).

A despeito da importância da angiogênese e da grande quantidade de estudos sobre o papel das MMPs na patogênese das lesões periapicais, pouco se sabe sobre a estrutura vascular e a angiogênese nestas lesões e não são encontrados estudos na literatura relacionando o papel das MMPs com a angiogênese nas lesões periapicais, principalmente no que diz respeito à remodelação de membrana basal de vasos sanguíneos. Neste contexto, constituiu objetivo deste estudo analisar a relação entre a vascularização, as MMPs e os fatores angiogênicos em granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A periodontite apical é uma desordem inflamatória dos tecidos periapicais causada por infecção microbiana persistente do sistema de canais radiculares do dente afetado. Essencialmente, é a resposta de defesa orgânica à destruição do tecido pulpar e à infecção microbiana do sistema de canais radiculares (NAIR, 2007).

Por qualquer uma das muitas rotas de entrada (cárie, procedimentos clínicos, fratura, fenda ou restauração com infiltração), a polpa dental se torna infectada e depois sofre necrose por uma coleção autógena da microbiota oral. O ambiente endodôntico provê um habitat seletivo para o estabelecimento de uma microbiota mista, predominantemente anaeróbica. Coletivamente, esta comunidade polimicrobiana residente no sistema de canais radiculares possui várias propriedades biológicas e patogênicas, como antigenicidade, atividade mitogênica, quimiotaxia, histólise enzimática e ativação de células do hospedeiro. Os invasores microbianos do canal radicular podem avançar, ou seus produtos podem se infiltrar no periápice. Em resposta, o hospedeiro monta um sistema defensivo dinâmico, consistindo em várias classes de células, mensageiros intercelulares, anticorpos e moléculas efetoras. O confronto entre as forças microbianas e de defesa do hospedeiro destrói grande parte do tecido periapical, resultando na formação de vários tipos de lesões periodontais apicais, de acordo com seus componentes estruturais (NAIR, 1997).

Os componentes estruturais das lesões dependem do equilíbrio dinâmico entre os fatores microbianos (intensidade da agressão) e as defesas do hospedeiro (resistência), independente do momento da lesão. À medida que o equilíbrio dinâmico no periápice pende a favor ou contra as defesas do hospedeiro (como resultado dos fatores locais e/ou fatores sistêmicos), o quadro histopatológico varia consideravelmente (NAIR, 1997). Desta maneira, pode-se estabelecer uma resposta inflamatória aguda ou crônica, com a ocorrência de uma periodontite apical ou de um abscesso, com conseqüente destruição óssea no caso dos processos crônicos (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004).

Numerosos termos já foram empregados para descrever a periodontite apical. Lesões periapicais, granulomas/cistos periapicais, osteíte periapical e lesões perirradiculares são sinônimos freqüentemente usados. Apesar do termo

perirradicular incluir a inflamação da furca e sítios laterais, não distingue, por si só, a periodontite derivada da polpa daquelas lesões que se disseminam marginalmente (NAIR, 1997; NAIR, 2007).

Por ser a periodontite apical uma doença inflamatória, ela pode ser classificada baseando-se nos sintomas, etiologia, histopatologia e assim por diante (NAIR, 2007). A Organização Mundial de Saúde (1995) classificou a periodontite apical como “doença do tecido periapical” e subdividiu em cinco categorias, de acordo com os sinais clínicos: periodontites apicais agudas de origem pulpar, periodontites apicais crônicas, abscessos periapicais com fístula, abscessos periapicais sem fístula e cistos radiculares. Contudo, esse sistema de classificação não leva em consideração os aspectos estruturais dos tecidos atingidos (NAIR, 1997).

Uma vez que a composição estrutural forma a base para o entendimento do processo patológico, Nair (2007) sugeriu uma classificação histopatológica baseada em quatro fatores: a distribuição das células inflamatórias na lesão; se há presença de células epiteliais ou se estas estão ausentes; se a lesão se transformou em um cisto; e na relação da cavidade cística com o canal radicular do dente afetado. Assim, histopatologicamente, as lesões da periodontite apical podem ser classificadas em agudas, crônicas ou císticas.

A periodontite apical aguda é uma inflamação aguda do periodonto de origem endodôntica caracterizada pela presença de um foco evidente de neutrófilos na lesão. É considerada primária ou inicial quando a inflamação possui curta duração e começa em um periodonto saudável, em resposta a irritantes. É denominada secundária ou exacerbada quando a resposta aguda ocorre em uma lesão periodontal apical crônica previamente existente, sendo, neste caso, também referida como *flare-up* periapical (NAIR, 2007).

A periodontite apical crônica é uma inflamação do periodonto de origem endodôntica de longa duração, sendo caracterizada pela presença de tecido granulomatoso predominantemente infiltrado por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. As lesões podem ser epitelizadas ou não (NAIR, 2007). A denominação de granuloma periapical também é utilizada (NEVILLE et al., 2004).

O cisto periapical é uma lesão inflamatória crônica originada de um granuloma periapical. Pode ser classificado em verdadeiro ou em bolsa. O cisto periapical verdadeiro é um cisto inflamatório apical com uma cavidade patológica bem distinta

completamente cercada por um revestimento epitelial de maneira que não haja comunicação com o canal radicular. Já o cisto periapical em bolsa é um cisto apical inflamatório contendo uma cavidade semelhante a um saco, cercada por epitélio que se abre para o canal radicular e se continua com ele (NAIR, 2007). A não curetagem do tecido inflamatório periapical quando da extração dos dentes envolvidos com a lesão pode originar um cisto periapical residual (NEVILLE et al., 2004; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

Como qualquer lesão inflamatória crônica, os granulomas periapicais, os cistos periapicais e os cistos periapicais residuais requerem aumento da vascularização e a neoformação vascular. A angiogênese é de suma importância para o estabelecimento e manutenção destas lesões, pois, além de nutrir os tecidos, também desempenha um ativo papel na inflamação por serem uma fonte de citocinas, quimiocinas e proteases (GRIFFOEN; MOLENA, 2000; MAJNO, 1998).

## 2.1 GRANULOMA PERIAPICAL

Os granulomas são as condições patológicas dos tecidos periapicais mais comumente encontradas (NEVILLE et al., 2004; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004). Nair, Pajarola e Schroeder (1996), avaliando 256 lesões periapicais, relataram que 50% destas eram granulomas, 35% abscessos e 15% cistos. De acordo com Neville et al. (2004), os granulomas representam aproximadamente 75% das lesões inflamatórias apicais.

O granuloma periapical pode originar-se após a estabilização de um abscesso periapical ou da cronificação da periodontite apical aguda. Não é uma lesão estática, podendo se transformar em cisto periapical ou desenvolver exacerbações agudas com a formação de abscesso (NEVILLE et al., 2004).

Os granulomas periapicais são uma reação defensiva secundária à presença de bactérias no canal radicular, com expansão dos produtos tóxicos em direção à região periapical, os quais são imediatamente combatidos pelos mecanismos de defesa inata do hospedeiro, como a fagocitose por macrófagos residentes ou pela ativação do sistema complemento pela via alternativa. Dessa forma, apesar da fonte de infecção não ser eliminada, inicialmente o hospedeiro consegue manter um

equilíbrio (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004).

No entanto, com o tempo, a reação do hospedeiro torna-se menos eficiente em relação à invasão microbiana ou às extensões de toxinas para a região periapical e, neste momento, uma ampla variedade de reações imunopatológicas é induzida. Inicialmente, estas reações exibem um caráter protetor, mas à medida que o estímulo antigênico persiste culminam em processos destrutivos responsáveis pela lise dos tecidos. A liberação de enzimas histolíticas, toxinas e outros produtos do metabolismo bacteriano constituem a primeira agressão direta ao periodonto e à medida que se difundem através do forame apical produzem uma reação inflamatória (PIRES et al., 2007).

A ativação do sistema complemento e dos macrófagos resulta em liberação de vários mediadores químicos relacionados com a inflamação. Dessa forma, se instala na região periapical uma resposta inflamatória aguda, caracterizada por aumento da permeabilidade vascular, saída de células dos vasos para os tecidos e migração de células de defesa, principalmente neutrófilos, para o espaço extravascular onde ocorre a agressão, local no qual realizam a fagocitose dos antígenos no intuito de combater a infecção. Nesta etapa, o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*) desempenha importante papel ao induzir o aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, o que facilita a leucodiapedese (BANDO, 1993; TORABINEJAD, 1994).

Com a persistência da agressão bacteriana, os neutrófilos são substituídos por outras células de defesa, pois possuem curto tempo de vida, aproximadamente 48 horas. Instala-se um processo crônico, caracterizado pela resposta imunológica adaptativa, antígeno específica, cujas principais células são os linfócitos T, linfócitos B e macrófagos que interagem através de citocinas (PIRES et al., 2007; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004).

As células inflamatórias e as células presentes no ligamento periodontal e no osso produzem uma gama variada de mediadores químicos envolvidos na indução da reabsorção óssea, como a interleucina-1 (IL-1), interleucina-3 (IL-3), interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF, do inglês *macrophage colony-stimulating factor*), o factor estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) e prostaglandinas (PGs). Como resultado, o osso é reabsorvido e substituído por tecido granulomatoso e

componentes do processo de reparo tecidual. Assim, o processo reabsortivo cria um espaço capaz de comportar um maior número de células imunocompetentes na região adjacente ao forame apical, visando impedir a disseminação da infecção para o tecido ósseo e restante do organismo. Isto permite o estabelecimento de um equilíbrio entre a agressão e a defesa (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004; ZECCHI-ORLANDINI et al., 1996).

Os granulomas periapicais são constituídos, basicamente, por um infiltrado inflamatório do tipo crônico, associado a elementos de reparação, como fibroblastos, fibras nervosas e vasos sangüíneos neoformados, e uma cápsula fibrosa bem desenvolvida, composta de fibras colágenas densas que estão firmemente aderidas à superfície radicular e encapsula a lesão (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004). O tecido de granulação apresenta um infiltrado linfocítico denso variável, freqüentemente associado a macrófagos, neutrófilos e plasmócitos e, menos freqüentemente, mastócitos e eosinófilos. Pode ser observado um número acentuado de glóbulos eosinófilos de gamaglobulina dispersos (corpúsculos de Russell). Além disso, grupos de partículas levemente basofílicas (corpúsculos de pironina) também podem estar presentes em associação com o infiltrado plasmocítico. Coleções de cristais de colesterol com células gigantes multinucleadas associadas e áreas de extravasamento de hemácias com pigmentação por hemossiderina podem estar presentes (NEVILLE et al., 2004).

Os restos epiteliais de Malassez em proliferação podem ser identificados no tecido de granulação. Cortes seriados mostram que aproximadamente 52% das lesões periapicais crônicas possuem epitélio, contudo somente 15% são cistos periapicais. Assim, o granuloma periapical pode apresentar-se epitelizado. A proliferação epitelial se dá de forma aleatória, em todas as direções, podendo formar uma massa epitelial irregular invaginada por tecido conjuntivo vascularizado (NAIR; SCHMID-MEIER, 1986; NAIR, PAJAROLA; SCHOROEDER, 1996).

Os linfócitos T e os plasmócitos são as células inflamatórias mais encontradas nos granulomas periapicais (KOPP; SCHWARTING, 1989; PULHEZ, 2004; TORABINEJAD; KETTERING, 1985). Comparativamente aos cistos periapicais, os granulomas periapicais apresentam maior número de linfócitos B e plasmócitos (PULHEZ, 2004).

Dentre os linfócitos T, os linfócitos T auxiliares podem superar em número os linfócitos T supressores (BARKHORDAR; DESOUZA, 1988; KOPP; SCHWARTING,

1989; PIATTELLI et al., 1991; SOL et al., 1998). Contrariamente, alguns estudos detectaram predominância de linfócitos T supressores sobre os T auxiliares (KONTIAINEN; RANTA; LAUTENSCHLAGER, 1986; LUKIC et al., 1990; MÁRTON et al., 1998), enquanto que em outros não foi evidenciada diferença estatística entre a proporção das duas subpopulações de células T nestas lesões (GAO et al., 1988; SUZUKI et al., 2001).

A predominância de uma subpopulação linfocitária sobre a outra pode variar de acordo com a fase de desenvolvimento da lesão. Na fase ativa inicial da formação das lesões, os linfócitos T auxiliares apareceram em maior número que os T supressores, diminuindo em número conforme a progressão das mesmas para um estágio mais crônico, no qual os linfócitos T supressores estão presentes em número mais abundante. Esses dados indicam que as células T auxiliares podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento e expansão das lesões periapicais, enquanto que as T supressoras regulam a resposta imune relacionando-se com o cessar do crescimento dessas lesões (GAO et al., 1988; LUKIC et al., 1990; STASHENKO; YU; WANG, 1992; STASHENKO et al., 1994).

Para que isto ocorra, em determinado momento os linfócitos T supressores ativados pelos mediadores químicos liberados pelos macrófagos (IL-1, IL-6 e o TNF) produzem uma variedade de citocinas que regulam negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, levando à supressão da atividade osteoclástica e reabsorção óssea reduzida. Estas citocinas podem concomitantemente regular positivamente a produção de fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ , do inglês *tissue growth factor*), com efeitos estimuladores e proliferativos nos fibroblastos e na microcirculação (NAIR, 2007).

A opção de regular negativamente o processo destrutivo explica a ausência de reabsorção óssea tardia e a reconstrução do tecido conjuntivo colagenoso durante a fase crônica da periodontite apical. Conseqüentemente, as lesões crônicas, como o granuloma periapical, podem permanecer “inativas” e assintomáticas por longos períodos sem maiores alterações na aparência radiográfica (NAIR, 2007).

Desta forma, a maioria dos granulomas periapicais é assintomática, mas pode desenvolver dor ou sensibilidade se ocorrer uma exacerbação aguda. Caracteristicamente, o dente envolvido pode apresentar coroa escurecida, não apresenta mobilidade ou sensibilidade significativa à percussão. O tecido mole que

recobre a região periapical pode ou não estar sensível. O dente não responde aos testes pulpares térmicos ou elétricos, a menos que a necrose pulpar esteja relacionada a um único canal em um dente multirradicular (NEVILLE et al., 2004; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004).

Grande parte das lesões é descoberta durante exames radiográficos de rotina, no qual se observa uma radiotransparência bem delimitada de tamanho variável ocorrendo desde lesões pequenas, pouco perceptíveis, até radiotransparências excedendo dois centímetros de diâmetro. O dente afetado mostra perda da lâmina dura apical. A reabsorção radicular não é incomum (NEVILLE et al., 2004; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004).

O tratamento indicado é o endodôntico convencional, se o dente puder ser mantido, pois o sucesso do tratamento centraliza-se na redução e eliminação dos microrganismos agressores. Os elementos dentais sem possibilidades restauradoras devem ser extraídos e todo tecido mole apical curetado (NEVILLE et al., 2004).

Os dentes tratados endodonticamente devem ser avaliados com intervalos de 1 a 2 anos para excluir um possível crescimento da lesão e assegurar uma cicatrização adequada. Aproximadamente 50% dos granulomas não respondem aos tratamentos endodônticos convencionais. Se o tratamento convencional inicial não for bem sucedido, o retratamento endodôntico representa a melhor abordagem para potencializar a redução das bactérias e deve ser considerado antes da cirurgia pararendodôntica e biópsia, a qual, em geral, é reservada para lesões maiores que dois centímetros ou para aquelas associadas a dentes nos quais o tratamento endodôntico convencional não é possível ou indicado (NEVILLE et al., 2004).

## 2.2 CISTO PERIAPICAL

Os cistos periapicais, também denominados de cistos radiculares, perirradiculares ou periodontais apicais, são cistos inflamatórios dos ossos maxilares formados nos ápices de dentes com polpas necróticas e infectadas, sendo considerados seqüelas diretas dos granulomas apicais, embora nem todo granuloma torne-se um cisto durante o seu desenvolvimento (NAIR, 1998; NEVILLE et al., 2004; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

As lesões císticas periapicais são, de longe, as mais comuns da região maxilofacial representando cerca de 55% dos cistos odontogênicos e constituindo, aproximadamente, metade a três quartos de todos os cistos na maioria da literatura pertinente (JONES; CRAIG; FRANKLIN, 2006; MENINGAUD et al., 2006; NEVILLE et al., 2004; OCHSENIUS et al., 2007; REGEZI; SCIUBBA, 2000; TAYLOR et al., 2002). Sua incidência entre as lesões periapicais varia de 6% a 55% (NAIR; PAJAROLA; SCHROEDER, 1996).

A distribuição dos cistos periapicais por idade varia da terceira à sexta década de vida, sendo relativamente rara a ocorrência na primeira década, ainda que lesões de cárie e dentes sem vitalidade sejam bastante freqüentes neste grupo etário. A maioria dos casos tem sido relatada em indivíduos do sexo masculino e, no tocante à localização, os cistos periapicais ocorrem com maior freqüência na maxila (60%), especialmente na região anterior, seguida pela região maxilar posterior, região posterior da mandíbula e, finalmente, região mandibular anterior (JONES; CRAIG; FRANKLIN, 2006; NEVILLE et al., 2004; OCHSENIUS et al., 2007; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

Segundo informam vários autores, os cistos periapicais originam-se de um granuloma que se tornou epitelizado. Formam-se a partir dos restos epiteliais de Malassez presentes no ligamento periodontal, que passam a proliferar em decorrência de estímulos inflamatórios nessa região, a partir do momento em que as bactérias e seus produtos, anteriormente presentes na polpa dental, avançam para fora do sistema de canais radiculares e atingem os tecidos periapicais (CURY et al., 1998; FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007; MEGHJI et al., 1996; NEVILLE et al., 2004; REGEZI; SCIUBBA, 2000; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004).

Os mecanismos responsáveis pela indução à proliferação epitelial, que levam à formação da lesão, bem como a biologia do processo de crescimento e expansão cística, são temas bastante estudados e mais recentemente tem sido sugerido que esses mecanismos biológicos estão associados a eventos imunopatológicos (BANDO et al., 1993; CURY et al., 1998; FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; MEGHJI et al., 1996; MOREIRA et al., 2000; TAKAHASHI, 1998).

Diversas publicações têm reportado que as endotoxinas bacterianas apresentam um papel iniciador crucial na patogênese dos cistos periapicais. As bactérias e seus produtos estimulam a proliferação epitelial diretamente exercendo

potente ação mitogênica para as células epiteliais ou indiretamente pela estimulação da síntese de citocinas e fatores de crescimento pelos linfócitos, monócitos e fibroblastos, que atuam sobre os restos epiteliais de Malassez ocasionando proliferação e diferenciação alterada dos mesmos. Os fatores de crescimento envolvidos nesse mecanismo são o TGF- $\beta$ , fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *epidermal growth factor*) e fator de crescimento de ceratinócito (KGF, do inglês *keratinocyte growth factor*). As principais citocinas envolvidas são a IL-1, IL-6 e TNF. Estas citocinas induzem ao aumento da expressão de receptores do fator EGF e do KGF pelas células epiteliais durante a inflamação periapical (BANDO et al., 1993; CURY et al., 1998; GAO; FLAITS; MACKENZIE, 1996; LIN et al., 1996; LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007; MEGHJI et al., 1996; PIRES et al., 2007).

Recentemente, a óxido nítrico sintase, enzima que secreta óxido nítrico, um regulador dos processos inflamatórios, assim como as proteínas de choque térmico, que desempenham papel de proteção celular em episódios de estresse, também foram relacionadas com a ativação e proliferação do revestimento epitelial das lesões periapicais císticas. Esta afirmação baseia-se no fato de que ambas encontram-se significativamente menos expressas nos restos epiteliais de Malassez que no revestimento epitelial destas lesões. A óxido nítrico sintase atua na proliferação das células epiteliais, enquanto as proteínas de choque térmico as protege da inflamação (SUZUKI et al., 2002).

Apesar dos mecanismos supracitados explicarem a proliferação dos restos epiteliais de Malassez no granuloma periapical, esse processo, por si só, não induz à formação da cavidade cística e várias teorias têm sido propostas buscando elucidar tal aspecto (FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007; NEVILLE et al., 2004; TORABINEJAD, 1983; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

A teoria da deficiência nutricional postula que ilhas de epitélio em proliferação tornam-se progressivamente grandes, de maneira que as células mais internas perdem sua fonte de nutrição, sofrem degeneração e liquefação, ocasionando a formação de uma cavidade central. A decomposição de restos celulares no interior da luz dos cistos aumenta a concentração protéica, ocasionando uma maior pressão osmótica, fato esse que resulta em transporte de fluido através do revestimento epitelial para o lúmen do tecido conjuntivo, auxiliando no crescimento do cisto externamente (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007; NEVILLE et al., 2004; REGEZI;

SCIUBBA, 2000). Esse mecanismo tem sido bastante questionado na atualidade devido ao fato do epitélio em proliferação dos cistos periapicais encontrarem-se, normalmente, invaginado por tecido conjuntivo, o qual fornece o suprimento sangüíneo necessário (FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; RUIZ et al., 2004; PIRES et al., 2007).

Outra teoria mencionada é a teoria do abscesso, segundo a qual quando um abscesso é formado no tecido conjuntivo, as células epiteliais proliferam e revestem a cavidade pré-existente devido à sua tendência inerente de cobrir superfícies de tecido conjuntivo expostas. Entretanto, observa-se que a proliferação epitelial é mais proeminente na periodontite apical crônica que em abscessos periapicais (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007).

Atualmente as teorias supracitadas não são bem aceitas e os estudos comprovam que o desenvolvimento da cavitação cística é mediado por reações imunopatológicas (FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; TAKAHASHI, 1998; TORABINEJAD; 1983; TORABINEJAD, 1994; RUIZ et al., 2004; PIRES et al., 2007).

As substâncias biologicamente ativas geradas pela inflamação periapical recrutam neutrófilos, ocorrendo liberação local de enzimas hidrolíticas que exercem ação de lise tecidual. A ativação do sistema complemento pelas bactérias, tanto pela via clássica quanto pela via alternativa através do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), exerce papel de destaque nas reações imunopatológicas envolvidas no desenvolvimento da cavitação cística. O produto final da ativação desse sistema, designado complexo de ataque à membrana (MAC, do inglês *membrane attack complex*), culmina no processo de morte celular, devido à sua função citotóxica, contribuindo para o processo de formação da cavidade cística (FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; RUIZ et al., 2004).

Também é importante para esse processo a síntese de moléculas de adesão na superfície endotelial, principalmente ICAMs (do inglês *intercellular adhesion molecules*) e ELAMs (do inglês *endothelial adhesion molecules*), estimulada pela IL-1, TNF e LPS. Essas moléculas favorecem a marginação de células de defesa pelo endotélio, favorecendo a criação de um gradiente leucocitário contínuo, o qual responde, em parte, pela manutenção do estado pró-inflamatório de fundamental importância na patogenia da formação cística (BANDO et al., 1993; FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; RUIZ et al., 2004).

Deve-se ressaltar que o mecanismo de expansão do cisto periapical é dependente do crescimento da lesão, sendo acompanhado e governado pela perda óssea local, estando o processo reabsortivo, em parte, na dependência do infiltrado inflamatório que, usualmente, encontra-se associado a essa lesão. Além do processo reabsortivo, o crescimento dos cistos envolve a interação entre o epitélio e a cápsula fibrosa (BANDO et al., 1993; FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; MEGHJI et al., 1996; RUIZ et al., 2004).

Componentes bacterianos como o LPS, PGs, bradiginina, imunocomplexos e citocinas estão envolvidas no processo de reabsorção óssea nos cistos periapicais. As principais citocinas envolvidas nesse processo, descritas como fatores estimuladores de osteoclastos, são a IL-1, IL-3, IL-6, TNF e fator estimulador de colônia (CSF, do inglês *colony-stimulating factor*), sendo a fonte celular dessas substâncias os macrófagos, as células T, os fibroblastos, as células endoteliais e os ceratinócitos (CURY et al., 1998; STASHENKO et al., 1994; STASHENKO; YU; WANG, 1992; TAKAHASHI, 1998; TORABINEJAD, 1994; WANG; TANI-ISHII; STASHENKO, 1997).

As substâncias supracitadas podem induzir a osteólise pela estimulação da reabsorção óssea pelos osteoclastos presentes em torno do osso perialveolar e inibição da síntese de matriz óssea pelos osteoblastos, impedindo a formação de osso reparativo (STASHENKO; YU; WANG, 1992; ZECHI-ORLANDINI et al., 1996).

Adicionalmente, a proteólise tecidual possui um papel importante na patogênese dos cistos periapicais no que diz respeito ao mecanismo de expansão e reabsorção óssea. O sistema plasmina/plasminogênio possui papel central neste processo. Pode ser ativado diretamente por bactérias de polpas necróticas ou indiretamente por citocinas inflamatórias geradas por células residentes, conforme supracitado. Sua ativação pelos fatores ativadores de plasminogênio determina colapso do tecido conjuntivo, agindo de forma direta sobre componentes deste tecido e/ou indireta pela ativação de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases que degradam a matriz extracelular óssea não-mineralizada, necessitando, para tanto, que o osso sofra desmineralização prévia. Além disso, os fragmentos colágenos gerados ativam os osteoclastos. A expressão de fatores ativadores de plasminogênio, presentes no revestimento epitelial, no tecido conjuntivo, no infiltrado inflamatório e endotélio dos cistos periapicais possui relação direta com a intensidade do infiltrado inflamatório (DELAISSÉ et al., 2000;

TERONEN et al., 1995a; TSAI et al., 2004).

Ressalta-se, ainda, que os cistos periapicais podem contribuir para a destruição óssea não apenas pela liberação de citocinas envolvidas com a atividade e desenvolvimento dos osteoclastos e osteoblastos nas superfícies perialveolares, mas também por produzirem sinais apropriados para o recrutamento de precursores de osteoclastos circulantes para os espaços extravasculares do tecido conjuntivo fibroso da cápsula cística. Uma vez na cápsula fibrosa, essas células podem alcançar o osso adjacente e se diferenciarem em células reabsortivas ativas, contribuindo para o processo de destruição óssea perialveolar juntamente com os osteoclastos recrutados das superfícies ósseas (ZECCHI-ORLANDINI et al., 1996).

A maioria dos estudos analisou cistos periapicais biologicamente ativos e inativos como um único grupo. Contudo, Cury et al. (1998) propuseram a divisão dos cistos periapicais, de acordo com a espessura do epitélio de revestimento, em atrófico (2 a 10 camadas de células epiteliais) ou hiperplásico (mais de 10 camadas de células) para o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos no crescimento destas lesões, por acreditarem que lesões císticas revestidas por epitélio hiperplásico podem ser mais ativas que lesões revestidas por epitélio atrófico.

Apesar dos cistos periapicais apresentarem-se clinicamente como grandes lesões expansivas, eles mostram períodos de não-proliferação e crescimento, os quais não são previsíveis. Contudo, estes períodos podem ser avaliados pela situação do epitélio cístico que representa um parâmetro histológico confiável para a atividade metabólica e/ou a inatividade de crescimento destas lesões (MOREIRA et al., 2000).

O cisto periapical é caracteristicamente assintomático, sendo descoberto acidentalmente durante exame radiográfico de rotina, a menos que ocorra uma exacerbação inflamatória aguda. O dente envolvido apresenta resposta negativa aos testes de sensibilidade pulpar, percussão e palpação. Entretanto, se o cisto atingir um tamanho considerável, pode ser observada tumefação e sensibilidade leve, sendo possível, também, ocorrer mobilidade e deslocamento dos dentes adjacentes. À inspeção, normalmente, detecta-se a presença de cárie e/ou restaurações extensas e a coroa do dente envolvido pode apresentar-se escurecida como resultado da necrose pulpar (NEVILLE et al., 2004; REGEZI; SCIUBBA, 2000; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004).

Radiograficamente, o cisto periapical não pode ser diferenciado de um

granuloma periapical. O padrão radiográfico é o de uma área radiolúcida geralmente circular ou ovóide associada ao ápice radicular ou lateralmente à raiz, bem circunscrita, com perda da integridade da lâmina dura. Se o cisto expande-se lentamente, pode-se observar um halo radiopaco estreito contíguo com a lâmina dura do dente acometido pela lesão. Nos cistos de longa duração, pode ser notada reabsorção radicular do dente envolvido e, ocasionalmente, dos dentes vizinhos (NEVILLE et al., 2004; REGEZI; SCIUBBA, 2000; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004).

Os cistos periapicais variam de diâmetro, desde 5 milímetros ou menos até vários centímetros ocupando todo um quadrante, embora a maioria mostre tendência a ter menos de 1,5 centímetro. Tais cistos causam reabsorção óssea, mas, geralmente, não produzem expansão óssea (NEVILLE et al., 2004; REGEZI; SCIUBBA, 2000; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004).

Histologicamente, os cistos periapicais são caracterizados por uma cavidade patológica revestida total ou parcialmente por epitélio pavimentoso estratificado, normalmente não-ceratinizado, de variável espessura, podendo apresentar graus variáveis de espongiose, exocitose, hiperplasia, ou, ainda, corpúsculos de Rushton. Circundando o revestimento epitelial, encontra-se presente uma cápsula fibrosa constituída principalmente por colágeno condensado perifericamente e por um tecido conjuntivo fibroso denso, a qual, usualmente, apresenta um pronunciado infiltrado inflamatório focal ou difuso, predominantemente mononuclear. O lúmen pode estar preenchido por líquido e células descamadas. Por vezes estão presentes no lúmen, na cápsula ou em ambos, focos de calcificação distrófica, imagens negativas de cristais de colesterol, células gigantes multinucleadas, hemácias, áreas de pigmentação por hemossiderina e corpúsculos hialinos de Russel (NEVILLE et al., 2004; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

Dois tipos de cistos periapicais têm sido descritos histologicamente. O cisto em bolsa possui comunicação de sua cavidade com o canal radicular. Já o cisto verdadeiro tem sua cavidade completamente revestida por epitélio, estando ligado ao ápice radicular por um cordão de epitélio (NAIR; PAJAROLA; SCHROEDER, 1996).

As células inflamatórias presentes em maior número nos cistos periapicais são os linfócitos T e plasmócitos, sendo observados também linfócitos B, macrófagos, mastócitos, células *natural killer* e granulócitos em um número variado

(GAO et al., 1988; MÁRTON et al., 1998; PULHEZ, 2004; STASHENKO et al., 1994; SUZUKI et al., 2001; TAKAHASHI, 1998; YU; STASHENKO, 1987).

Estudos demonstraram que em números absolutos, os cistos periapicais com revestimento epitelial atrófico apresentam menor quantidade de infiltrado inflamatório que os cistos periapicais que possuem revestimento epitelial hiperplásico, apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa (MOREIRA et al., 2000). Tem sido relatado aumento na porcentagem de linfócitos T nos cistos periapicais de revestimento epitelial hiperplásico, principalmente de linfócitos T auxiliares em períodos de ativo crescimento (CURY et al., 1998), enquanto que os cistos periapicais que possuem revestimento epitelial atrófico exibem número aumentado de imunossupressores, como os linfócitos *natural killer*, ocasionando imunomodulação negativa para a expansão das lesões (MOREIRA et al., 2000).

Está bastante documentada na literatura a presença de imunoglobulinas (Igs) nos cistos periapicais, sendo a IgG a classe predominante seguida pela IgA, IgE e IgM. Estes anticorpos podem ser inespecíficos ou específicos contra os antígenos relacionados à etiologia dos cistos e são secretados pelos plasmócitos em resposta à estimulação pelas células T ou pelas endotoxinas bacterianas (TAKAHASHI, 1998; TAKAHASHI; MAC DONALD; KINANE, 1996).

A presença dessas células inflamatórias e de imunoglobulinas nas lesões císticas periapicais indica que tanto reações imunológicas humorais quanto mediadas por células, participam na patogênese dessas lesões (CURY et al., 1998; TAKAHASHI, 1998; TAKAHASHI; MAC DONALD; KINANE, 1996; TORABINEJAD, 1994).

O tratamento indicado para os cistos periapicais é, inicialmente, a terapia endodôntica convencional, pois se deve ter em mente que o cisto periapical é meramente o resultado da resposta do hospedeiro à infecção do sistema de canais radiculares e não a fonte de irritação. O tratamento endodôntico resulta em redução dos mediadores inflamatórios, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, e, assim, a proliferação das células epiteliais cessa. A regressão das células epiteliais já proliferadas ocorre pela morte celular programada ou apoptose. Também é possível que durante a proliferação as células epiteliais adquiram propriedades antigênicas e expressem em sua superfície moléculas que não expressam em condições fisiológicas, sendo, assim, reconhecidas como estranhas (não próprias) e destruídas pelo sistema imunológico (células *natural killer*, linfócitos T citotóxicos ou

macrófagos), favorecendo o reparo da região periapical (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007; PIRES et al., 2007; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004).

O tempo de reparo varia de seis meses a vários anos. Neste período ocorre uma sucessão de eventos, como a substituição progressiva do tecido inflamatório crônico por tecido fibroso e deste pelos tecidos duros, que repararão as perdas óssea e radicular, e a inserção de novas fibras colágenas no osso e no cemento neoformados proporcionando a restauração do ligamento periodontal (MAALOUF; GUTMANN, 1994).

O reparo periapical pode ser constatado clinicamente quando o dente apresenta ausência de sintomatologia e imagem radiográfica de redução no tamanho da lesão ou do seu desaparecimento (MAALOUF; GUTMANN, 1994). Por vezes, podem ocorrer cicatrizes fibrosas após o tratamento endodôntico do dente envolvido com a lesão cística e o tecido que estava originalmente presente é substituído por tecido conjuntivo fibroso compacto, especialmente quando ambas as corticais ósseas tiverem sido rompidas. Nesses casos, a lesão exibe um padrão radiográfico radiolúcido, porém não necessita de tratamento (NEVILLE et al., 2004).

A estrutura histopatológica dos cistos periapicais em relação ao canal radicular do dente afetado pode ser de particular importância para o comportamento dessas lesões após o tratamento endodôntico. A não regressão de alguns cistos periapicais após tratamento endodôntico convencional pode estar relacionada com a localização da cavidade cística no que diz respeito à sua íntima relação com o forame apical. Tratando-se de um cisto periapical em bolsa, parece razoável que uma alteração no conteúdo do canal possa ter um efeito sobre o lúmen e o epitélio adjacente, ocasionando alteração ambiental e cura da lesão pela terapia endodôntica não-cirúrgica. Em contraste, os cistos periapicais verdadeiros parecem constituir lesões auto-sustentadas, independentes da fonte irritativa do canal radicular e, portanto, a terapia convencional pode não ter efeito sobre os mesmos, principalmente sobre os maiores. Neste tipo de cistos, além dos irritantes do canal radicular, outros irritantes, tais como cristais de colesterol ou possíveis antígenos não identificados estão presentes, não podem ser removidos pela terapia endodôntica não cirúrgica e, dessa forma, mantêm contínuo estímulo inflamatório para as células do revestimento epitelial. Por isso, os cistos periapicais verdadeiros devem ser tratados cirurgicamente (NAIR, 1998; NAIR; PAJAROLA; SCHROEDER,

1996).

Contrariamente, Maalouf e Gutmann (1994) inferiram que o tratamento endodôntico não-cirúrgico conduz, de alguma forma, à destruição local ou generalizada do limitante epitelial de cistos verdadeiros, culminando no reparo. Um dos mecanismos pelos quais isso ocorreria seria através de quebra da integridade do limitante epitelial ocasionada por uma sobreinstrumentação, que estabeleceria a drenagem e redução da pressão intra-luminal cística. Concomitantemente, ocorreria fibroplasia com deposição de colágeno, compressão da rede vascular que nutria as células epiteliais e, conseqüentemente, degeneração e remoção das mesmas pelos macrófagos.

Após o tratamento, é aconselhado um acompanhamento rígido de pelo menos um a dois anos. Se a imagem radiolúcida não desaparecer e o tratamento endodôntico inicial não alcançar uma boa qualidade, a lesão poderá, muitas vezes, ser tratada com sucesso pelo retratamento endodôntico. Entretanto, se o tratamento endodôntico inicial parecer adequado, mas a lesão não cicatrizar e apresentar-se sintomática, uma cirurgia parodontal e biópsia estão indicadas para excluir outros processos patológicos possíveis (MAALOUF; GUTMANN, 1994; NEVILLE et al., 2004; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004).

Após a terapia endodôntica cirúrgica, o reparo periapical segue exatamente o mesmo curso daquele decorrente da terapia endodôntica convencional. A única diferença é que com a terapia endodôntica cirúrgica o reparo ocorre de maneira mais rápida devido ao debridamento artificial mais efetivo do tecido infectado conferido pelos procedimentos cirúrgicos quando comparado ao debridamento biológico realizado pelos fagócitos na terapia endodôntica convencional (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007).

Nos casos em que se faz necessária a extração do dente envolvido com a lesão cística e o tecido inflamatório periapical não for curetado, pode originar-se um cisto periapical residual (DIMITROULIS; CURTIN, 1998; NEVILLE et al., 2004; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

### 2.3 CISTO PERIAPICAL RESIDUAL

O cisto periapical residual origina-se de remanescentes epiteliais, estimulados por um processo inflamatório, que não foram curetados e totalmente removidos no momento da extração de um dente não-vital (DIMITROULIS; CURTIN, 1998; NEVILLE et al., 2004; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

Apesar de muitos dentes com granulomas e cistos periapicais serem extraídos, o número de casos de cistos periapicais residuais diagnosticados é muito pequeno. Representam uma pequena parcela dos cistos odontogênicos, variando de 1,5% a 11,2% e sendo mais freqüentes em indivíduos do sexo masculino (JONES; CRAIG; FRANKLIN, 2006; MENINGAUD et al., 2006; OCHSENIUS et al., 2007; TAYLOR et al., 2002; VARINAUSKAS; GERVICKAS; KAVOLIUNIENE, 2006). A localização mais relatada tem sido a região anterior da maxila seguida da região posterior da mandíbula (JONES; CRAIG; FRANKLIN, 2006; OCHSENIUS et al., 2007; VARINAUSKAS; GERVICKAS; KAVOLIUNIENE, 2006).

No tocante à patogênese dos cistos periapicais residuais, observa-se semelhança com a relatada para os cistos periapicais, no que diz respeito à proliferação epitelial, formação e expansão da cavidade, além da reabsorção óssea que a acompanha. Contudo, alguns estudos demonstraram diferença no metabolismo dos cistos residuais, haja vista tratar-se de uma lesão menos ativa que os cistos periapicais uma vez que a fonte de irritação constante representada pela infecção oriunda do canal radicular foi eliminada com a extração dental (PULHEZ, 2004; SUZUKI et al., 2001; SUZUKI et al., 2002).

Suzuki et al. (2001) demonstraram baixo potencial proliferativo do epitélio dos cistos periapicais residuais. Observaram menor imunomarcagem a um antígeno de proliferação celular, número de células de Langerhans significativamente menor e intensidade mais leve do infiltrado inflamatório nos cistos periapicais residuais quando comparados aos cistos periapicais. Os autores ressaltaram que as células de Langerhans estão associadas, além da resposta imune, à proliferação e maturação epitelial e que o estímulo inflamatório intenso pode causar proliferação epitelial. Os dados deste estudo caracterizam uma fase quiescente e de regressão do crescimento dos cistos periapicais residuais após a remoção do irritante inflamatório.

A diferença do potencial proliferativo entre estes dois tipos de cistos foi confirmada por Suzuki et al. (2002) que verificaram menor expressão da enzima óxido nítrico sintase e das proteínas de choque térmico, ambas relacionadas com a

proliferação do revestimento epitelial, nos cistos periapicais residuais quando comparados aos cistos periapicais.

Corroborando tais resultados, Pulhez (2004) observou que o índice de proliferação epitelial foi significativamente menor nos cistos periapicais residuais em relação aos cistos periapicais, quando comparadas às porcentagens de células epiteliais positivas e à área de marcação em  $\mu\text{m}^2$  aos marcadores de proliferação epitelial.

Caracteristicamente, o cisto periapical residual apresenta-se assintomático, sendo acidentalmente descoberto nos exames radiográficos de rotina (NEVILLE et al., 2004). Contudo, alguns casos associados à sintomatologia, representada por dor e/ou edema, foram relatados na literatura, estando relacionados a cistos periapicais residuais maiores que os assintomáticos (HIGH; HIRSCHMANN, 1988).

Seu aspecto radiográfico corresponde a uma radiotransparência de forma circular a oval, de tamanho variável, no interior do processo alveolar no sítio de uma extração dental prévia. Com o envelhecimento da lesão, a degeneração dos constituintes celulares no lúmen pode ocasionar calcificação distrófica e radiopacidade luminal central (HIGH; HIRSCHMANN, 1986; NEVILLE et al., 2004).

As características histopatológicas dos cistos periapicais residuais são semelhantes às dos cistos periapicais. É uma cavidade revestida por epitélio escamoso estratificado, o qual pode apresentar exocitose, espongirose ou hiperplasia. O lúmen é preenchido por líquido e células descamadas. Ocasionalmente, o revestimento epitelial pode apresentar calcificações lineares ou em forma de arco, conhecidas como corpúsculos de Rushton. Calcificações distróficas, cristais de colesterol com células gigantes multinucleadas, hemácias e áreas de pigmentação por hemossiderina podem estar presentes no lúmen, na cápsula ou em ambos. A cápsula consiste em tecido conjuntivo fibroso denso, muitas vezes com infiltrado inflamatório contendo linfócitos mesclados com neutrófilos, plasmócitos, histiócitos e, raramente, mastócitos e eosinófilos (NEVILLE et al., 2004).

As células inflamatórias predominantes são os linfócitos T e os plasmócitos. Comparativamente aos cistos periapicais, os cistos periapicais residuais apresentam maior número de linfócitos T supressores (PULHEZ, 2004).

Com o tempo, a maior parte dos cistos periapicais residuais exibem uma redução no tamanho, atrofia do revestimento epitelial, diminuição das células

inflamatórias e ocorrência de aumento das calcificações distróficas, podendo ocorrer resolução espontânea mediante a ausência do estímulo irritante constante. Contudo, muitos persistem e os poucos estudos publicados na literatura sobre estes cistos, em comparação com os demais tipos de cistos odontogênicos, ainda não elucidaram os fatores determinantes sobre a regressão ou persistência dos cistos periapicais residuais (HIGH; HIRSCHMANN, 1986).

Como grande parte dos cistos e tumores não-odontogênicos apresentam aparência semelhante de um cisto periapical residual, ele deve ser removido cirurgicamente e encaminhado para biópsia (NEVILLE et al., 2004; REGEZI; SCIUBBA, 2000), não necessitando de nenhum cuidado adicional na cirurgia de remoção no que diz respeito a enxerto da cavidade óssea (CHIAPASCO et al., 2000). Caso permaneçam sem tratamento, o crescimento continuado pode causar destruição significativa e enfraquecimento da mandíbula ou maxila acompanhado de parestesia (DIMITROULIS; CURTIN, 1998).

Após um tratamento adequado, o reparo ósseo completo é usualmente observado e não ocorre recidiva. Contudo, podem ocorrer cicatrizes fibrosas, especialmente quando ambas as corticais estiverem rompidas, não sendo necessário outro tratamento. Em casos raros, pode ocorrer transformação carcinomatosa (NEVILLE et al., 2004; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

## 2.4 ANGIOGÊNESE

### 2.4.1 Considerações gerais

O termo angiogênese é uma palavra de origem grega (aggeion: vaso, gênese: formação) empregada para conceituar a produção de novos capilares a partir de vasos pré-existentes, ou melhor, a neoformação vascular. É fundamental em grande número de processos fisiológicos como a embriogênese, alterações associadas ao ciclo reprodutivo feminino e reparo tecidual. Em eventos patológicos, como nos processos inflamatórios, condições isquêmicas, crescimento tumoral e metástase, é rapidamente iniciada em resposta à hipóxia ou isquemia, a partir da

secreção de fatores angiogênicos (FOLKMAN; SHING, 1992; FOLKMAN, 1995; PEPPER, 1997).

Com exceção da neoformação vascular que ocorre em resposta à injúria tecidual ou nos órgãos reprodutivos femininos, a modificação das células endoteliais em condições fisiológicas é bastante baixa. A angiogênese é rigorosamente controlada por fatores estimuladores angiogênicos endógenos e reguladores negativos da proliferação endotelial, os quais atuam de forma antagônica para manter a quiescência da microvasculatura responsável pela renovação endotelial (FOLKMAN; SHING, 1992; FOLKMAN, 1995; PEPPER, 1997; PEPPER, 2001).

Tem sido caracterizada uma ampla variedade de fatores angiogênicos endógenos, como o fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb, do inglês *basic fibroblastic growth factor*), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês *platelet-derived growth factor*), o fator estimulador de granulócitos (G-CSF, do inglês *granulocyte-colony stimulating factor*), o fator de crescimento placentário (PIGF, do inglês *placental growth factor*), o fator de crescimento dos hepatócitos (HGF, do inglês *hepatocyte Growth Factor*), a angiogenina, a proliferina, o TGF- $\alpha$ , o TGF- $\beta$ , o TNF- $\alpha$  e a IL-8 (DVORAK et al., 1995; FOLKMAN; D'AMORE, 1996; FOLKMAN, 1995; FOLKMAN; SHING, 1992; GRIFFOEN; MOLEMA, 2000; PEPPER, 1997).

Os fatores angiogênicos são liberados pelas células presentes nas lesões, como os macrófagos ativados, considerados uma das principais fontes de fatores angiogênicos, os mastócitos e os linfócitos, os quais além de secretar fatores angiogênicos, também secretam citocinas e fatores quimiotáticos para as células endoteliais (FOLKMAN; SHING, 1992).

Além dos fatores angiogênicos descritos, a neovascularização que comumente acompanha respostas imunes e inflamatórias crônicas também pode ser induzida pelas células T do proeminente infiltrado inflamatório crônico que está presente nestas condições. As células endoteliais expressam o receptor CD40 e seu reconhecimento e ligação pelos linfócitos T CD4 determina ativação das células endoteliais e neovascularização (MACH et al., 1999).

Uma vez que os fatores estimuladores da angiogênese podem ser detectados em tecidos nos quais aparentemente não há angiogênese, acredita-se que a manutenção da quiescência endotelial seja, essencialmente, devida à presença de

inibidores angiogênicos (PEPPER, 2001).

Os inibidores angiogênicos fazem parte de um extenso grupo de supressores e normalmente defendem o endotélio vascular de um estímulo mitógeno. Dentre eles, destacam-se principalmente a angiostatina e a trombospondina, além da endostatina e a tumstatina. A angiostatina é um fragmento interno do plasminogênio com potente ação inibitória sobre a angiogênese. A trombospondina, por outro lado, é uma glicoproteína trimérica que modula a angiogênese de forma multifuncional e dose dependente. Em baixas concentrações aumenta a angiogênese, enquanto que em altas doses atua inibindo a proliferação das células endoteliais (FOLKMAN, 1995; HANAHAN; FOLKMAN, 1996; QIAN et al., 1997).

Como a maioria dos outros processos biológicos, a angiogênese é o resultado de complexas interações entre os fatores inibidores e efetores (PEPPER, 2001). A alteração no equilíbrio entre estes fatores desencadeia o fenótipo angiogênico em algumas condições patológicas, podendo levar as células a exibir expressão excessiva de um ou mais fatores estimuladores da angiogênese, a mobilizar uma proteína angiogênica da matriz extracelular e/ou recrutar células hospedeiras sintetizadoras de fatores angiogênicos (FOLKMAN, 1995; HANAHAN; FOLKMAN, 1996). A super-expressão de fatores angiogênicos pode induzir à formação cística, desenvolvimento, invasão e metástase de tumores (ZHANG et al., 2006).

#### 2.4.2 VEGF

Dos doze fatores angiogênicos conhecidos, o VEGF tem sido um dos mais estudados e suas inúmeras propriedades o tornam universalmente aceito como um importante regulador da angiogênese. Pode ser classificado em diferentes tipos de acordo com sua atividade. O VEGF-A é o membro mais importante devido a sua atuação sob as células endoteliais vasculares. Os outros membros são: o VEGF-B (angiogênese embrionária), o VEGF-C (linfangiogênese), o VEGF-D (linfangiogênese ao redor de bronquíolos pulmonares) e o PlGF (vasculogênese). Estes membros foram descobertos posteriormente ao VEGF-A, e antes desta descoberta o VEGF-A era chamado somente VEGF, termo ainda mais empregado. Também foram detectadas algumas proteínas relacionadas ao VEGF codificadas por vírus (VEGF-

E) e no veneno de algumas cobras (VEGF-F) (DVORAK et al., 1995; WIKIPEDIA, 2008).

O VEGF está associado à vasodilatação e aumento da permeabilidade inicial, que permitem a saída de proteínas plasmáticas para os tecidos para formar uma rede provisória rica em fibrina, indução à mitose e migração das células endoteliais, aumento da expressão da integrina  $\alpha_v\beta_3$  pelas células endoteliais, criação do lúmen vascular e fenestrações nos vasos sanguíneos. Além disso, exerce quimiotaxia para monócitos, induz à expressão de proteases e de receptores importantes para a invasão celular e remodelação tecidual e, também, previne apoptose das células endoteliais (DVORAK et al., 1995; GRUPTA et al., 1999; LAMOREAUX et al., 1998; LEE et al., 2007; VALABLE et al., 2005; WANG; KEISER, 1998; WIKIPEDIA, 2008; ZHANG et al., 2006).

A produção do VEGF pode ser induzida em células endoteliais, células epiteliais, macrófagos, linfócitos e fibroblastos por diversos estímulos, tais como o LPS, citocinas inflamatórias (IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ ), fatores de crescimento (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e PDGF) e hipóxia tecidual. Nesta situação, as células produzem o fator de transcrição HIF (do inglês *hipoxia inducible factor*) que estimula a secreção de VEGF (DVORAK et al., 1995; HANAHAN; FOLKMAN, 1996; WIKIPEDIA, 2008).

Na angiogênese, o VEGF atua diretamente e seletivamente sobre as células endoteliais por meio de duas classes de receptores tirosina kinases: o VEGFR-1 (do inglês *vascular endothelial growth factor receptor-1*) ou Flt-1 (do inglês *fms-like tyrosine-kinase-1*) e VEGFR-2 (do inglês *vascular endothelial growth factor receptor-2*) ou KDR/Flk-1 (do inglês *kinase domain region/ fetal liver kinase-1*). O VEGFR-2 parece mediar quase todas as respostas celulares ao VEGF. A função do VEGFR-1 ainda não está bem definida, mas sabe-se que este receptor modula a sinalização do VEGFR-2 e que possivelmente atua quebrando a ligação do VEGF ao receptor VEGFR-2, o que é particularmente importante durante a vasculogênese embrionária (DVORAK et al., 1995; HANAHAN; FOLKMAN, 1996; WIKIPEDIA, 2008).

Diversos efeitos seguem a interação do VEGF com seus receptores nas células endoteliais (DVORAK et al., 1995; HANAHAN; FOLKMAN, 1996). O primeiro a ser detectado é um aumento em quatro vezes do cálcio citoplasmático, o que culmina no aumento de outros agonistas nas células endoteliais, tais como trombina, histamina e fator de von Willebrand (FvW). O VEGF também estimula o acúmulo de

fosfolipase C. Em conjunto, estes eventos são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular inicial induzida pelo VEGF (DVORAK et al., 1995; ZUCKER et al., 1998).

Outro efeito que segue a interação do VEGF com seus receptores das células endoteliais é a indução da expressão e ativação de algumas proteases, tais como os ativadores de plasminogênio e as metaloproteinases (MMPs), de integrinas e de outros fatores que estimulam e/ou favorecem a proliferação e migração das células endoteliais (DVORAK et al., 1995; ELICEIRI; CHERESH, 1999; FRIEDLANDER et al., 1995; ZUCKER et al., 1998).

Além do VEGF, um outro fator de crescimento com potente atividade angiogênica é o FGF. Contudo, embora estimule a proliferação e migração das células endoteliais, também apresenta receptores em outras células como fibroblastos, células musculares lisas e células epiteliais, sendo considerado, portanto, como marcador angiogênico inespecífico (SO et al., 2001; WAKULICH et al., 2002).

Tem sido observado que o VEGF e o FGFb induzem uma resposta angiogênica sinérgica (FOLKMAN, 1995; HANAHAN; FOLKMAN, 1996; PEPPER, 2001). Tanto o VEGF quanto o FGFb agem diretamente nas células endoteliais, estimulando a angiogênese, mas ao contrário do FGFb, o VEGF é um potente fator de permeabilidade vascular que atua diretamente no aumento da permeabilidade microvascular para as proteínas plasmáticas, sendo, também, responsável pela indução de fenestrações endoteliais. Entretanto, o FGFb também atua na permeabilidade vascular, mas de uma forma indireta. O FGFb induz à expressão de VEGF, promove a proliferação de células endoteliais, induz a expressão de proteases (principalmente das MMPs), regula a expressão de integrinas ( $\alpha_v\beta_3$ ) pelas células endoteliais e promove migração destas células, eventos que contribuem para o aumento da permeabilidade vascular por alterarem a estrutura vascular (BROOKS; CLARK; CHERESH, 1994; ELICEIRI; CHERESH, 1999; FRIEDLANDER et al., 1995; PEPPER, 2001; SENGER, 1996).

#### 2.4.3 Biodinâmica da angiogênese

A angiogênese é um processo complexo e, no tocante à biodinâmica pode-se dividi-la em fase de ativação (brotamento) e fase de resolução (PEPPER, 1997; PEPPER, 2001).

A fase de ativação envolve vários processos seqüenciais: episódio de hipóxia, que estimula a liberação de fatores angiogênicos; aumento da permeabilidade vascular e deposição de fibrina extravascular; ativação mitogênica das células endoteliais vasculares para induzir sua proliferação; degradação seletiva da membrana basal vascular, para permitir os brotamentos vasculares; migração das células endoteliais em direção à fonte de estímulo quimiotático; degradação da matriz extracelular ao redor do vaso para permitir a invasão das células endoteliais e formação do lúmen capilar (FOLKMAN; SHING, 1992; LAMOREAUX et al., 1998; PEPPER, 1997; PEPPER, 2001).

Inicialmente, os fatores angiogênicos liberados induzem um rápido aumento da permeabilidade vascular nos vasos sangüíneos, o que permite o extravasamento do fibrinogênio, uma proteína de coagulação sangüínea, o qual é polimerizado e forma um denso gel de fibrina ao redor do vaso. A rede de fibrina depositada serve como armação temporária, ou matriz provisória, para o ingresso das células endoteliais que subsequente geram os vasos. Apesar de importante suporte estrutural para a neovascularização, esta rede de fibrina representa a maior barreira para a migração das células endoteliais e deverá ser degradada posteriormente para que a movimentação celular ocorra (DVORAK et al., 1995; PEPPER, 1997; PEPPER, 2001; SENGER, 1996).

Concomitantemente, os fatores angiogênicos promovem ativação mitogênica das células endoteliais vasculares e induzem sua proliferação e fazendo com que formem brotamentos vasculares, representados por pseudópodos endoteliais simples que tenderão a formar uma rede capilar. Tal processo inicial é dependente da desorganização e degradação seletiva da membrana basal vascular realizada pela enzima plasmina a pelas MMPs (DANTAS, 2000b; KENAGY et al., 1997; PEPPER, 2001).

Em seguida, as células adjacentes secretam fatores de crescimento, como, por exemplo, TGF- $\beta$ , PDGF e TGF- $\alpha$ , os quais, através de um efeito parácrino induzem outras células à síntese e secreção de fatores angiogênicos, podendo esta síntese e secreção ocorrer, também, por meio de efeito autócrino. Os fatores angiogênicos produzidos ligam-se aos seus receptores das células endoteliais (por

exemplo, o VEGF liga-se ao VEGFR-2), promovendo mitoses e a expressão de outros receptores. Adicionalmente, regulam a expressão das MMPs e de seus inibidores, uma vez que estas proteases, além de participarem de eventos já comentados, como a degradação da membrana basal dos vasos, também serão requeridas para eventos posteriores na angiogênese (DANTAS, 2000b; LAMOREAUX et al., 1998).

Para que as células endoteliais estimuladas migrem em direção à fonte de estímulo quimiotático, a barreira representada pela rede de fibrina inicialmente depositada ao redor dos vasos deve ser vencida. Para tanto, as células endoteliais em migração sintetizam enzimas proteolíticas, principalmente as MMPs, que degradam a matriz extracelular ao redor do vaso, permitindo, assim, a invasão das células endoteliais e formação do lúmen capilar (LAMOREAUX et al., 1998; PEPPER et al., 2001; SENGER, 1996).

As células endoteliais podem sintetizar diferentes tipos de proteases e a síntese destas é regulada pelas interações realizadas entre as células endoteliais e os componentes da matriz extracelular circunjacente, mediadas pelas integrinas. Deste modo, somente as proteases apropriadas para dissolução do substrato específico necessário à migração celular são liberadas no microambiente pericelular e apenas fibrina suficiente para a invasão endotelial é degradada para permitir a formação dos túbulos endoteliais, enquanto grande parte da matriz provisória é preservada para acomodar a nova rede capilar e as populações celulares acessórias (LAMOREAUX et al., 1998; PEPPER et al., 2001; SENGER, 1996).

Além da síntese, a atividade das proteases também é regulada para que a invasão endotelial e adequada formação tubular ocorram, uma vez que atividade proteolítica em excesso resulta tanto em destruição do suporte conferido pela matriz provisória, necessário para a invasão, como na formação de estruturas vasculares aberrantes. Destarte, os inibidores das proteases desempenham um importante papel permissivo durante a angiogênese, localizando-se, neste caso, ao redor dos vasos em regiões de proliferação vascular ativa, local no qual podem prevenir a destruição descontrolada da matriz. Por outro lado, na ausência de suficiente proteólise, a invasão e a formação do lúmen do vaso são inibidos (MONTESANO et al., 1990; PEPPER, 2001).

Seguindo a degradação da rede de fibrina, a formação dos tubos endoteliais, que são os primórdios dos vasos sangüíneos, é estimulada pela ligação dos fatores

angiogênicos a determinados receptores das células endoteliais (por exemplo, o VEGF liga-se aos receptores VEGFR-1). A partir de então se formam os capilares comuns pelo dobramento de uma única célula endotelial ou capilares sinusóides pela associação de até três células endoteliais. A parede desse tubo endotelial primitivo pode tornar-se cada vez mais complexa, formando arteríolas, vênulas, veias e artérias (DANTAS, 2000b).

Finalizada a fase de ativação ou brotamento, inicia-se a fase de resolução da angiogênese que inclui: inibição da proliferação das células endoteliais; cessação da migração celular; reconstituição da membrana basal vascular; maturação do complexo juncional e restabelecimento da parede do vaso; e recrutamento e diferenciação de células musculares lisas e pericitos. O estabelecimento do fluxo sanguíneo no novo vaso formado está implícito na definição desta fase (PEPPER, 1997; PEPPER, 2001).

Nesta fase da angiogênese, o balanço entre as proteases e seus inibidores é bastante importante para a resolução do processo. Os inibidores das proteases controlam a degradação da matriz, até então necessária, permitindo a deposição de nova matriz ao redor dos vasos neoformados, restabelecimento da membrana basal, diferenciação e quiescência das células endoteliais (KRÄLING et al., 1999). Contudo, o processo de proteólise não cessa neste momento, mas continua de forma sutil estando implicado com a regulação da atividade de citocinas, com a ativação de formas latentes de TGF- $\beta$  e geração de fragmentos proteolíticos com atividade regulatória para a angiogênese, como, por exemplo, a angiostatina, a endostatina e a trombospondina, que atuam sobre as células endoteliais inibindo sua proliferação e induzindo à quiescência endotelial (DANTAS, 2000b; PEPPER, 2001).

Além destes inibidores, a angiopoetina também atua na fase de resolução da angiogênese. A angiopoetina-2 (Ang-2), ao ligar-se aos receptores Tie-2 (do inglês *tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2*) das células endoteliais, provoca aumento da resposta aos inibidores de proliferação vascular, evitando, assim, que os vasos cresçam. Defeitos nestes receptores têm sido relacionados à vascularização anormal de órgãos e tecidos (DANTAS, 2000b).

Posteriormente, se dá a maturação e remodelação vascular promovidas pelo PDGF, pelo TGF- $\beta$  e pela angiopoetina-1 (Ang-1). A Ang-1 se liga aos receptores Tie-2 das células endoteliais, fazendo com que elas produzam fatores de migração, proliferação e diferenciação para as células periendoteliais que irão envolver os

tubos de endotélio, sustentar e definir a arquitetura dos vasos, bem como deixar as células endoteliais em quiescência para evitar crescimento vascular exagerado e permitir a maturação do vaso. Tratando-se de um capilar, as células circundantes originam pericitos ou células perivasculares indiferenciadas que ficam associadas ao capilar, enquanto as células do conjuntivo auxiliam as células endoteliais a reconstituir a membrana basal. Se for um vaso mais calibroso (arteríola, artéria, veia ou vênula) ocorre o recrutamento de células periendothelias para formas tunicas associadas a estes vasos (DANTAS, 2000b; FOLKMAN; D'AMORE, 1996; FOLKMAN; SHING, 1992; KENAGY et al., 1997; PEPPER, 1997; VALABLE et al., 2005).

#### 2.4.4 Mensuração da angiogênese

A angiogênese pode ser qualitativa e quantitativamente mensurada por uma grande variedade de métodos, como, por exemplo, a cultura de células, a hibridização *in situ* e a microscopia de luz, principalmente pela imuno-histoquímica por ser uma técnica extremamente específica e sensível, podendo detectar antígenos expressos em níveis relativamente baixos, além de poder ser realizada em cortes teciduais rotineiramente utilizados, da simplicidade de execução, do baixo custo e da necessidade de reduzido espaço físico (JORDAN et al., 2002; VERMEULEN et al., 2002).

Quanto à avaliação da angiogênese pela microscopia de luz, Schor et al. (1998), em um estudo comparativo entre diferentes metodologias destinadas à quantificação dos vasos sanguíneos, demonstraram que vários fatores influenciam a estimativa da vascularização: o tipo de fixador empregado, o pré-tratamento das seções teciduais antes da marcação, o anticorpo selecionado e o método de quantificação utilizado.

Apesar dos antígenos serem mais bem preservados em tecidos congelados, bons resultados são alcançados em tecidos fixados em formalina, os quais possibilitam um material prontamente disponível, que requer métodos de aplicabilidade e custo usuais, além de resultar em detalhes microscópicos bem preservados. Deve ser ressaltado que atraso ou tempo extenso de fixação (mais de

48 horas), inadequada desidratação e/ou temperatura excessiva na inclusão na parafina (>54°C) podem prejudicar a técnica, resultando em fraca imunomarcção ou resultado falso-negativo (JORDAN et al., 2002).

Quanto ao tipo de fixador empregado, Jacquemier et al. (1998), em estudo realizado com carcinomas de mama, encontraram diferença estatisticamente significativa na marcação vascular entre espécimes fixados no fluido de Bouin e aqueles fixados em formalina alcoólica. Apenas nestes últimos, todas as amostras exibiram marcação positiva para o anticorpo estudado.

Contudo, os epítomos antigênicos dos espécimes teciduais fixados em formalina ficam indisponíveis à ligação ao anticorpo quando da utilização da técnica de imuno-histoquímica para mensuração da angiogênese. Assim, é necessária a realização de pré-tratamento tecidual antes da imunomarcção, chamado de recuperação antigênica (JORDAN et al., 2002). Schor et al. (1998) confirmaram a necessidade da recuperação dos sítios antigênicos para o estudo imuno-histoquímico da angiogênese, uma vez que obtiveram maior marcação de vasos sangüíneos em espécimes submetidos à recuperação antigênica que naqueles onde esta etapa foi ignorada.

A recuperação antigênica pode ser realizada por calor (microondas ou panela de pressão, ambos requerem solução quelante - citrato ou ácido etilenodiaminotetracético) ou digestão enzimática (protease, tripsina ou pepsina) (JORDAN et al., 2002; SCHOR et al., 1998). Segundo Jordan et al. (2002), a digestão enzimática fornece marcação menos intensa que a fornecida pelo calor e aumento da marcação de fundo. Já Schor et al. (1998) obtiveram maior número de vasos imunomarcados com o pré-tratamento tecidual pela digestão enzimática com a protease XXIV que com o aquecimento em microondas.

O anticorpo empregado também pode influenciar na mensuração da angiogênese pela microscopia de luz empregando a técnica da imuno-histoquímica. É necessária certa cautela na escolha do anticorpo, pois determinados antígenos são compartilhados por diferentes tipos celulares e podendo reagir com vários anticorpos distintos. Diversos anticorpos podem ser selecionados para imunomarcção dos vasos sangüíneos, desde que apresentem afinidade por epítomos específicos das células endoteliais. Dentre eles destacam-se o anti-fator de von Willebrand (anti-FvW) ou fator VIII, o anti-CD31, anti-CD34, anti-CD105 e outros (DALES et al., 2004; HANAHAN; FOLKMAN, 1996; JORDAN et al., 2002;

VERMEULEN et al., 2002).

Embora haja opiniões conflitantes em relação à indicação do marcador imunohistoquímico que ofereça melhores resultados na quantificação da angiogênese, os anticorpos anti-CD31 e o anti-FvW são os mais recomendados na literatura (FREITAS et al., 2005; GLEICH et al., 1997; HANAHAN; FOLKMAN, 1996; JACQUEMIER et al., 1998; PAZOUKI et al., 1997; SHOR et al., 1998; SION-VARDY et al., 2001; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007; TAKAHASHI et al., 1994; TOMODA et al., 1999). Destes, o anticorpo anti-FvW tem apresentado melhores resultados por determinar imunomarcção mais uniforme e de mais fácil interpretação (FREITAS et al., 2005; GLEICH et al., 1997; SION-VARDY et al., 2001; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007).

Gleich et al. (1997) evidenciaram marcação celular insuficiente e/ou elevada marcação de fundo em alguns espécimes de carcinoma oral de células escamosas marcados com o anticorpo anti-CD31, o que não ocorreu com o anti-FvW. Corroborando estes resultados o estudo realizado por Freitas et al. (2005) que demonstrou contagem microvascular mais uniforme avaliando a imunomarcção do FvW em hemangiomas e granulomas piogênicos quando comparada à do CD31 nas mesmas lesões. Outrossim, Souza, Freitas e Miranda (2007) compararam a vascularização evidenciada pelos anticorpos anti-CD31 e anti-FvW em casos de carcinomas de células escamosas de língua e lábio inferior e verificaram que a imunomarcção com o anticorpo anti-FvW realmente se apresentou mais homogênea e eficiente (100% de casos positivos) que a obtida com o anti-CD31 (55,5% de positividade).

O anticorpo anti-FvW caracteriza-se como um anticorpo monoclonal obtido do plasma humano que é capaz de reagir especificamente com o fator de von Willebrand expresso nas células endoteliais e megacariócitos, exibindo reatividade num padrão granular ao nível do citoplasma das células marcadas positivamente (DAKO, 2003).

O fator de von Willebrand é uma glicoproteína multimérica, circulante no plasma sangüíneo, sintetizada pelas células endoteliais e megacariócitos. Possui papel fundamental na hemostasia primária formando pontes entre glicoproteínas plaquetárias e estruturas do endotélio vascular, além de manter os níveis plasmáticos do fator VIII, protegendo esta proteína pró-coagulante da degradação proteolítica. Este fator tem sua expressão aumentada nas células endoteliais estimuladas pelo fator angiogênico VEGF, e, assim, representando um antígeno

especificamente relacionado aos processos angiogênicos (ZUCKER et al., 1998).

No que diz respeito às técnicas para a quantificação da angiogênese, os estudos destacam a da densidade microvascular (MVD, do inglês *microvessel density*), a do volume microvascular (MVV, do inglês *microvascular volume*) e a da contagem microvascular (MVC, do inglês *microvessel count*) (FREITAS et al., 2005; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007; PAZOUKI et al., 1997; SCHOR et al., 1998).

A MVD expressa a média dos vasos por espécime. A área de maior densidade vascular é selecionada num aumento de 100x e envolve, na prática, a contagem de três diferentes áreas. Procede-se, então, à contagem manual em microscopia de luz, num aumento de 200x, de três campos em cada uma destas áreas obtendo-se, então, a MVD alta (highest ou h-MVD) expressa em mm<sup>2</sup> ou, ainda, em 10-15 campos obtendo-se a MVD média (average-MVD ou a-MVD), cujo resultado é expresso em média por desvio padrão (GRAZIANI et al., 2006; SCHOR et al., 1998).

Outra técnica empregada para a mensuração vascular é a MVV que consiste num método estereológico de determinação de volume, no qual são selecionados 15 campos e contados 100 pontos coincidentes em cada, num total de 1.500 pontos, sendo o resultado expresso em porcentagem de volume (SCHOR et al., 1998). Este é um método bastante sensível apesar de trabalhoso, sendo mais utilizado como indicador prognóstico para cânceres em estágio precoce (PAZOUKI et al., 1997).

A MVC se constitui num método no qual em um aumento de 40x verificam-se as cinco áreas de maior densidade vascular tecidual, onde, então, em aumento de 200x contam-se manualmente os vasos, sendo o resultado expresso pelo número médio de vasos em cada secção histológica (FREITAS et al., 2005; MAEDA et al., 1995; MARINHO et al., 1997; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007). Segundo Freitas et al. (2005), este é um método de mensuração da angiogênese mais simples e que não apresenta diferença estatisticamente significativa entre a mensuração realizada pela MVD.

Deve-se ressaltar que, independente do método escolhido para mensuração da angiogênese, a interpretação dos cortes corados pela técnica de imunohistoquímica é de extrema importância, devido a sua natureza subjetiva, apesar da possibilidade, em alguns casos, de estabelecimento de análise semi-quantitativa ou quantitativa. A intensidade da marcação, o percentual e as características morfológicas das células imunorreativas devem ser considerados quando se realiza

a avaliação da imunomarcagem. Além disso, controles positivos são necessários para confirmação da especificidade da reação. Mas acima de tudo, a interpretação imuno-histoquímica deve centrar-se no contexto da impressão obtida após a análise dos cortes corados por hematoxilina e eosina (JORDAN et al., 2002).

#### 2.4.5 Angiogênese e lesões periapicais

A relação entre angiogênese e lesões inflamatórias crônicas tem sido estudada e, em muitas condições, como nas lesões periapicais, elas acontecem ao mesmo tempo. É provável que o início do processo de angiogênese durante a inflamação seja causado pelas células ativadas e em proliferação que estão em contínua demanda de nutrientes e oxigênio. Os leucócitos recrutados pelo processo inflamatório podem induzir à proliferação vascular pela secreção de citocinas responsáveis pela indução de VEGF e expressão de proteases pelas células endoteliais, culminado em ativação das células endoteliais e formação do tubo vascular. Com a estimulação crônica, tanto aumento da densidade vascular como dilatação vascular ocorrem, sendo evidente a neovascularização. O aumento da permeabilidade vascular ocasionado pelo VEGF permite um fluxo contínuo e conseqüente abundância de células inflamatórias. Além de nutrir os tecidos, os vasos sanguíneos neoformados também desempenham um ativo papel na inflamação por serem uma fonte de citocinas, quimiocinas e proteases (GRIFFOEN; MOLENA, 2000; MAJNO, 1998).

A despeito da importância da vascularização para a manutenção os processos patológicos, pouco se sabe sobre a estrutura vascular e o papel da angiogênese no desenvolvimento das lesões periapicais. Acredita-se que a angiogênese possa desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento destas lesões (GRAZIANI et al., 2006; LEONARDI et al., 2003; TETE' et al, 2005).

Os poucos estudos existentes demonstraram expressão de fatores angiogênicos, como o VEGF e o FGFb, e vascularização aumentada nas lesões periapicais, estando ambas relacionadas aos estágios de desenvolvimento e à intensidade do infiltrado inflamatório presente (GRAZIANI et al., 2006; LEONARDI et al., 2003; MOLDAUER; VELEZ; KUTTLER, 2006; TETE' et al., 2005).

Dentre o escasso acervo de trabalhos neste sentido, aponta-se a pesquisa desenvolvida por Leonardi et al. (2003), na qual a expressão do VEGF foi detectada nos fibroblastos, nas células inflamatórias, endoteliais e epiteliais em diferentes lesões periapicais. Nos granulomas periapicais sem epitélio, quase todas as células inflamatórias expressaram forte imunomarcção do VEGF. Nos granulomas periapicais epiteliados, essa expressão foi moderada nas células inflamatórias e forte em todas as células epiteliais. Já nos cistos periapicais, o VEGF foi fortemente expresso em todas as camadas do revestimento epitelial, enquanto que nenhuma célula inflamatória apresentou imunorreatividade. Muitos vasos sangüíneos pequenos neoformados, distribuídos pelas lesões e especialmente concentrados nas regiões de intenso infiltrado inflamatório, exibiram expressão do VEGF.

Proeminente neoformação vascular foi evidenciada nos cistos periapicais e nos ceratocistos por Tete' et al. (2005) através da imunomarcção de componentes vasculares (CD31), tanto em áreas de inflamação quanto no tecido subjacente, sendo a neoformação vascular mais intensa nas áreas de maior inflamação.

No intuito de relacionar a expressão de fatores angiogênicos, a vascularização e a inflamação em lesões periapicais, Graziani et al. (2006) avaliaram a expressão do VEGF e a densidade microvascular (MVD), por meio da imunohistoquímica, e as relacionaram com a condição inflamatória em cistos periapicais. Os autores observaram, de uma forma geral, moderada imunorreatividade para o VEGF no citoplasma das células inflamatórias, fibroblastos, células endoteliais e células epiteliais. Detectaram significativa associação entre a MDV, a expressão do VEGF pelas células do tecido conjuntivo e a intensidade do infiltrado inflamatório. A MDV aumentada estava associada a um grau maior de expressão de VEGF pelas células do tecido conjuntivo e foi observada em espécimes que apresentavam maior severidade de infiltrado inflamatório.

Com base em estudos realizados em outras lesões císticas (SATO et al., 1997; VAQUERO et al., 1999), alguns autores têm hipotetizado que o VEGF expresso pelas células inflamatórias, células endoteliais e células epiteliais das lesões periapicais desempenha um importante papel na patogênese dos granulomas periapicais e na expansão dos cistos periapicais por diversos mecanismos. Além de estimular a formação de novos vasos, aumentando do suprimento de oxigênio, ocasiona permeabilidade vascular persistente de vasos pré-existentes, permitindo a deposição de matriz rica em fibrina necessária para a migração celular, acúmulo de

células inflamatórias e, mais tardiamente, de fluido na cavidade cística (GRAZIANI et al., 2006; LEONARDI et al., 2003).

Além dos mecanismos supracitados, o VEGF liberado pela degradação da matriz óssea não mineralizada também contribui para o desenvolvimento das lesões periapicais auxiliando no processo de reabsorção óssea, atuando diretamente no recrutamento de osteoclastos (TETE' et al., 2005).

O FGFb também tem sido implicado na patogênese das lesões periapicais. Este fator de crescimento, reconhecidamente um fator angiogênico, além de estimular a neoformação vascular, pode participar da formação do tecido de granulação e da ativação das células epiteliais, culminando em formação cística, e, também, induzir a proliferação de fibroblastos que participarão da fase de reparo (MOLDAUER; VELEZ; KUTTLER, 2006).

Moldauer, Velez e Kuttler (2006) relataram a imunoexpressão do FGFb em fibroblastos, células inflamatórias, endoteliais e epiteliais de granulomas e cistos periapicais. A intensidade da marcação do FGFb nas células endoteliais estava relacionada à severidade do infiltrado inflamatório. Pequenos vasos neoformados, concentrados principalmente em áreas de intensa inflamação, expressavam fortemente o FGFb.

Destarte, apesar de poucos, os estudos indicam que a angiogênese desempenha um papel fundamental no estabelecimento e desenvolvimento das lesões periapicais (GRAZIANI et al., 2006; LEONARDI et al., 2003; TETE' et al., 2005). Conforme mencionado anteriormente, um dos principais eventos para que a angiogênese ocorra é a proteólise extracelular, realizada pelas MMPs, uma vez que este processo facilita a migração das células endoteliais pelos tecidos adjacentes através da interrupção das barreiras físicas da matriz extracelular e permite que os brotamentos vasculares se formem devido à degradação da membrana basal de vasos sanguíneos (HAAS et al., 2000; KENAGY et al., 1997; PEPPER, 2001; RUNDHAUG, 2003; STERNLICHT; WERB, 2001; VALABLE et al., 2005; ZHANG et al., 2006).

## 2.5 MMPs

### 2.5.1 Considerações gerais

As MMPs são uma família de endopeptidases cuja atividade catalítica reside em um domínio ativo que possui um sítio ligante de zinco, dependendo da presença desse metal para ser ativas, daí o termo metaloproteinases (BORKAKOTI, 2000; NAGASE; WOESSNER JUNIOR, 1999; STERNLICHT; WERB, 2001). Coletivamente, são capazes de degradar a maior parte, se não todos, dos componentes da matriz extracelular (MEC), determinando sua proteólise e remodelação (MOTT; WERB, 2004; SORSA; VISSE; NAGASE, 2003).

A MEC é formada por um conjunto de macromoléculas arranjadas na forma de uma malha tridimensional formando um arcabouço semelhante a uma rede que envolve as células. Constitui um meio de transporte pelo qual as células recebem os nutrientes do sangue arterial e os produtos a serem eliminados são transportados até a circulação eferente. Funciona como um reservatório de fatores biologicamente ativos, como fatores de crescimento, integrinas, citocinas, proteases, hormônios e outras moléculas bioativas que eventualmente interagem com a superfície celular influenciando muitas propriedades das células com as quais faz contato, tais como a migração, aderência, proliferação, grau de diferenciação e predisposição à apoptose (DANTAS, 2000a; LABAT-ROBERT, 2004; MOTT; WERB, 2004).

Três grupos principais de proteínas compõem a matriz extracelular, representados pelas proteínas estruturais fibrosas, proteínas estruturais não fibrosas e proteínas matricelulares. As proteínas estruturais fibrosas são subdivididas nos sistemas colagênico (colágenos fibrilares e não-fibrilares) e elástico (fibras elauínicas, oxitalânicas e elásticas) e têm função principalmente estrutural, conferindo resistência ao tecido. Por sua vez, dentre as proteínas estruturais não-fibrosas, apresentam-se as glicosaminoglicanas e glicoproteínas (laminina, fibronectina, entactina, entre outras) que são importantes na adesividade celular e na viscosidade da MEC, fornecendo resiliência e lubrificação aos tecidos. Constituindo as proteínas matricelulares apontam-se as trombospondinas, osteopontinas e tenascinas que demonstram habilidade de romper interações entre as células e a matriz (DANTAS, 2000a; LABAT-ROBERT, 2004).

Didaticamente, a MEC pode se organizar sob duas formas principais: a matriz intersticial e as membranas basais. A matriz intersticial, constituída, dentre outros

componentes, por tipos fibrilares de colágenos (tipos I, III e IV), não fibrilares, elastina, fibronectina, ácido hialurônico, proteoglicanas e outros componentes, está presente nos espaços entre epitélio, endotélio, células musculares e no tecido conjuntivo propriamente dito, bem como em formas especializadas de tecido conjuntivo, como os tecidos ósseo e cartilaginoso (ALBERTS et al., 1997; DANTAS, 2000a). Por sua vez, as membranas basais, produzidas por células endoteliais e mesenquimais, são constituídas de forma geral por colágenos dos tipos I, III, IV e VII, laminina, fibronectina, sulfato de heparano e perlecan (DANTAS, 2000a; GONZÁLEZ et al., 1994). Tanto a laminina quanto o colágeno tipo IV são constituintes da membrana basal de vasos sanguíneos e sua remodelação ocorre nos processos de neoformação vascular (OLIVEIRA, 2000).

A degradação e remodelação da MEC são fenômenos que ocorrem comumente durante a morfogênese, na angiogênese, nos processos patológicos e no reparo tecidual. Implicam contínuos eventos de síntese e degradação de proteínas colágenas e não colágenas que a compõem pela ação de complexos enzimáticos (DANTAS, 2000a; MOTT; WERB, 2004). Na verdade, vários tipos de proteinases podem participar do *turnover* da MEC. Contudo, as MMPs constituem o principal grupo de enzimas que atuam sobre este substrato (BREW; DINAKARPADIAN; NAGASE, 2000).

As primeiras MMPs foram identificadas em 1962 em estudo sobre o processo de metamorfose dos girinos no momento da perda da cauda. Desde então, mais de 66 MMPs foram clonadas e seqüenciadas, incluindo 25 MMPs em vertebrados e 22 membros homólogos em humanos. Além destas, é descrita uma série de MMPs em seres não vertebrados e na maioria dos seres vivos, inclusive bactérias, denotando haver processo evolutivo de algumas MMPs primordiais ao longo de bilhões de anos (STERNLICHT; WERB, 2001).

As MMPs constituem um grupo de 25 enzimas classificadas com base em sua estrutura molecular e especificidade de substrato em seis grupos principais: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), cujo principal substrato é o colágeno fibrilar; gelatinases (MMP-2 e MMP-9), as quais degradam gelatina e os colágenos tipo I, IV e V; tipo membrana (MT) (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17), cujos substratos são o colágeno fibrilar, proteoglicanas, glicoproteínas e gelatinases; estromelisinases (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), que têm como substrato laminina, fibronectina e colágenos não fibrilares; matrilisinas (MMP-7 e MMP-26),

que também degradam laminina, fibronectina e colágenos não fibrilares; e outras MMPs (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22; MMP-23, MMP-27 e MMP-28) (BORKAKOTI, 2000; JOHN; TUSZYNSKI, 2001; SORSA; VISSE; NAGASE, 2003).

A maioria das MMPs está organizada ao redor de um domínio catalítico conservado, um pré-peptídeo, um pró-peptídeo e um domínio C-terminal. O domínio catalítico, formado por 170 aminoácidos, possui uma seqüência ligante de zinco e uma metionina altamente conservada formando uma estrutura singular denominada *Met-Turn*. Possui ainda um íon zinco estrutural e dois a três íons cálcio necessários para a estabilidade e expressão da atividade enzimática das MMPs. Determina a especificidade de clivagem do substrato por meio de seu sítio fenda ativo, da especificidade de sub-sítios capazes de ligar resíduos de aminoácidos imediatamente adjacentes à ligação do peptídeo e através de sítios secundários externos ligantes de substrato. O domínio pré-peptídeo é formado por cerca de 20 aminoácidos e possui o peptídeo sinalizador responsável pelo direcionamento de secreção do composto pela célula. O domínio pró-peptídeo possui cerca de 80 aminoácidos e contém uma cisteína interruptora, a qual se liga ao íon zinco catalítico para manter a latência da enzima (pró-MMP). O domínio hemopexina C-terminal contribui para a especificidade de substrato e interações com inibidores endógenos (Figura 1) (BODE; FERNANDEZ-CATALAN; TSCHESCHE, 1999; BORKAKOTI, 2000; NAGASE; WOESSNER JUNIOR, 1999; STERNLICHT; WERB, 2001).

Este arquétipo é observado no subgrupo de proteases secretadas, composto pelas colagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), as duas estromelinas (MMP-3 e MMP-10), e quatro MMPs com características peculiares adicionais (MMP-12, MMP-19, MMP-20 e MMP-27). Por sua vez, as matrilisinas (MMP-7 e MMP-26) e a MMP-23 não apresentam o domínio hemopexina e as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) incorporam três módulos de fibronectina tipo II, provendo um domínio compacto de ligação ao colágeno (Figura 1) (NAGASE; WOESSNER JUNIOR, 1999; STERNLICHT; WERB, 2001; VISSE; NAGASE, 2003).

As MMPs são sintetizadas por uma variedade de células, incluindo células epiteliais, fibroblastos, células inflamatórias, osteoblastos, osteoclastos e células endoteliais, sob diversos estímulos (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004).

São, em grande parte, secretadas na forma de precursores latentes, denominados pró-enzimas ou zimogênios, que precisam ser clivados no pró-domínio para assumirem a forma ativa. Tal latência pode ser mantida em função da presença de um grupo cisteína-sulfidril não pareado próximo ao domínio pró-peptídeo, o qual age como uma espécie de quarto ligante para o sítio ativo de zinco e a ativação requer quebra desta ligação através da remoção proteolítica do domínio pró-peptídeo ou por perturbação ectópica da ligação cisteína-zinco (NAGASE; WOESSNER JUNIOR, 1999; STERNLICH; WERB, 2001).

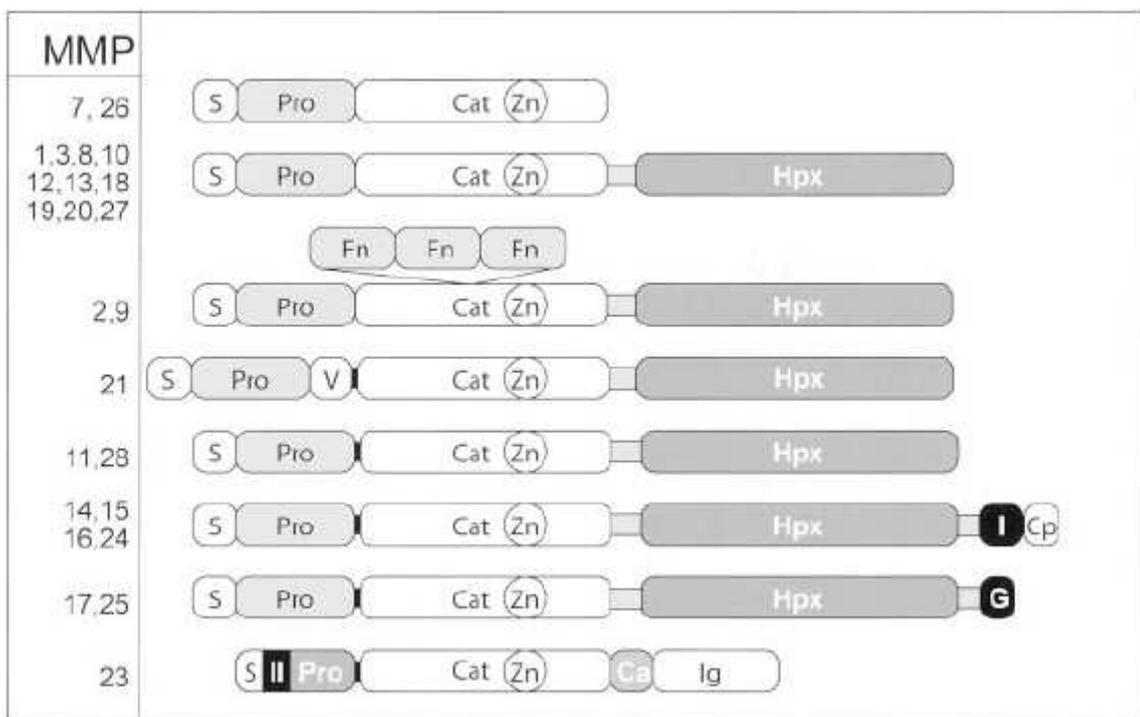


Figura 1 Estrutura das MMPs: S, sinal peptídico - pré-peptídeo; Pro, pró-peptídeo; Cat, domínio catalítico; Zn, sítio ativo de zinco; Hpx, domínio hemopexina; Fn, domínio fibronectina; V, inserção vitronectina; I, domínio transmembrana tipo I; II, domínio transmembrana tipo II; G, domínio de ancoragem; Cp, domínio citoplasmático; Ca, região de cisteína; e Ig, domínio Ig-G. Um sítio de reconhecimento *furin-like* está marcado por um traço preto entre o domínio pró-peptídeo e catalítico. Fonte: Visse e Nagase (2003).

Apesar da maior parte das MMPs ser secretada sob a forma latente, algumas, tais como a MMP-11, a MMP-28 e as MT-MMPs, possuem um domínio de reconhecimento enzimático *furin-like*, constituído por aminoácidos básicos. Situado entre o domínio catalítico e o pró-peptídeo, este domínio permite que estas MMPs sejam ativadas antes de serem levadas à superfície celular ou serem secretadas (BORKAKOTI, 2000; NAGASE; WOESSNER JUNIOR, 1999; STERNLICH; WERB,

2001; VISSE; NAGASE, 2003).

Além da ativação intracelular, a ativação das MMPs pode ocorrer por meio de ativação na superfície celular (pelas MT-MMPs), na região extracelular (pela ativação de outras proteases) e por outras MMPs previamente ativadas através de um processo denominado *stepwise* (JOHN; TUSZYNSKI, 2001; STERNLICH; WERB, 2001; VISSE; NAGASE, 2003). No compartimento extracelular, os zimogênios são ativados através de uma série de cascatas de ativação interativas envolvendo outras MMPs e/ou proteases tipo cisteína ou serina capazes de quebrar as pontes de peptídeo nos pró-domínios das MMPs. Ainda, outros mecanismos como oxidação e nitrolização podem iniciar este processo (BELLON; MARTINY; ROBINET, 2004).

É importante que as MMPs estejam localizadas na região pericelular, pois a proteólise nesta região culmina em uma série de eventos sinalizadores extracelulares importantes para a regulação do comportamento celular. Para tanto, há mecanismos específicos para concentrar as MMPs na região pericelular. Estes mecanismos incluem a expressão de MMPs ligadas às membranas (MT-MMPs), ligação das MMPs a receptores na superfície celular, presença de receptores na superfície celular para enzimas ativadoras de MMPs (plasmina, trombina e elastase) e concentração das MMPs nas moléculas pericelulares da MEC. Estes mecanismos de localização freqüentemente aumentam a ativação das MMPs, limitam o acesso dos inibidores de MMPs, concentram as MMPs nas imediações de seus alvos e limitam a extensão da proteólise nas regiões pericelulares (STERNLICHT; WERB, 2001).

A expressão das MMPs é firmemente regulada, uma vez que seu efeito pode ser potencialmente devastador (CURRAN; MURRAY, 2000; POLETTE et al., 2004). A regulação da atividade das MMPs ocorre nos níveis transcricional e pós-transcricional pelo controle dos níveis destas enzimas por seus ativadores, inibidores e sua localização na superfície celular (BAKER; EDWARDS; MURPHY, 2002; JOHN; TUSZYNSKI, 2001; STERNLICHE; WERB, 2001).

A maioria dos genes das MMPs são bastante sensíveis a diversos estímulos regulatórios. Além do estresse celular, alterações na forma celular e autoproteólise, a longa lista de fatores estimulatórios das MMPs inclui: agentes químicos, transformação oncogênica, ésteres forbóis, sinais derivados de integrinas, citocinas, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8, fatores de crescimento, como o TGF- $\beta$ , EGF, KGF, fator

de crescimento neural (NGF, do inglês *nerve growth factor*), FGFb, VEGF, PDGF, além de indutores das MMPs presentes na MEC, como a plasmina (JOHN; TUSZYNSKI, 2001; NAGASE; WOESSNER JUNIOR, 1999; STERNLICHT; WERB, 2001).

Não apenas agentes solúveis, mas, também, interações célula-célula e célula-matriz são fatores determinantes da expressão gênica das MMPs. Assim, a adesão de integrinas, expressas na superfície celular, a moléculas da MEC está associada com a indução de eventos sinalizadores que conduzem à produção das MMPs por vários tipos de células. Esta indução parece ser específica e o tipo de MMP gerada depende do tipo celular e do componente da MEC envolvidos na interação (BORKAKOTI, 2000; HAAS; MADRI, 1999; NAGASE; WOESSNER JUNIOR, 1999; STERNLICHT; WERB, 2001). Por exemplo, a produção de MMP-2 e MT1-MMP por células endoteliais ocorre pela interação destas células com o colágeno tipo I, mas não com a laminina (HAAS; DAVIS; MADRI, 1998).

A regulação da expressão gênica e atividade proteolítica das MMPs pode se dar pela interação entre fatores de transcrição, proteínas co-ativadoras e co-repressoras com os elementos *cis*-ativos na região promotora dos genes das MMPs. Acredita-se que um mecanismo pelo qual a transcrição gênica é mediada seja dependente da via PGE<sub>2</sub>, além de outras múltiplas vias (STERNLICHT; WERB, 2001).

Apesar dos diversos estudos direcionados à compreensão da ativação transcricional das MMPs, este processo permanece incompletamente elucidado. Os fatores estimulatórios supracitados são capazes de determinar padrões variados de expressão das MMPs em diferentes tipos teciduais, bem como, efeitos diversos em membros distintos da família das MMPs, dificultando a compreensão da regulação gênica das MMPs em condições fisiológicas e patológicas. Por exemplo, enquanto o TGF- $\beta$  induz a expressão da MMP-13, suprime a transcrição dos genes da MMP-1 e MMP-3 (STERNLICHT; WERB, 2001).

A regulação pós-transcricional também tem sido documentada. Elementos bioativos como citocinas, fatores de crescimento e hormônios possuem a capacidade de modular a estabilidade do *RNA*m transcrito das MMPs, tornando-o, por conseguinte, estabilizado ou desestabilizado. Por exemplo, os *RNA*m transcritos que codificam a MMP-1 e a MMP-3 são estabilizados pelo éster forbol

e EGF, ao passo que os transcritos da MMP-13 são estabilizados pelo PDGF e glucocorticóides, sendo desestabilizados pelo TGF- $\beta$  (STERNLICHT; WERB, 2001).

Uma série de fatores pode ter efeito inibitório sobre a síntese das MMPs, como os retinóides, indometacina, IL-4, hormônios da tireóide, glucocorticóides, progesterona e androgênios. Todos estes agentes se ligam a membros da subfamília de receptores nucleares, os quais controlam a expressão gênica por meio de diferentes mecanismos (BORKAKOTI, 2000; STERNLICHT; WERB, 2001).

A despeito dos inibidores supracitados, a atividade das MMPs é controlada por um delicado balanço entre sua expressão e síntese e seus principais inibidores endógenos, os TIMPs (do inglês *tissues inhibitors of metalloproteinases*). Nos mamíferos, os TIMPs são moléculas constituídas por dois domínios, sendo um deles o N-terminal, com cerca de 125 aminoácidos, o qual é responsável pela atividade inibitória das MMPs através de interações complexas com o conservado sítio ligante de zinco das MMPs ativas. O outro é o domínio C-terminal, menor em extensão, formado por aproximadamente 65 resíduos de aminoácidos, que interage com o pró-peptídeo do zimogênio. Atualmente, são descritos quatro tipos de TIMPs nos seres vertebrados (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4) e todas as MMP-s podem ser inibidas por eles (BAKER; EDWARDS; MURPHY, 2002; BORKAKOTI, 2000; BODE; FERNANDEZ-CATALAN; TSCHESCHE, 1999; BREW; DINAKARPANDIAN; NAGASE, 2000; NAGASE; WOESSNER JUNIOR, 1999; VERSTAPPEN; HOFF, 2006; VISSE; NAGASE, 2003).

Todos os quatro tipos de TIMPs inibem a atividade das MMPs atualmente estudadas, contudo diferem quanto à sua habilidade de inibição. Por exemplo, enquanto os TIMP-2 e TIMP-3 inibem a MT1-MMP, o TIMP-1 demonstra-se como fraco inibidor das MT-MMPs e da MMP-19. O TIMP-3 é mais potente que os outros TIMPs em inibir a MMP-9. Para inibir a atividade de MMP-2, o TIMP-2 possui efetividade cerca de 10 vezes maior em relação ao TIMP-1 (BAKER; EDWARDS; MURPHY, 2002; BREW; DINAKARPANDIAN; NAGASE, 2000; SOUZA; LINE, 2002; STERNLICHT; WERB, 2001).

Apesar dos TIMPs serem os maiores inibidores das MMPs, este não é o seu único efeito biológico pois algumas destas proteínas também induzem alterações na morfologia celular, estimulam o crescimento de vários tipos de células, estão envolvidas no desenvolvimento de células germinativas, têm efeito na angiogênese

e regulam a apoptose (BAKER; EDWARDS; MURPHY, 2002; BREW; DINAKARPANDIAN; NAGASE, 2000; NAGASE; WOESSNER JUNIOR, 1999; VERSTAPPEN; HOFF, 2006; VISSE; NAGASE, 2003).

O equilíbrio entre a síntese de MMPs e TIMPs representa um ponto crítico na manutenção da homeostasia da MEC, já que diversos processos patológicos revelam taxas alteradas na síntese destes complexos enzimáticos e de seus respectivos inibidores. A quebra deste equilíbrio pode resultar em doenças que estão associadas com um *turnover* desregulado da matriz, como artrite, câncer, doenças cardiovasculares, nefrite, desordens neurológicas, ulcerações, fibrose e fendas labiais e palatinas (BODE; FERNANDEZ-CATALAN; TSCHESCHE, 1999; BREW; DINAKARPANDIAN; NAGASE, 2000; TURPEENNIEMI-HUJANEN, 2005; VERSTAPPEN; HOFF, 2006).

Nas neoplasias o aumento da expressão das MMPs está associado ao crescimento invasivo e potencial metastático (CURRAN; MURRAY, 2000; FODA; ZUCKER, 2001; IKEBE et al., 1999; POLETTE et al., 2004; RUNDHAUG, 2003; SCHMALFELDT et al., 2001; ZHANG et al., 2006; ZHENG et al., 2006).

Estas proteases também são as principais responsáveis pelo dano ao tecido conjuntivo durante uma agressão microbiana, como ocorre na cárie dental, periodontite, lesões pulpares e periapicais (CHANG et al., 2002; CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; KUBOTA et al., 2000; LIN et al., 2002; NAKATA et al., 2000; O'BOSKEY; PANAGAKOS, 1998; SHIN et al., 2002; SILVEIRA et al., 2007; SOARES et al., 2007; TERONEN et al., 1995b). Também estão associadas a outras enfermidades orais, tais como vários tipos de carcinomas, ameloblastomas e tumores de glândulas salivares (PINHEIRO et al., 2004; SORSA; TJÄDERHANE et al., 1998; TSAI et al., 2003; TSAI et al., 2005; VICENTE et al., 2005).

Destarte, o nível de expressão constitutivo dos genes das MMPs em seres humanos é normalmente baixo, sendo tais genes expressos em várias situações fisiológicas como organogênese e remodelagem de feridas, nas quais desempenham importantes funções na regulação da comunicação celular, processamento de moléculas e liberação de componentes bioativos, como receptores de superfície celular, citocinas, hormônios, moléculas de adesão e fatores de crescimento. Participam, também, do processo de neoformação de vasos sanguíneos (angiogênese), um evento necessário em processos como a embriogênese, reparo e patológicos (FODA; ZUCKER, 2001; HAAS; MADRI,

1999; RUNDHAUG, 2003; SORSA; STERNLICHT; WERB, 2001).

### 2.5.2 MMPs e angiogênese

Sabe-se que o processo de crescimento de novos vasos sangüíneos envolve interações entre células endoteliais e as células adjacentes e/ou com componentes da membrana basal. Vários modelos de estudo *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que a atividade das MMPs é essencial para a neoformação vascular, já que estas proteases podem clivar componentes da membrana basal e moléculas da matriz intersticial e que inibidores naturais ou sintéticos da atividade das MMPs diminuem ou até mesmo inibem a neoformação vascular (BELLON; MARTINY; ROBINET, 2004; GUEDEZ et al., 2001; HAAS; DAVIS; MADRI, 1998; HAAS et al., 2000; HAAS; MADRI, 1999; HAJITOU et al., 2001; MOSES, 1997; RUNDHAUG, 2003).

Por exemplo, Guedez et al. (2001) demonstraram que a atividade do TIMP-1 em lesões tumorais determinou diminuição dos vasos sangüíneos em 50% e da migração endotelial em 60%. Assim, estes autores relacionaram a regressão tumoral promovida pelo TIMP-1 à alteração da resposta angiogênica essencial para o crescimento do tumor e não à supressão do crescimento celular. Fang et al. (2000), em estudo *in vivo* e *in vitro* da angiogênese em nódulos de condrosarcoma e de sua invasão tumoral, demonstraram que a supressão das MMPs por inibidores específicos resultou em perda do potencial angiogênico, inibindo a transição do estágio avascular para o vascular durante o desenvolvimento do tumor com subsequente inibição do crescimento tumoral em aproximadamente 70%.

Avaliando o papel dos inibidores das MMPs no processo de neoformação vascular, Hajitou et al. (2001) evidenciaram inibição da angiogênese pelo TIMP-2 em carcinoma mamário. Os autores relataram que a super-expressão do TIMP-2 resultou em diminuição da expressão do VEGF, redução do suprimento sangüíneo, diminuição do tamanho dos vasos e da densidade vascular, além de ausência de dilatação vascular. Haas, Davis e Madri (1998) mostraram que em cultura de células endoteliais de camundongos numa matriz tridimensional de colágeno tipo I, ocorreu formação de estruturas tubulares em resposta ao aumento da expressão de algumas MMPs (MMP-2 e MT1-MMP), enquanto que inibidores específicos destas proteases

(marimastat ou batimastat) bloquearam a atividade das MMPs e determinaram fracasso na migração celular e formação de estruturas tubulares. Corroboram estes resultados o estudo de Haas et al. (2000) no qual a inibição da atividade da MMP-2, assim como a da MT1-MMP, não só preveniu o crescimento de novos capilares como também estava relacionada com a diminuição significativa no número de capilares que apresentavam ruptura na membrana basal, a qual é essencial para a migração das células endoteliais angiogênicas.

Outros estudos que avaliaram a angiogênese em modelos animais cuja expressão das MMPs foi geneticamente bloqueada corroboraram estas evidências, pois demonstraram neovascularização significativamente inferior em camundongos que não expressavam as MMPs, representada por menor quantidade de vasos sanguíneos (69% a menos) (ITOH et al., 1998) e padrão anormal de crescimento esquelético devido ao atraso na secreção do ativador angiogênico e no início da vascularização na cartilagem (VU et al., 1998).

As MMPs podem contribuir com a angiogênese de várias maneiras: liberando fatores angiogênicos seqüestrados na MEC, facilitando a migração das células endoteliais pelos tecidos adjacentes através da interrupção das barreiras físicas da MEC e permitindo que os brotamentos vasculares se formem devido à degradação da membrana basal de vasos sanguíneos (HAAS et al., 2000; KENAGY et al., 1997; PEPPER, 2001; RUNDHAUG, 2003; STERNLICHT; WERB, 2001; VALABLE et al., 2005; ZHANG et al., 2006). As MMPs também podem participar da angiogênese regulando-a negativamente através da geração de fragmentos proteolíticos da MEC com atividade anti-angiogênica (FODA; ZUCKER, 2001; PEPPER, 2001; STERNLICHT; WERB, 2001).

As condições patológicas que requerem angiogênese são acompanhadas de intensa degradação e remodelação da MEC promovida pela atividade das MMPs. Esta proteólise culmina em ativação de formas latentes de TGF- $\beta$  e liberação de FGFb e VEGF, produzidos pelas células ativadas pelo estímulo angiogênico, que estavam seqüestrados na MEC. Estes fatores angiogênicos induzem alterações nas células endoteliais, as quais aumentam a expressão dos fatores transcricionais Egr-1 (do inglês *early growth response factor 1*) e ETS-1 (do inglês *v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*), de algumas MMPs (MT1-MMP, MMP-1, MMP-3 e MMP-9), de subunidades de integrinas ( $\beta_3$ ) e de receptores, como os CD40. O reconhecimento destes receptores pelas células T abundantes em processos

inflamatórios crônicos determina aumento da ativação da MMP-2, indução à síntese e secreção da MMP-9 e aumento da expressão da MMP-1 e MMP-3 intersticiais (HAAS et al., 1999; HAAS; MADRI, 1999; ODA et al., 1999).

Assim, os níveis dos fatores angiogênicos (VEGF, FGF e TGF- $\beta$ ) possuem relação com regulação da expressão de algumas MMPs e de seus inibidores. Tanto o VEGF quanto o FGFb ocasionam aumento da secreção das MMPs. Enquanto o VEGF ocasiona aumento considerável da expressão das MMP-1, MMP-2 e MMP-9 e, menos proeminente, da MMP-3 pelas células endoteliais (BELOTTI et al., 2003; LAMOREAUX et al., 1998; LEE et al., 2007; VALABLE et al., 2005; WANG; KEISER, 1998; ZHANG et al., 2006; ZHENG et al., 2006; ZUCKER et al., 1998) e diminui os níveis de TIMP-1 e TIMP-2 (LAMOREAUX et al., 1998; ZUCKER et al., 1998), o FGFb promove aumento das MMP-2 e MMP-9 por estas células (KENAGY et al., 1997; MOHAN et al., 2000).

A fibrina insolúvel presente na MEC é uma das barreiras que as células endoteliais angiogênicas devem romper durante a formação do novo vaso sanguíneo. Apesar da fibrinólise fisiológica ser atribuída ao sistema plasmina ativador de plasminogênio, o papel fibrinolítico durante a angiogênese é assumido pelas MMPs secretadas pelas células endoteliais. Assim, a invasão das células endoteliais pela matriz de fibrina ocorre de maneira plasmino-independente (HIRAOKA et al., 1998; MONTESANO et al., 1990).

Neste contexto, as MT-MMPs desempenham um papel crítico na angiogênese em virtude da sua atividade fibrinolítica. A MT1-MMP é uma potente fibrinolisa e permite que as células endoteliais penetrem nos géis de fibrina e formem as estruturas tubulares. Esta invasão e tubulogênese são bloqueadas pelos inibidores naturais e sintéticos da MT1-MMP. Sem dúvida, as MT-MMPs desempenham papel similar em permitir que as células endoteliais também atravessem outras barreiras da MEC (STERNLICHT; WERB, 2001). Também desempenham esta atividade as MMP-2, MMP-9, MMP-3, MMP-10, MMP-11 e as matrilisinas (FODA; ZUCKER, 2001; HIRAOKA et al., 1998).

Além disso, para que as células endoteliais angiogênicas migrem através da MEC, é importante a interação das integrinas por elas expressas com componentes desta matriz. A integrina  $\alpha_v\beta_3$  reconhece, se liga e estabelece interações adesivas com sítios específicos de diversas proteínas da MEC, incluindo a fibronectina, vitronectina, laminina, colágenos tipo I e IV, fibrinogênio e colágeno desnaturado.

Contudo, alguns componentes, como o colágeno nativo, possuem sítios de reconhecimento inacessíveis às integrinas, os quais são disponibilizados pela clivagem do colágeno promovida pelas MMPs, o que contribui para a migração celular endotelial mediada pela  $\alpha_v\beta_3$  através da MEC proteolizada (BROOKS et al., 1996; ELICEIRI; CHERESH, 1999; FODA; STERNLICHT; WERB, 2001; ZUCKER, 2001).

Para tanto, ocorre uma interação coordenada entre a MMP-2 com a integrina  $\alpha_v\beta_3$ , o que facilita a invasão vascular, uma vez que esta ligação localiza a MMP-2 na parede dos vasos sanguíneos angiogênicos, permitindo, assim, que as células endoteliais degradem e remodelam a MEC durante sua migração. Por outro lado, a supressão da ligação MMP-2/integrina  $\alpha_v\beta_3$  promove efeito anti-angiogênico (BROOKS et al., 1996; ELICEIRI; CHERESH, 1999; FODA; ZUCKER, 2001; SILLETTI et al., 2001; STERNLICHT; WERB, 2001).

De fato, a ligação da MMP-2 à integrina  $\alpha_v\beta_3$  é de fundamental importância para estabelecimento da angiogênese. Brooks et al. (1998) demonstraram que um fragmento da MMP-2 que contém o domínio hemopexina C-terminal, denominado PEX, pode atenuar significativamente a angiogênese, uma vez que este fragmento compete com a MMP-2 pela integrina  $\alpha_v\beta_3$  na membrana celular, e sua ligação com esta integrina impede a ligação da MMP-2 e ativa e bloqueia a atividade proteolítica na superfície da membrana. Corroborando esta evidência, Pfeifer et al. (2000) relataram que o PEX suprimiu a invasão endotelial e formação de estrutura capilar *in vitro*, além de bloquear a ativação da MMP-2 e angiogênese mediada pelo FGFb *in vivo*.

A participação das gelatinases, tanto a MMP-2 quanto a MMP-9, na angiogênese é de fundamental importância. A ativação dos fatores de transcrição AP-1 e NF- $\kappa$ B presentes nos genes promotores das gelatinases induz à resposta angiogênica destas enzimas determinando a mudança para um fenótipo angiogênico das células endoteliais quiescentes, provavelmente por um mecanismo que envolve a ativação de fatores angiogênicos, como, por exemplo, o VEGF. Além disso, as gelatinases favorecem os brotamentos capilares e migração endotelial devido a sua habilidade de degradação do colágeno tipo IV e laminina presentes nas membranas basais endoteliais (BELLON; MARTINY; ROBINET, 2004; BELOTTI et al., 2003; FANG et al., 2000; FODA; ZUCKER, 2001; HAAS et al., 2000; MACH et al., 1998;

MOHAN et al., 2000; NGUYEN; ARKELL; JACKSON, 2001).

Conforme comentado anteriormente, as MMPs podem, também, regular negativamente a angiogênese por gerar, durante a fase de resolução, fragmentos proteolíticos da MEC com atividade anti-angiogênica, como a angiostatina, a endostatina e a tumstatina. A angiostatina é um produto N-terminal da quebra do plasminogênio que pode ser gerado pelas MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, e MMP-12. A endostatina é um fragmento protéico anti-angiogênico da porção C-terminal do colágeno tipo XVIII que pode ser gerado pelas MMP-3, MMP-9, MMP-12, MMP-13 e MMP-20, enquanto que a tumstatina é um peptídeo aminoácido da cadeia 3 do colágeno tipo IV gerado pela MMP-2 e MMP-9 (BELLON; MARTINY; ROBINET, 2004; CORNELIUS et al., 1998; DANTAS, 2000b; LIJNEN et al., 1998; O'REILLY et al., 1999; PATTERSON; SANG, 1997; PEPPER, 2001; STERNLICHT; WERB, 2001).

Alguns destes inibidores angiogênicos atuam por meio da regulação das gelatinases. A endostatina, por exemplo, liga-se à pró-MMP-2, formando um complexo estável, bloqueando a ativação da pró-MMP-2 pela MT1-MMP, além de inibir a atividade catalítica da MMP-2 e MT1-MMP (KIM et al., 2000). As trombospondinas 1 e 2 podem se ligar especificamente à MMP-2 e à MMP-9 através da ligação de seus domínios protéicos TS1 e TS2 aos domínios fibronectina tipo II das gelatinases e suprimir a ativação da pró-MMP-2 pela trombina e da pró-MMP-9 pela MMP-3, interferindo na atividade destas enzimas na angiogênese. O TS2 liga-se tanto à MMP-2 latente quanto à ativa (BEIN, SIMONS, 2000; YANG; STRICKLAND; BORNSTEIN, 2001).

As MMPs podem, ainda, exercer efeito inibitório sobre a angiogênese de outras maneiras. O próprio domínio hemopexina livre da MMP-9 pode agir como um inibidor angiogênico. Além disso, a MMP-2 pode gerar, pela clivagem do receptor 1 de superfície do FGFb, uma proteína ligante circulante e matriz associada que pode modular o potente efeito angiogênico do FGFb alterando sua disponibilidade e diminuindo sua capacidade de resposta (BROOKS et al., 1996; LEVI et al., 1996). Adicionalmente, como consequência da clivagem de fragmentos de fibronectina pela MMP-2 ocorre exposição de um sítio com atividade de anti-adesividade celular que inibe o crescimento de células endoteliais (LABAT-ROBERT, 2004).

### 2.5.3 MMP-9

A MMP-9 é uma enzima pertencente ao grupo das gelatinases, que recebe esta denominação em função da sua capacidade de degradar colágeno desnaturado (gelatina). Além da MMP-9, também denominada gelatinase B, faz parte deste grupo a MMP-2 ou gelatinase A (STERNLICHT; WERB, 2001).

Em termos gerais, as gelatinases possuem especificidades de substrato semelhantes, como colágenos tipo IV e V, gelatinas e elastina, entre outros constituintes da MEC. A principal diferença observada entre a MMP-2 e a MMP-9, com relação ao substrato, constitui-se na capacidade da primeira em degradar colágeno fibrilar tipo I (AIMES; QUIGLEY, 1995; BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005; XU et al., 2005).

A partir de uma perspectiva de localização espacial, determinada por características estruturais, a presença de sítios de ligação às gelatinas (três módulos de fibronectina tipo II incorporados) na MMP-9, confere a esta enzima aspecto singular entre as formas secretadas de MMPs. Os domínios de ligação às gelatinas determinam alta afinidade de interação com o colágeno extracelular, favorecendo sua permanência em associação à MEC, a qual, por sua vez, atua como fonte de reserva destas pró-enzimas (FRIDMAN et al., 2003).

Uma comparação estrutural entre a MMP-9 e as demais MMPs demonstra que a gelatinase B se desenvolveu, durante sua evolução, numa MMP especializada, sendo a MMP mais complexa atualmente identificada. Além do domínio adicional de fibronectina presente somente nas gelatinases, a MMP-9 possui um domínio adicional, não evidenciado na MMP-2, denominado de domínio semelhante ao colágeno tipo V, altamente glicosilado, localizado espacialmente entre o domínio de ligação ao zinco e o domínio hemopexina C-terminal. Esta glicosilação característica da MMP-9 é constituída por diversos oligossacarídeos volumosos e altamente móveis (BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005; MATTU et al., 2000; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN; VAN DAMME, 2001).

Apesar do significado biológico deste domínio adicional permanecer incompletamente compreendido, funcionalmente, sugere-se que esta glicosilação possa ser responsável pela proteção de áreas específicas contra clivagem proteolítica, pela estabilização da enzima, impondo conformações específicas para

determinados domínios, bem como, pelo direcionamento da enzima através de interações com a MEC ou receptores de superfície celular (MATTU et al., 2000; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN; VAN DAMME, 2001).

A MMP-9 possui expressão altamente regulada, não sendo sintetizada constitutivamente como a MMP-2, mas induzida por um acionamento adequado. Neste contexto, a associação de linfócitos a monócitos é um potente estímulo para a indução da expressão desta enzima, assim como a IL-1, o TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , lectinas, endotoxinas e interação com integrinas. Mediante indução, a MMP-9 é expressa principalmente por células inflamatórias (linfócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos) e em menor intensidade por células do tecido conjuntivo (células endoteliais, fibroblastos e osteoblastos) e epiteliais. Por outro lado, a produção da MMP-9 é negativamente regulada pela IL-4, IL-10 e interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) (MATTU et al., 2000, OPDENAKKER; VAN DEN STEEN; VAN DAMME, 2001; XU et al., 2005).

Como as demais MMPs, a MMP-9 é secretada em sua forma zimogênica inativa. Destarte, para sua função enzimática é necessária a alteração entre o grupamento sulfidrila-cisteína, presente no domínio pró-peptídico e o íon zinco, associado ao domínio catalítico, a qual pode ser desencadeada através de mecanismos proteolíticos ou não-proteolíticos (BANNIKOV et al., 2002; FRIDMAN et al., 2003; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN; VAN DAMME, 2001; STERNLICHT; WERB, 2001).

Diversas proteases estão implicadas na ativação da MMP-9, dentre as quais merecem destaque as MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-13 e MMP-26. Dentre estas, a MMP-3 apresenta-se como uma das ativadoras mais efetivas da MMP-9 (BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005; FRIDMAN et al., 2003; MOOK; FREDERIKS; VAN NOORDEN, 2004; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN; VAN DAMME, 2001).

A plasmina gerada a partir da ativação do plasminogênio ativa a pró-MMP-3 e esta enzima ativada é capaz de ativar a pró-MMP-9, o que ocorre em duas etapas. Na etapa inicial, a MMP-3 hidrolisa a cadeia polipeptídica da MMP-9. Por sua vez, o segundo sítio de hidrólise encontra-se inacessível, requerendo a presença de alterações na estrutura secundária, ao redor do sítio de ativação, anteriores ao acoplamento ao sítio ativo da MMP-3 (FRIDMAN et al., 2003).

O processo de ativação da pró-enzima MMP-9 pelas MMPs se dá como

resultado de uma cascata iniciada na superfície celular pela de MT1-MMP, em decorrência desta forma de MMP associada à membrana celular ativar a pró-MMP-2 e, estas duas proteases, serem capazes de ativar pró-MMP-13. O somatório da atividade destas proteases na superfície celular pode acompanhar a degradação eficiente do colágeno intersticial, que é iniciado pela ação colagenolítica da MT1-MMP e MMP-13 e seguida pela atividade gelatinolítica das MMP-2 e MMP-9 (FRIDMAN et al., 2003; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN; VAN DAMME, 2001).

Dentre os mecanismos não-proteolíticos de ativação da MMP-9, destaca-se a modificação oxidativa das cadeias laterais dos resíduos de cisteína, o que resulta em diminuição de sua habilidade em estabelecer ligações efetivas ao íon catalítico zinco (BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005), bem como, alterações conformacionais induzidas por ligações ao substrato (gelatina e colágeno tipo IV) (BANNIKOV et al., 2002). Estes processos podem resultar na atividade enzimática sem clivagem do domínio inibitório pró-peptídeo. Entretanto, há dúvidas a respeito da eficiência deste processo de ativação não-proteolítico, mesmo sendo evidenciada a presença de formas ativas de MMP-9 contendo o domínio pró-peptídico (FRIDMAN et al., 2003).

Alguns tipos de leucócitos podem ativar quimicamente a MMP-9, removendo o grupamento sulfidril-cisteína no pró-domínio. Por exemplo, neutrófilos ativados produzem quantidades consideráveis de ácido hipocloroso, o qual ativa a pró-MMP-9 (OPDENAKKER; VAN DEN STEEN; VAN DAMME, 2001).

Além destes fatores indutores, tem sido demonstrado que fatores angiogênicos determinam aumento da expressão da MMP-9 (HOLBORN et al., 2007; LEE et al., 2007; VALABLE et al., 2005; WANG; KEISER, 1998; ZHENG et al., 2006). Na verdade, há um *feedback* positivo entre a MMP-9 e o VEGF em condições de hipóxia. O VEGF induz à expressão gênica da MMP-9 por meio de uma sinalização autócrina e, da mesma forma, a MMP-9 determina aumento da expressão do VEGF (HOLBORN et al., 2007).

A MMP-9 é regulada tanto em nível transcricional quanto extracelular. A região promotora do gene que codifica a MMP-9 exhibe sítios de ligação para diversos fatores de transcrição, sendo comumente descritos na literatura a proteína ativadora 1 (AP-1, do inglês *activator protein 1*), proteína ativadora 2 (AP-2, do inglês *activator protein 2*), o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, do inglês *nuclear factor-kappa B*), a proteína estimuladora 1 (SP-1, do inglês *stimulatory protein 1*), o elemento responsivo pelo estímulo de interferon (ISRE, do inglês *interferon-stimulated*

*response element*), o fator inibitório do fator de crescimento transformante  $\beta$  (TIE- $\beta$ , do inglês *transforming growth factor  $\beta$ -inhibitory element*), o elemento responsivo do fator-1 de diferenciação de ceratinócitos (KRE-M9, do inglês *keratinocyte differentiation factor-1 responsible element-M9*) e a proteína de importação nuclear (NIP, do inglês *nuclear importin protein*) (MOOK; FREDERIKS; VAN NOORDEN, 2004; SANCÉAU et al., 2002).

Podem ser constatados efeitos opostos na expressão de MMP-9, mediados através da ligação a um mesmo sítio na região promotora, dependendo do tipo de proteína de ligação ativada. Contudo, de uma forma geral, NF- $\kappa$ B, AP-1 E SP-1 estimulam a transcrição de MMP-9 através da via de sinalização do TNF $\alpha$ , ao passo que os interferons inibem a transcrição desta MMP, através do fator regulador do interferon (IRF, do inglês *interferon regulatory factor*), o qual compete com NF- $\kappa$ B (SANCÉAU et al., 2002).

Há uma possível associação funcional entre as integrinas e a MMP-9. Sinais mediados pela ligação de integrinas a determinados constituintes da MEC e células nela presentes são reguladores da MMP-9, ativando esta enzima, consubstanciando a gelatinólise efetiva no espaço pericelular e favorecendo, assim, o processo de invasão celular local. As integrinas também são necessárias para a expressão da pró-MMP-9 na superfície celular. Esta pró-enzima forma complexos com as integrinas no interior das células para serem transportadas à superfície celular (BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005; DERYUGINA et al., 2001; ROLLI et al., 2003; STERNLICHT; WERB, 2001). Adicionalmente, as integrinas, especificamente a integrina  $\alpha_v\beta_3$ , contribuem para a maturação da MMP-9 após sua ativação, apesar deste mecanismo ser ainda desconhecido (BROOKS et al., 1996; DERYUGINA et al., 2001; ROLLI et al., 2003).

A expressão da MMP-9 pode ser regulada por inibidores fisiológicos, os quais incluem  $\alpha$ 2-macroglobulina, TIMPs, principalmente o TIMP-1 que possui alta afinidade com esta protease, alguns fatores anti-angiogênicos, como a endostatina e trombospondina, e inibidores sintéticos, como carboxilatos, tetraciclina, derivados do ácido fosfórico, bifosfonatos e outros (BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005).

A MMP-9 atua em grande variedade de condições fisiológicas, tais como processos invasivos durante a reprodução, crescimento e desenvolvimento, angiogênese e reparo, além de controlarem a apoptose. O aumento da atividade da

MMP-9 é observado, também, em condições patológicas como tumores, inflamação, doenças infecciosas, degenerativas e vasculares (BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005; LEE et al., 2007; TSAI et al., 2003; VICENTE et al., 2005). Esta enzima também tem sido implicada em enfermidades orais tais como cárie (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; TJÄDERHANE et al., 1998), pulpite (CHANG et al., 2002; O'BOSKEY; PANAGAKOS, 1998; TSAI et al., 2005), lesões periapicais (KUBOTA et al., 2000; SILVEIRA et al., 2007; SOARES et al., 2007; TERONEN et al., 1995b), doenças periodontais e perimplantares (SOUZA; LINE, 2002) e tumores (PINHEIRO et al., 2004; TSAI et al., 2003; VICENTE et al., 2005).

Esta enzima também participa de reações imunológicas específicas, como, por exemplo, a interação entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos. Esta interação célula-célula conduz à expressão de MMP-9 que, por sua vez, altera os peptídeos antígenos para apresentação pelas moléculas MHC de classe II auxiliando no processamento de citocinas, quimiocinas e, possivelmente, de receptores. Adicionalmente, a MMP-9 é utilizada pelas células *natural killer* ativadas para cruzar as membranas basais e, assim, desempenhar sua função imunológica (OPDENAKKER; VAN DEN STEEN; VAN DAMME, 2001).

#### 2.5.3.1 MMP-9 e angiogênese

A participação da MMP-9 na angiogênese é de extrema importância, uma vez que esta protease tem como substrato o colágeno tipo IV e a laminina, componentes da membrana basal de vasos sanguíneos. Assim, promove a degradação necessária ao brotamento vascular induzido pelos fatores angiogênicos (ASAHI et al., 2001; KENAGY et al., 1997; LEE et al., 2007; VALABLE et al., 2005; WANG; KEISER, 1998).

Em modelo de estudo animal, Asahi et al. (2001) e Valable et al. (2005) verificaram que após episódio isquêmico, os níveis de MMP-9 aumentaram significativamente, promovendo degradação proteolítica da barreira hematoencefálica, formada por células endoteliais não fenestradas, firmemente unidas nos capilares cerebrais. Neste aspecto, Lee et al. (2007) relataram hemorragia intracerebral *in vivo*, associada ao aumento da expressão da MMP-9

induzido pelo VEGF.

Diversos estudos têm demonstrado efetivo aumento da expressão da MMP-9 em condições que requerem neoformação vascular, tais como lesões vasculares e tumorais e a grande evidência da associação da MMP-9 no processo de angiogênese encontra-se nos estudos que demonstraram que o bloqueio de sua atividade por seus inibidores seletivos naturais ou sintéticos determina inibição da migração celular endotelial (BERGERS et al., 2000; BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005; FODA; ZUCKER, 2001; IURLARO et al., 1999; KENAGY et al., 1997; KOIVUNEN et al., 1999; LEE et al., 2007; VU et al., 1998; ZHENG et al., 2006).

Neste contexto, Bergers et al. (2000) evidenciaram que a MMP-9, assim como a MMP-2, tem sua expressão aumentada em células endoteliais angiogênicas presentes durante a carcinogênese induzida em camundongos. Estes autores destacaram a MMP-9 como um componente funcional indispensável à mudança para um fenótipo angiogênico, pois somente esta gelatinase foi capaz de induzir atividade angiogênica em células endoteliais quiescentes por aumentar a disponibilidade do VEGF, o que não ocorreu com o aumento da expressão da MMP-2. Além disso, verificaram que inibidores específicos da MMP-9 bloquearam a angiogênese inicial por ela estimulada e, assim, sugeriram que a MMP-9 atua na indução do fenótipo angiogênico e crescimento tumoral enquanto a MMP-2 atua somente neste último evento.

Avaliando o papel dos inibidores das gelatinases, Kenagy et al. (1997) e Koivunen et al. (1999) demonstraram que inibidores sintéticos específicos da MMP-9 influenciaram negativamente a angiogênese suprimindo a migração de células endoteliais *in vitro*. Corroborando estes achados, Lee et al. (2007) relataram que a hemorragia intracerebral *in vivo*, associada ao aumento da expressão da MMP-9 induzido pelo VEGF, foi atenuada pela supressão da MMP-9 por inibidores sintéticos (minociclina ou pirrolidina ditiocarbamato).

Outros estudos que avaliaram a angiogênese em modelos animais cuja expressão das gelatinases foi geneticamente bloqueada corroboraram estas evidências. Em camundongos MMP-9-deficientes, Vu et al. (1998) observaram padrão anormal de crescimento esquelético, com retardo na ocorrência de apoptose nos condrócitos e na ossificação da cartilagem devido ao atraso na secreção do ativador angiogênico e no início da vascularização na cartilagem, além de remodelação defeituosa da MEC. Asahi et al. (2001) verificaram reduzida

degradação e ruptura da barreira hematoencefálica em camundongos MMP-9 deficientes após episódio isquêmico.

No tocante à relação da MMP-9 com os fatores angiogênicos, tem sido relatado um *feedback* positivo principalmente entre a MMP-9 e o VEGF. O VEGF ativa o gene promotor da MMP-9 e esta aumenta a expressão do VEGF pela estimulação da sua transcrição gênica e secreção (BERGERS et al., 2000; BELOTTI et al., 2003; HOLBORN et al., 2007; LEE et al., 2007; VALABLE et al., 2005; WANG; KEISER, 1998). Adicionalmente, ao realizar a proteólise da MEC, a MMP-9 libera VEGF e ativa TGF- $\beta$  estocados na MEC, favorecendo a angiogênese (BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005; STERNLICHT; WERB, 2001; YU; STAMENKOVIC, 2000).

A clivagem proteolítica do colágeno tipo IV, o principal componente da membrana basal vascular, pela MMP-9 desempenha um importante papel funcional na angiogênese. Esta clivagem culmina em exposição de um sítio crítico presente no colágeno tipo IV desnaturado (HUIV26), o qual somente é evidenciado em vasos sangüíneos em proliferação, mas não em vasos sangüíneos quiescentes. A ligação deste epítipo específico exposto à integrina  $\alpha_v\beta_3$  é essencial para que ocorra a angiogênese *in vivo*, uma vez que seu bloqueio por anticorpos específicos inibe a neoformação vascular. A MMP-9 é eficiente em expor estes epítipos e os inibidores desta MMP reduzem significativamente a exposição destes sítios críticos. Estudos demonstraram que em camundongos MMP-9-deficientes ocorreu redução da exposição destes epítipos em aproximadamente 75%, enquanto que a redução observada em camundongos MMP-2-deficientes foi mínima. Desta maneira, acredita-se que a MMP-9 é a principal responsável pela exposição destes epítipos críticos para o estabelecimento da neovascularização (HANGAI et al., 2002; XU et al., 2001).

A MMP-9 também pode regular negativamente a angiogênese ao realizar a proteólise da MEC, gerando fragmentos proteolíticos com atividade anti-angiogênica, como a angiostatina, a endostatina e a tumstatina (BELLON; MARTINY; ROBINET, 2004; CORNELIUS et al., 1998; DANTAS, 2000b; PATTERSON; SANG, 1997; PEPPER, 2001; STERNLICHT; WERB, 2001).

Alguns fragmentos anti-angiogênicos atuam por meio da MMP-9. A trombospondina, por exemplo, quando liberada em altas doses interfere negativamente na morfogênese celular endotelial através da indução da expressão de excessivos níveis de MMP-9 pelas células endoteliais, resultando em proteólise

descontrolada da MEC que interfere na formação capilar. Contudo, em baixas concentrações de trombospondina observa-se efeito inverso, ocorrendo aumento moderado da expressão da MMP-9 pelas células endoteliais favorecendo a formação tubular endotelial (QIAN et al., 1997).

#### 2.5.4 MMPs e lesões periapicais

A participação das MMPs na patogênese das lesões periapicais tem sido relatada por diversos estudos. Estas proteases atuam ativamente na regulação da proliferação epitelial, na degradação tecidual e nos mecanismos de expansão inerentes destas lesões (KUBOTA et al., 2000; LEONARDI; CALTABIANO; LORETO, 2005; LIN et al., 1997; LIN et al., 2002; SHIN et al., 2002; SILVEIRA et al., 2007; SOARES et al., 2007; TERONEN et al., 1995a, TERONEN et al., 1995b; WAHLGREN et al., 2001; WAHLGREN et al., 2002; WAHLGREN et al., 2003).

Um dos mecanismos pelos quais as MMPs contribuem para a patogênese das lesões periapicais é por meio da regulação da proliferação, maturação e migração do tecido epitelial das lesões císticas (KUBOTA et al., 2000; LEONARDI; CALTABIANO; LORETO, 2005; WAHLGREN et al., 2003).

Neste aspecto, Leonardi, Caltabiano e Loreto (2005) pesquisaram a expressão da MMP-13 em granulomas periapicais sem epitélio e epitelizados. Nos granulomas periapicais sem epitélio, detectaram fraca marcação da MMP-13 em alguns fibroblastos e moderada nos plasmócitos, estando ambos dispersos no tecido de granulação. Entretanto, maior expressão desta enzima foi observada nos granulomas epitelizados, sendo evidente nas células epiteliais, assim como em plasmócitos, macrófagos e fibroblastos. Nas pequenas ilhas e finos cordões epiteliais as células foram fortemente marcadas pelo anticorpo anti-MMP-13, enquanto que os cordões epiteliais mais espessos apresentaram evidente diminuição na expressão da MMP-13. O padrão de imuno-marcação observado para a MMP-13 nestas lesões pareceu estar associado ao estado de migração das células epiteliais. Os autores concluíram que a MMP-13 atua na conversão dos granulomas periapicais em cistos periapicais devido à sua habilidade de influenciar não somente a migração das células epiteliais como também sua invasão no tecido

granulomatoso.

Ao avaliar a participação das MMPs na indução da proliferação epitelial nas lesões periapicais, Wahlgren et al. (2003) inferiram que as MMPs podem desempenhar um papel na remodelação focal e crescimento epitelial nos cistos periapicais, uma vez que estes autores identificaram a expressão das MMP-2, MMP-8 e MMP-13 no revestimento epitelial de cistos odontogênicos, incluindo os cistos periapicais, estando estas proteases mais fortemente expressas nos cistos de desenvolvimento que nos cistos inflamatórios. Kubota et al. (2000) também evidenciaram a presença de formas latentes e ativas da MMP-2, MMP-3 e MMP-9 no fluido de células epiteliais dos cistos periapicais e de outros cistos odontogênicos inflamatórios e de desenvolvimento. Adicionalmente, observaram que a estimulação pela IL-1 $\alpha$  determinou ativação das pró-MMP-2 e pró-MMP-9 através da MMP-3, aumentando a quantidade das MMP-2 e MMP-9 ativas.

Corroborando as evidências da influência das MMPs no crescimento epitelial nas lesões periapicais, Silveira et al. (2007) estudaram a expressão das MMP-2, MMP-9 e MMP-1 tanto no tecido conjuntivo quanto no revestimento epitelial de cistos periapicais e cistos periapicais residuais. No revestimento epitelial dos cistos periapicais todas as MMPs estudadas apresentaram expressão focal, representada por menos de 10% das células marcadas, enquanto que no tecido conjuntivo a expressão foi difusa, com mais de 10% das células marcadas, para a MMP-1 e ausente para a MMP-2 e MMP-9. Já os cistos periapicais residuais apresentaram expressão difusa da MMP-1 e da MMP-2 e focal da MMP-9 no revestimento epitelial, e no tecido conjuntivo expressão focal da MMP-1 e ausência de marcação para a MMP-2 e MMP-9. Esta diferença no padrão de expressão das MMPs observada nos cistos periapicais e cistos periapicais residuais reflete o metabolismo distinto entre as duas lesões.

No tocante à destruição tecidual inerente às lesões periapicais, os estudos têm associado a atividade das MMPs à degradação da MEC periapical (LEONARDI; CALTABIANO; LORETO, 2005; SILVEIRA et al., 2007; TERONEN et al., 1995a; WAHLGREN et al., 2001; WAHLGREN et al., 2002).

Níveis significativos de algumas MMPs, particularmente das gelatinases e das collagenases, têm sido relatados em exsudatos das lesões periapicais. Kubota et al. (2000) evidenciaram a presença de formas latentes e ativas da MMP-2 e da MMP-9 no fluido de cistos periapicais. Adicionalmente, observaram que a estimulação pela

IL-1 $\alpha$  determinou ativação das pró-MMP-2 e pró-MMP-9, aumentando a quantidade das MMP-2 e MMP-9 ativas. Wahlgren et al. (2002) detectaram a expressão da MMP-8 em exsudato e células inflamatórias (leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e plasmócitos) de granulomas periapicais.

Avaliando a atividade colagenolítica nas lesões periapicais, Wahlgren et al. (2001) observaram forte expressão das colagenase 2 e 3 (MMP-8 e MMP-13) nos plasmócitos de granulomas periapicais e de cistos periapicais, sendo a MMP-13 mais freqüentemente observada. Estes autores inferiram que as colagenases podem induzir à produção de proteases por outras células inflamatórias e do tecido conjuntivo, bem como iniciar diretamente a colagenase crítica em lesões óseo-destrutivas periapicais.

A participação das MMPs na degradação tecidual das lesões periapicais também foi evidenciada por Teronen et al. (1995a) ao detectaram a expressão das colagenases 1 e 2 (MMP-1 e MMP-8) na parede cística tanto dos cistos periapicais quanto dos cistos periapicais residuais, havendo tendência à degradação do colágeno tipo I pela MMP-1 mais prontamente que do colágeno tipo II pela MMP-8, o que pode ser devido à ação cooperativa das gelatinases (MMP-2 e MMP-9).

No tocante ao crescimento das lesões periapicias, as MMPs contribuem de forma significativa para este processo, pois atuam na remodelação da cápsula fibrosa e da parede cística e na reabsorção óssea, solubilizando a matriz óssea e regulando o início da reabsorção (DELAISSÉ et al., 2000; LIN et al., 2002; SILVEIRA et al., 2007; TERONEN et al., 1995b; WAHLGREN et al., 2001).

Os mecanismos de expansão das lesões periapicais provavelmente envolvem interações entre as MMPs e seus inibidores, os TIMPs. Para que a reabsorção óssea e crescimento da lesão ocorra é necessário que haja um desequilíbrio entre a expressão das MMPs e dos TIMPs, com um saldo positivo para as MMPs. A presença dos TIMPs pode refletir um mecanismo importante de controle de perda óssea e explicar o crescimento relativamente lento dos cistos periapicais (LIN et al., 1997; LIN et al., 2002; TERONEN et al., 1995b).

Neste aspecto, a MMP-1 tem sido apontada como um importante fator para o processo de reabsorção óssea, atuando de forma direta ou indireta. Ao realizar a proteólise, esta MMP gera fragmentos de colágeno degradado com potencial de ativar os osteoclastos, libera fatores ativadores de osteoclastos presentes na matriz intersticial e degrada o tecido osteóide não-mineralizado presente na superfície

óssea, permitindo acesso dos osteoclastos à fração mineralizada subjacente. Além disso, tem sido sugerido um papel mais direto da MMP-1 no processo osteolítico dos cistos periapicais uma vez que esta enzima também foi detectada em osteoclastos presentes nas lacunas de reabsorção óssea (DELAISSÉ et al., 2000; LIN et al., 1997; LIN et al., 2002).

Em estudo realizado em cistos periapicais, Lin et al. (1997) detectaram a presença de MMP-1 em macrófagos e fibroblastos na camada subepitelial e osteoblastos e osteócitos na margem do trabeculado ósseo e em lacunas de reabsorção na periferia dos cistos periapicais, respectivamente. A expressão da MMP-1 também foi observada nas células endoteliais de alguns pequenos capilares neoformados na parede do tecido conjuntivo fibroso com intenso infiltrado inflamatório. Osteoblastos, osteócitos, células endoteliais, macrófagos e fibroblastos positivos ao TIMP-1 também foram observados nas mesmas áreas nas quais estes tipos celulares sintetizavam MMP-1. Entretanto, o revestimento epitelial não mostrou imunorreatividade ao TIMP-1, exceto em poucos casos que exibiam proeminente inflamação subepitelial.

Lin et al. (2002) estudaram a distribuição espacial e temporal da MMP-1, TIMP-1, IL-6 e COX-2 em lesões periapicais induzidas em ratos. A porcentagem de células expressando estes três mediadores aumentou de maneira tempo-dependente após a indução das lesões. Os macrófagos foram as principais fontes de MMP-1, IL-6 e COX-2. Numa fase mais tardia, a MMP-1 foi detectada também em osteoblastos, os quais, assim como os macrófagos, estavam localizados próximos às áreas de reabsorção óssea, e em osteoclastos situados nas lacunas de Howship. O TIMP-1 foi expresso por osteoblastos de maneira menos significativa que a expressão da MMP-1. Além disso, a porcentagem das células produtoras de TIMP-1 para a MMP-1 diminuiu progressivamente durante a evolução das lesões. A administração de um inibidor da COX-2 reduziu a perda óssea periapical em 43% e também a expressão da MMP-1 e IL-6. Estes resultados demonstram a efetiva participação da MMP-1 e da IL-6 no processo de reabsorção óssea das lesões periapicais e que a COX-2 desempenha um importante papel na patogênese destas lesões modulando indiretamente a expressão da MMP-1 e IL-6.

Além da MMP-1, a participação das MMP-2 e MMP-9 e de seus inibidores no processo de reabsorção óssea das lesões periapicais também foi evidenciada, sendo as gelatinases essenciais na completa degradação do colágeno, atividade

associada à clivagem inicial realizada pela MMP-1 (OKADA et al., 1995). Teronen et al. (1995b) observaram presença da MMP-2 e da MMP-9 tanto na parede quanto no fluido dos cistos periapicais, estando apenas em parte complexadas aos TIMP-1 e TIMP-2, o que sugere sua possível participação na expansão destas lesões.

As gelatinases também se destacam na patogênese das lesões periapicais pela sua capacidade de degradação de componentes da MEC e das membranas basais epiteliais e vasculares, favorecendo a angiogênese necessária para o desenvolvimento e também reparo destas lesões, além de possibilitar o estabelecimento e crescimento das mesmas, conforme já citado (HIRAOKA et al., 1998; KRALING et al., 1999). Contudo, não são encontrados estudos na literatura, envolvendo estas proteases na patogênese de lesões periapicais no que diz respeito à remodelação de membrana basal de vasos sanguíneos durante a angiogênese.

Parece haver correlação entre a sintomatologia relatada pelo paciente e a expressão das MMPs nas doenças pulpares e periapicais, uma vez que os quadros agudos apresentam maior expressão de MMPs que os crônicos. Isto pode ser devido aos elevados níveis de PGE<sub>2</sub>, encontrados nas lesões agudas, a qual potencialmente induz a expressão de enzimas proteolíticas, especialmente MMPs, de inibidores de proteases e de citocinas pelos macrófagos (SHIN et al., 2002).

O estudo de Shin et al. (2002) sobre as MMPs em lesões pulpares e periapicais agudas e crônicas evidenciou maior expressão das MMPs, principalmente da MMP-1, em quadros agudos relacionados à sintomatologia clínica quando comparados a quadros crônicos. Estes autores detectaram concentrações maiores das MMP-1, MMP-2 e MMP-3 nas pulpites agudas, pulpites crônicas e lesões periapicais que na polpa normal. A concentração da MMP-1 foi significativamente maior nas pulpites agudas que nas pulpites crônicas e lesões periapicais. As MMP-1 e MMP-3 foram fortemente expressas nas células do infiltrado neutrofílico, nos macrófagos e na MEC das pulpites agudas, enquanto as células inflamatórias da pulpite crônica foram fracamente marcadas. A MMP-2 foi fracamente expressa nas células inflamatórias e fibroblastos, tanto nas pulpites agudas e crônicas quanto nas lesões periapicais.

O tratamento endodôntico contribui para diminuição das MMPs nas lesões periapicais e a análise da expressão das MMPs no exsudato periapical pode ser útil para indicar a atividade inflamatória e monitorar a efetividade da terapia endodôntica realizada em dentes com lesões periapicais (SOARES et al., 2007; WAHLGREN et

al., 2002).

Abordando a questão do tratamento endodôntico, Wahlgren et al. (2002) evidenciaram significativa diminuição da expressão da MMP-8 no exudato de granulomas periapicais entre a primeira sessão e após tratamento endodôntico realizado com hidróxido de cálcio.

Estudando a expressão das MMP-1, MMP-2 e MMP-9 em cistos periapicais com e sem tratamento endodôntico, Soares et al. (2007) observaram que os cistos periapicais sem tratamento endodôntico apresentaram expressão imunohistoquímica mais forte destas MMPs quando comparados aos cistos periapicais com tratamento. Estes, por sua vez, exibiram maior imunoexpressão da MMP-1, MMP-2 e MMP-9 no revestimento epitelial e da MMP-1 nos fibroblastos e nas células endoteliais que os cistos periapicais sem tratamento. Nos dois tipos de cistos a MMP-2 e a MMP-9 foram fracamente expressas ou estavam ausentes na maioria dos fibroblastos. Já nas células endoteliais, a MMP-9 foi mais fortemente expressa nos cistos com tratamento endodôntico.

Reunindo os dados disponíveis na literatura, pode-se inferir que as MMPs participam da patogênese das lesões periapicais, contribuindo de forma significativa para a destruição tecidual característica destas condições. Utilização de inibidores das MMPs nos canais radiculares e tecidos periapicais pode, deste modo, representar nova oportunidade terapêutica para a Endodontia no futuro próximo (WAHLGREN et al., 2002), assim como tem sido no tratamento de outras enfermidades orais, como nas periodontites (GOLUB et al., 1997; SORSA et al., 1994).

### **3 PROPOSIÇÃO**

O presente experimento tem como objetivo analisar a angiogênese em granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais, por meio de estudo imuno-histoquímico da expressão do VEGF, FvW e MMP-9, com intuito de contribuir para elucidação dos eventos relacionados ao desenvolvimento destas lesões.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO**

O presente trabalho caracterizou-se por um estudo observacional e analítico da expressão imuno-histoquímica do VEGF, FvW e MMP-9 em espécimes de granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais.

### **4.2 POPULAÇÃO**

A população referente ao presente estudo constituiu-se por casos de granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais biopsiados, fixados em formalina a 10% e incluídos em blocos de parafina, pertencentes ao arquivo do Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

### **4.3 AMOSTRA**

Dentre os casos diagnosticados no serviço supracitado, foram selecionados 20 espécimes de granulomas periapicais, 20 espécimes de cistos periapicais e 10 espécimes de cistos periapicais residuais. Para inclusão na amostra da presente pesquisa, foram utilizados critérios histopatológicos e radiográficos, além da quantidade de material biológico presente no material emblocado em parafina.

Em decorrência das dificuldades em se estabelecer parâmetros inquestionáveis para distinguir granulomas epitelizados e cistos radiculares incipientes, foram selecionados apenas espécimes de granulomas periapicais que não apresentavam qualquer remanescente epitelial odontogênico ao exame histopatológico. Por sua vez, para os cistos periapicais e cistos periapicais residuais,

foram utilizados apenas espécimes que apresentavam cavidade patológica evidente, revestida total ou parcialmente por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado.

Foram selecionados apenas os casos de granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais que apresentavam radiografias periapicais anexadas às fichas de requisição de exame anátomo-patológico. Todos os casos de granulomas e cistos periapicais se apresentavam como área radiolúcida, circular ou ovóide, associada ao ápice radicular com perda da lâmina dura. Os cistos periapicais residuais eram representados por área radiolúcida de forma circular ou oval, no interior do processo alveolar no sítio de uma extração prévia.

Além disso, foram utilizados apenas os espécimes que apresentavam quantidade de material biológico suficiente para realizar as análises morfológica e imuno-histoquímica. Os casos presentes em arquivo que não preencheram qualquer um dos critérios determinados para inclusão nesta pesquisa foram descartados da amostra.

#### 4.4 ESTUDO MORFOLÓGICO

Para o estudo morfológico, examinaram-se as lâminas com cortes de 5 µm de espessura do material embocado em parafina, corados pela técnica de rotina da Hematoxilina/Eosina, sob microscopia de luz (Olympus CH30).

Avaliou-se a intensidade do infiltrado inflamatório em todos os espécimes, de acordo com metodologia adaptada do estudo realizado por Tsai et al. (2004). A partir da porção mais central dos granulomas periapicais e da porção luminal dos cistos periapicais e periapicais residuais, em direção à periferia, foram avaliados 3 campos microscópicos consecutivos, sob aumento total de 400x. Lesões periapicais que apresentavam infiltrado inflamatório restrito ao primeiro campo foram classificadas como apresentando leve infiltrado inflamatório. Espécimes que revelavam infiltrado inflamatório até o segundo campo microscópico avaliado foram categorizados como exibindo moderado infiltrado inflamatório. Por fim, as lesões que exibiam infiltrado inflamatório até o terceiro campo microscópico foram classificadas como apresentando intenso infiltrado inflamatório.

Nos casos de cistos periapicais e cistos periapicais residuais, além da intensidade do infiltrado inflamatório, também se analisou a espessura do epitélio adaptando-se o critério sugerido por Moreira et al. (2000). Revestimentos epiteliais de cistos periapicais e periapicais residuais que apresentavam em sua maior extensão 2 a 10 camadas de células foram classificados como atróficos. Por sua vez, os revestimentos epiteliais das lesões císticas que revelavam mais de 10 camadas de células foram classificados como hiperplásicos.

A avaliação dos parâmetros morfológicos foi conduzida por dois examinadores previamente calibrados, em momentos distintos. Para os cistos periapicais e periapicais residuais, a análise da intensidade do infiltrado inflamatório e da espessura do revestimento epitelial foi realizada em estudo cego.

Os dados obtidos foram, subsequente, anotados em fichas (APÊNDICES A e B).

#### 4.5 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Todos os espécimes selecionados, fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina, foram submetidos a cortes histológicos com 3  $\mu\text{m}$  de espessura, estendidos em lâminas de vidro devidamente preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) e submetidos à técnica da imunoperoxidase pelo método da estreptoavidina-biotina (SABC, do inglês *streptoavidin-biotin complex*) utilizando os anticorpos monoclonais anti-MMP-9, anti-VEGF e anti-FvW.

Como controle positivo para os anticorpos anti-VEGF e anti-FvW, empregaram-se cortes histológicos de rim humano. Por sua vez, para o anticorpo anti-MMP-9 foram utilizados cortes histológicos de intestino grosso humano inflamado. O controle negativo, realizado em alguns cortes histológicos, consistiu na substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino a 1 % (*BSA – Bovine Serum Albumin*) em solução tampão. A técnica utilizada foi realizada conforme os passos que se seguem:

- a) desparafinização: 2 banhos em xilol, sendo o primeiro à temperatura de 60°C por 30 minutos e o segundo à temperatura ambiente por 20 minutos;

- b) re-hidratação em cadeia ascendente de etanóis:
- álcool etílico absoluto I (5 minutos);
  - álcool etílico absoluto II (5 minutos);
  - álcool etílico absoluto III (5 minutos);
  - álcool etílico absoluto IV (5 minutos);
  - álcool etílico 95°GL (5 minutos);
  - álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- c) remoção de pigmentos formólicos em hidróxido de amônia a 10% por 10 minutos, à temperatura ambiente;
- d) lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 passagens em água destilada por 5 minutos cada;
- e) recuperação dos sítios antigênicos (Quadro 1);
- f) resfriamento dos cortes até alcançar temperatura ambiente;
- g) lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 passagens em água destilada por 5 minutos cada;
- h) duas incubações dos cortes, pelo período de 15 minutos cada, em solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes, em uma proporção de 1/1 para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual;
- i) lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 passagens em água destilada por 5 minutos cada;
- j) duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl (tris-hidroximetil-aminometano, Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) pH 7,4 por 5 minutos cada;
- k) incubação com os anticorpos primários (Quadro 1) diluídos em solução de BSA (albumina sérica bovina, Biotest S/A, São Paulo, Brasil) a 1%, conservada em azida sódica a 0,1%, em TRIS-HCl pH 7,4;
- l) duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 por 5 minutos cada;
- m) incubação com o anticorpo secundário (*Biotinylated link universal*, DAKO, A/S, Glostrup, Dinamarca);
- n) duas passagens em solução Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 por 5 minutos cada;

- o) incubação com o complexo estreptoavidina-biotina (DAKO, A/S, Glostrup, Dinamarca) na diluição de 1/100 durante 30 minutos, à temperatura ambiente;
- p) imersão em TRIS-HCl pH 7,4, duas trocas de 5 minutos cada;
- q) aplicação do agente cromógeno diaminobenzidina (DAB), durante 3 minutos, diluído em TRIS-HCl pH 7,4 e ativado pelo peróxido de hidrogênio 10 volumes a 0,3%, em câmara escura;
- r) lavagem em água corrente por 10 minutos;
- s) passagens rápidas em água destilada (3 trocas);
- t) contra-coloração com hematoxilina de Mayer por 10 minutos à temperatura ambiente;
- u) duas passagens em água destilada por 5 minutos cada e lavagem em água corrente por 10 minutos;
- v) desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
- álcool etílico 80°GL (3 minutos);
  - álcool etílico 95°GL (3 minutos);
  - álcool etílico absoluto I (3 minutos);
  - álcool etílico absoluto II (3 minutos);
  - álcool etílico absoluto III (3 minutos);
- w) diafanização em xilol por 10 minutos;
- x) montagem da lamínula em resina Permount<sup>®</sup> (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Especificidade	Clone	Diluição	Fabricante	Recuperação antigênica	Tempo de incubação
MMP-9	2C3	1:40	Novacastra Laboratories	Citrato pH 6,0, Pascal, 30 minutos	<i>Overnight</i> (18 horas)
VEGF	C-1	1:400	Santa Cruz Biotechnology	Tripsina 0,1% pH 7,9, 37°C 60 minutos	<i>Overnight</i> (18 horas)
vWF	F8/86	1:50	Dako Cytomation	Citrato pH 6,0, Pascal, 30 minutos	60 minutos

Quadro 1 Especificidade do anticorpo, clone, diluição, fabricante, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo imuno-histoquímico.

#### 4.5.1 Análise da imunexpressão do VEGF

A imunexpressão do anticorpo anti-VEGF foi analisada de forma semi-quantitativa e quantitativa. Deve-se destacar que foram considerados como imunopositivos todos os elementos celulares que apresentavam pigmentação acastanhada intracitoplasmática, independente da intensidade de marcação.

A análise quantitativa foi realizada análise nas células imunopositivas do tecido conjuntivo dos granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais, a partir de uma adaptação da metodologia proposta por Freitas et al. (2005). Os espécimes foram analisados em toda a extensão, sob aumento de 100x, para identificar a área que apresentava a maior quantidade de células imunorreativas. Identificada esta área, foi contado o número total de células imunopositivas em cinco campos consecutivos, sob aumento de 1000x, marcando o número de células no aparelho Leucotron - LS II. Posteriormente, foi estabelecido o número médio de células por espécime.

A imunexpressão do anticorpo anti-VEGF no revestimento epitelial dos cistos foi analisada de forma semi-quantitativa, sob aumento de 100x, em toda extensão dos espécimes, segundo adaptação da metodologia proposta por Leonardi et al. (2003). De acordo com a extensão do revestimento epitelial que apresentava imunorreatividade, os casos foram categorizados como:

- a) negativa – 0% a 10% da extensão do revestimento epitelial demonstrando imunorreatividade;
- b) fraca expressão – entre 11% e 25% da extensão do revestimento epitelial demonstrando imunorreatividade;
- c) moderada expressão - entre 26% e 75% da extensão do revestimento epitelial demonstrando imunorreatividade;
- d) forte expressão - mais de 76% da extensão do revestimento epitelial demonstrando imunorreatividade.

As análises foram feitas por dois observadores em momentos distintos. Para os cistos periapicais e cistos periapicais residuais, foi realizado um estudo cego. Os dados obtidos foram, subseqüentemente, anotados em fichas (APÊNDICES C e D).

#### 4.5.2 Análise da imunexpressão do FvW

A imunorreatividade ao anticorpo anti-FvW foi realizada no tecido conjuntivo de granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais, considerando as células endoteliais imunorreativas que apresentavam pigmentação acastanhada intracitoplasmática, independente da intensidade de marcação.

Para análise quantitativa, foi realizada contagem microvascular (MVC), de acordo com a metodologia proposta por Maeda et al. (1995). Em cada espécime, sob microscopia de luz e com aumento de 40x, foram identificadas cinco áreas que apresentavam maior imunorreatividade. Nestes campos, sob aumento de 200x, foram quantificados os vasos imunorreativos ao anticorpo anti-FvW. Vasos sangüíneos, com ou sem lúmen distinto, e células endoteliais isoladas foram considerados no processo de contagem. Em relação aos cistos periapicais e cistos periapicais residuais, a análise foi realizada em estudo cego. Os dados obtidos foram, subseqüentemente, anotados em fichas (APÊNDICE E).

#### 4.5.3 Análise da imunexpressão da MMP-9

A imunexpressão do anticorpo anti-MMP-9 foi analisada de forma semi-quantitativa, sob aumento de 200x, em toda extensão dos espécimes, categorizando a imunorreatividade dos vasos sangüíneos, segundo adaptação ao critério proposto por Barros (2006):

- a) negativa;
- b) fraca expressão - menos de 10% dos vasos imunorreativos;
- c) moderada expressão - entre 11% e 50% dos vasos imunorreativos;
- d) forte expressão - mais de 50% dos vasos imunorreativos.

Deve-se destacar que foram considerados como imunopositivos todos os vasos sangüíneos que apresentavam células endoteliais com pigmentação acastanhada intracitoplasmática, independente da intensidade de marcação.

A análise foi feita por dois observadores em momentos distintos. Para os cistos periapicais e cistos periapicais residuais, foi realizado um estudo cego. Os dados obtidos foram, subseqüentemente, anotados em fichas (APÊNDICE F).

#### 4.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados obtidos foram submetidos a testes estatísticos apropriados, com intuito de testar as hipóteses levantadas na presente pesquisa. Os dados obtidos foram digitados no formato DBF (*Data Base Format*), sendo, posteriormente, analisados pelo programa SPSS (*Statistical for Social Science Version 13.0 for Windows® XP*, Chicago Illinois USA, [www.spss.com](http://www.spss.com)).

Para análise das variáveis qualitativas (espessura do revestimento epitelial de cistos periapicais e cistos periapicais residuais, intensidade de imunexpressão de VEGF em revestimento epitelial de cistos periapicais e cistos periapicais residuais, intensidade de imunexpressão de MMP-9 em vasos sanguíneos), foi utilizado o teste exato de Fisher.

Por sua vez, em virtude da ausência de distribuição normal, a avaliação das variáveis quantitativas (número de células imunopositivas para o VEGF, número de vasos imunorreativos ao anticorpo anti-FvW) foi realizada por meio dos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Além disso, o coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) foi utilizado para avaliar a correlação entre o número de vasos imunorreativos ao anticorpo anti-FvW e a quantidade de células imunopositivas para o VEGF.

Para todos os testes estatísticos utilizados, foi considerado um nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

#### 4.7 IMPLICAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa deste estudo foi registrado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

(135/2007), o qual o aprovou em reunião realizada no dia 11 de dezembro de 2007 (ANEXO A).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise da intensidade do infiltrado inflamatório revelou que dos 20 casos de granulomas periapicais, 19 (95%) apresentavam intenso infiltrado inflamatório e apenas 1 espécime (5%) apresentou infiltrado inflamatório de intensidade moderada. No grupo dos cistos periapicais, 14 casos (70%) apresentaram intenso infiltrado inflamatório, 5 casos (25%) exibiram moderado infiltrado inflamatório e apenas 1 espécime (5%) revelou leve infiltrado inflamatório. Para os cistos periapicais residuais, 3 casos (30%) apresentaram intenso infiltrado inflamatório, 3 lesões (30%) revelaram moderado infiltrado inflamatório e 4 espécimes (40%) demonstraram leve infiltrado inflamatório (Tabela 1, Figura 11).

Tabela 1 Distribuição dos casos de granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais, segundo intensidade do infiltrado inflamatório. Natal, RN – 2008.

Tipo de lesão	Intensidade do infiltrado inflamatório			Total n (%)
	Leve n (%)	Moderado n (%)	Intenso n (%)	
Granuloma periapical	0 (0)	1 (5)	19 (95)	20 (100)
Cisto periapical	1 (5)	5 (25)	14 (70)	20 (100)
Cisto periapical residual	4 (40)	3 (30)	3 (30)	10 (100)
Total	5 (10)	9 (18)	36 (72)	50 (100)

No que se refere ao revestimento epitelial, 14 casos (70%) de cistos periapicais apresentaram revestimento epitelial hiperplásico e apenas 6 casos (30%) mostraram revestimento atrófico. Por sua vez, 6 casos (60%) de cistos periapicais residuais demonstraram revestimento epitelial atrófico, enquanto que 4 espécimes

(40%) exibiram revestimento epitelial hiperplásico. O teste exato de Fisher demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa ( $p>0.05$ ) entre a espessura do revestimento epitelial e o tipo de cisto periapical (Tabela 2, Figuras 9 e 10).

Tabela 2 Parâmetros utilizados no cálculo do teste exato de Fisher para avaliação da espessura do revestimento epitelial de acordo com o tipo de cisto. Natal, RN – 2008.

Tipo de cisto	Espessura do revestimento epitelial		Total n (%)	<i>p</i>
	Atrófico n (%)	Hiperplásico n (%)		
Cisto periapical	6 (30)	14 (70)	20 (100)	<b>0,139</b>
Cisto periapical residual	6 (60)	4 (40)	10 (100)	

Dentre os cistos periapicais com revestimento epitelial atrófico, 3 espécimes (50%) possuíam infiltrado inflamatório de intensidade moderada e outros 3 casos (50%) revelavam intenso infiltrado inflamatório. Dentre os cistos periapicais com revestimento epitelial hiperplásico, 11 casos (78,57%) exibiram intenso infiltrado inflamatório, 2 espécimes (14,28%) demonstraram infiltrado inflamatório de intensidade moderada e apenas 1 caso (7,14%) revelou infiltrado inflamatório leve.

Nos cistos periapicais residuais com revestimento epitelial atrófico, 3 casos (50%) apresentaram leve infiltrado inflamatório, 2 espécimes (33,3%) exibiram infiltrado inflamatório de intensidade moderada e apenas 1 caso (16,7%) revelou intenso infiltrado inflamatório. Por sua vez, nos cistos periapicais residuais com revestimento epitelial hiperplásico, 2 casos (50%) apresentaram intenso infiltrado inflamatório, 1 caso (25%) revelou moderado infiltrado inflamatório e 1 espécime (25%) demonstrou infiltrado inflamatório de intensidade leve.

Com intuito de verificar possíveis diferenças na espessura do revestimento epitelial de cistos periapicais e cistos periapicais residuais de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório, as lesões que apresentavam infiltrado inflamatório leve e moderado foram agrupadas e comparadas com as lesões que demonstravam intenso infiltrado inflamatório. O teste exato de Fisher demonstrou

não haver associação estatisticamente significativa ( $p>0.05$ ) entre a espessura do revestimento epitelial e a intensidade do infiltrado inflamatório (Tabela 3).

Tabela 3 Parâmetros utilizados no cálculo do teste exato de Fisher para análise da espessura do revestimento epitelial de cistos periapicais e cistos periapicais residuais, de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal, RN – 2008.

Revestimento epitelial	Infiltrado inflamatório		Total n (%)	<i>p</i>
	Leve/ Moderado n (%)	Intenso n (%)		
Atrófico	8 (66,7)	4 (33,3)	12 (100)	<b>0,061</b>
Hiperplásico	5 (27,8)	13 (72,2)	18 (100)	

## 5.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DO VEGF

Foi observada expressão imuno-histoquímica de VEGF em todos os casos de granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais. A imunorreatividade pôde ser constatada em fibroblastos, macrófagos, plasmócitos e células endoteliais. O número médio de células imunorreativas ao VEGF em granulomas periapicais foi 564,9 (variação de 254 a 916). No grupo dos cistos periapicais, o número médio de células que expressaram o VEGF foi 565,0 (variação de 214 a 792). Por sua vez, nos cistos periapicais residuais, o número médio de células imunorreativas foi 443,9 (variação de 222 a 660).

Apesar de um menor número médio de células imunopositivas para o VEGF em cistos periapicais residuais, a comparação das medianas obtidas com a quantificação das células imunopositivas, através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p>0.05$ ) (Tabela 4, Figura 2).

A análise do número de células imunorreativas para o VEGF em relação à intensidade do infiltrado inflamatório revelou média de 390,4 células imunopositivas em lesões com leve infiltrado inflamatório. Lesões com moderado infiltrado

inflamatório apresentaram número médio de 428,2 células imunorreativas. Por sua vez, lesões com intenso infiltrado inflamatório revelaram média de 589,8 células imunopositivas.

Tabela 4 Parâmetros utilizados para o cálculo do teste de Kruskal-Wallis para avaliação do número de células imunopositivas para o VEGF em granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais. Natal, RN – 2008.

Lesão	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	KW	p
Granuloma periapical	20	586,00	406,25 – 690,25	27,55	3.315	<b>0,191</b>
Cisto periapical	20	590,50	505,75 – 688,75	27,20		
Cisto periapical residual	10	460,00	256,00 – 618,50	18,00		

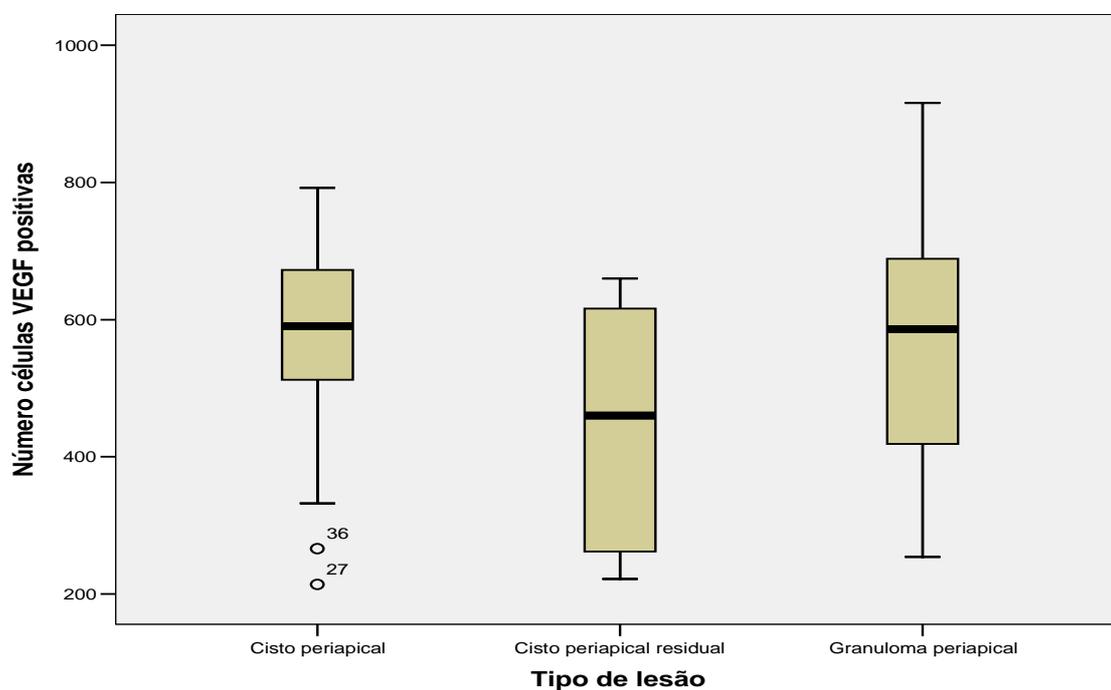


Figura 2 Box-Plot da quantidade de células imunopositivas para o VEGF em granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais. Natal, RN – 2008.

Com intuito de identificar possíveis diferenças no número de células

imunorreativas ao VEGF em relação à intensidade do infiltrado inflamatório, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A comparação das medianas obtidas com a avaliação do número de células imunopositivas para VEGF revelou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.01$ ). Dessa forma, lesões com intenso infiltrado inflamatório apresentaram maior número de células imunorreativas ao VEGF, em comparação com lesões com infiltrado inflamatório leve ou moderado (Tabela 5, Figuras 3 e 12).

Tabela 5 Parâmetros utilizados para o cálculo do teste de Kruskal-Wallis para avaliação do número de células imunopositivas para o VEGF de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal, RN – 2008.

Infiltrado inflamatório	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	KW	p
Leve	5	373,00	242,00 – 547,50	11,70	9.736	<b>0,008</b>
Moderado	9	298,00	246,00 – 633,00	17,56		
Intenso	36	611,00	542,75 – 690,25	29,40		

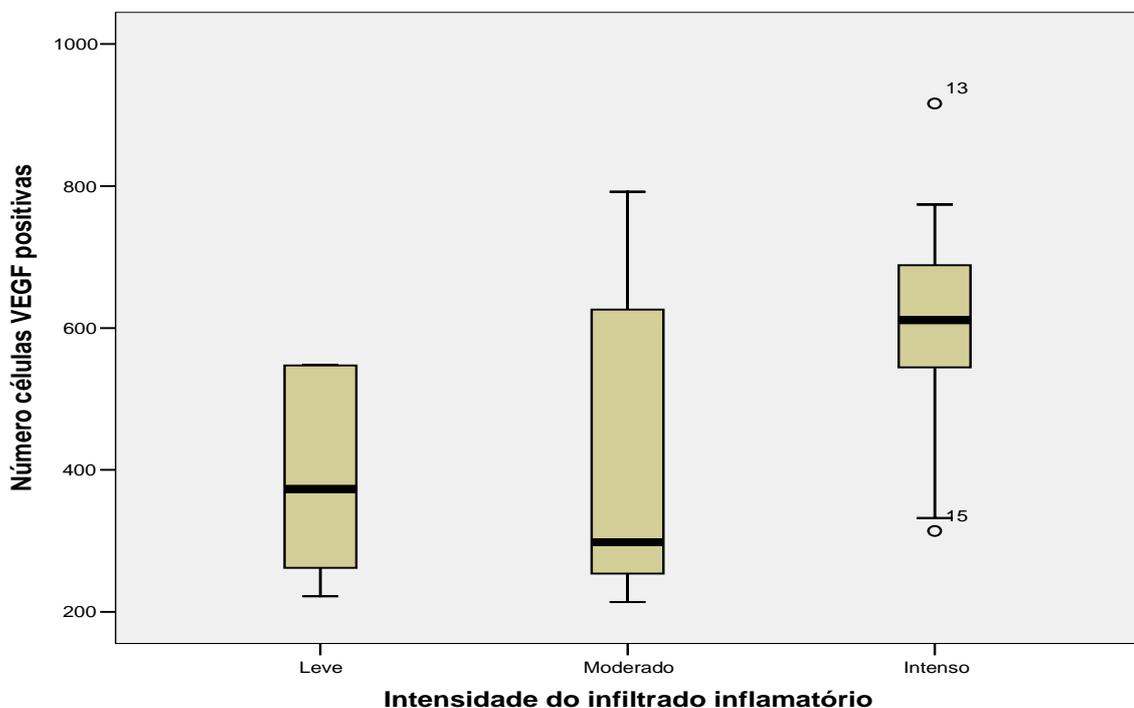


Figura 3 Box-Plot da quantidade de células imunopositivas para o VEGF de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório nas lesões. Natal, RN – 2008.

A análise semi-quantitativa da expressão do VEGF no revestimento epitelial dos cistos periapicais revelou forte imunorreatividade em 11 casos (55%), moderada imunoeexpressão em 7 espécimes (35%) e fraca expressão em 2 casos (10%). Nos cistos periapicais residuais, 7 casos (70%) apresentaram forte expressão epitelial de VEGF e 3 espécimes (30%) demonstraram moderada imunorreatividade. Com intuito de identificar possíveis diferenças na intensidade de expressão epitelial de VEGF entre cistos periapicais e cistos periapicais residuais, os casos categorizados como de fraca expressão e moderada expressão foram agrupados e comparados com os casos de forte expressão epitelial de VEGF. O teste exato de Fisher demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p>0.05$ ) (Tabela 6).

Tabela 6 Parâmetros utilizados no cálculo do teste exato de Fisher para análise da intensidade de expressão epitelial de VEGF de acordo com o tipo de cisto periapical. Natal, RN – 2008.

Tipo de lesão	Intensidade de expressão de VEGF		Total n (%)	<i>p</i>
	Fraca/Moderada n (%)	Forte n (%)		
Cisto periapical	9 (45)	11 (55)	20 (100)	<b>0,694</b>
Cisto periapical residual	3 (30)	7 (70)	10 (100)	

Do total de cistos periapicais e periapicais residuais com revestimento epitelial atrófico, 6 casos (66,7%) apresentaram forte expressão epitelial de VEGF, 2 casos (16,7%) revelaram moderada expressão e 2 casos (16,7%) demonstraram fraca imunorreatividade. Nas lesões de cistos periapicais e periapicais residuais com revestimento epitelial hiperplásico, 10 casos (55,6%) exibiram forte expressão de VEGF e 8 espécimes (44,4%) demonstraram moderada expressão, não havendo nenhum caso com fraca imunorreatividade epitelial (Figuras 13 e 14).

Para avaliar possíveis diferenças na intensidade de expressão epitelial de VEGF entre cistos com revestimento epitelial atrófico e cistos com revestimento epitelial hiperplásico, os casos que exibiam fraca expressão e moderada expressão foram agrupados e comparados com os casos com forte expressão epitelial de VEGF. O teste exato de Fisher demonstrou não haver diferença estatisticamente

significativa entre os grupos ( $p > 0.05$ ) (Tabela 7).

Tabela 7 Parâmetros utilizados no cálculo do teste exato de Fisher para análise da intensidade de expressão epitelial de VEGF de acordo com a espessura do revestimento epitelial de cistos periapicais e cistos periapicais residuais. Natal, RN – 2008.

Revestimento epitelial	Intensidade de expressão de VEGF		Total n (%)	$p$
	Fraca/Moderada n (%)	Forte n (%)		
Atrófico	4 (33,3)	8 (66,7)	12 (100)	<b>0,709</b>
Hiperplásico	8 (44,4)	10 (55,6)	18 (100)	

### 5.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DO FvW

Foi identificada imunorreatividade ao anticorpo anti-FvW em células endoteliais de vasos sangüíneos com lúmen conspícuo, bem como em brotamentos capilares de lumens pouco distintos. O número de vasos imunomarcados em granulomas periapicais variou de 124 a 279, com um número médio de 210,4 vasos imunorreativos. Nos cistos periapicais, o número de vasos imunomarcados variou entre 159 e 209, obtendo-se um número médio de 250,8 vasos imunorreativos. Nos cistos periapicais residuais, observou-se uma variação na contagem de vasos imunorreativos entre 114 e 366, com número médio de 217,0 vasos imunomarcados. Apesar de um maior número médio de vasos imunomarcados pelo anticorpo anti-FvW em cistos periapicais, a comparação das medianas, através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0.05$ ) (Tabela 8, Figuras 4 e 15).

A análise do número de vasos imunomarcados em relação à intensidade do infiltrado inflamatório revelou média de 192,2 vasos imunorreativos em lesões com leve infiltrado inflamatório. Lesões com moderado infiltrado inflamatório apresentaram número médio de 202,9 vasos imunorreativos. Por sua vez, lesões com intenso infiltrado inflamatório revelaram média de 239,1 vasos imunomarcados.

A análise das medianas, através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, revelou não existir diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0.05$ ) (Tabela 9, Figura 5).

Tabela 8 Parâmetros utilizados para o cálculo do teste de Kruskal-Wallis para avaliação do número de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW em granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais. Natal, RN – 2008.

Lesão	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	KW	p
Granuloma periapical	20	222,50	171,50 – 239,50	22,70	3.189	<b>0,203</b>
Cisto periapical	20	233,00	199,00 – 287,50	30,00		
Cisto periapical residual	10	199,50	145,50 – 277,75	22,10		

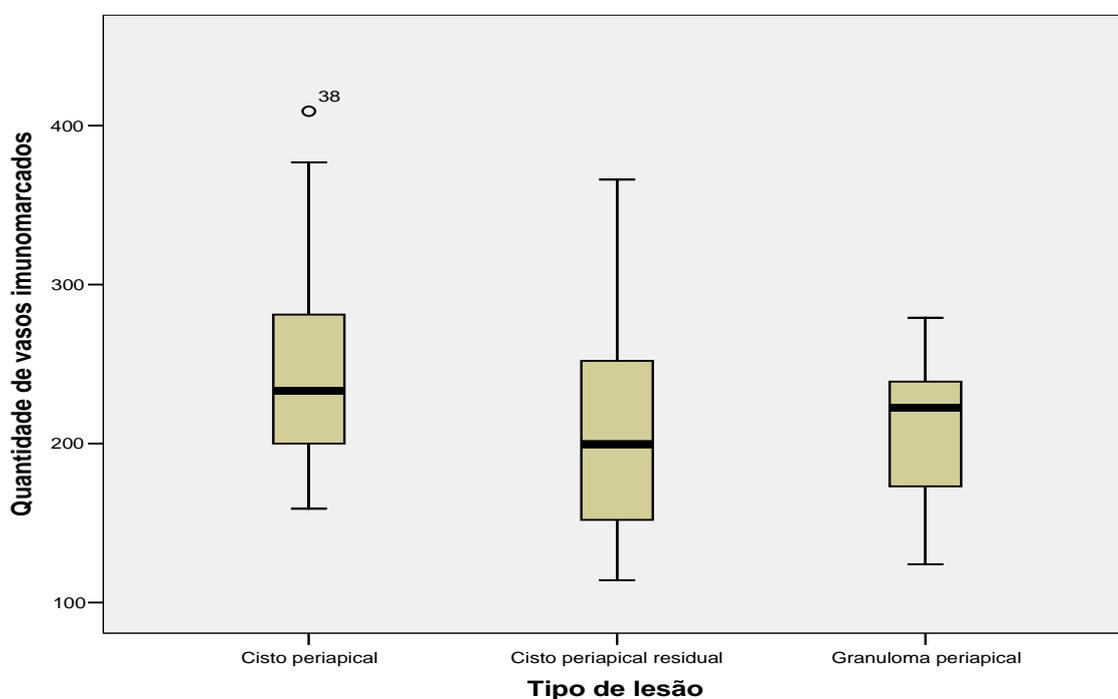


Figura 4 Box-Plot da quantidade de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW em granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais. Natal, RN – 2008.

Tabela 9 Parâmetros utilizados para o cálculo do teste de Kruskal-Wallis para avaliação do número de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW, de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal, RN – 2008.

Infiltrado inflamatório	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	KW	<i>p</i>
Leve	5	173,00	154,00 – 240,00	17,40	4.444	<b>0,108</b>
Moderado	9	192,00	153,50 – 234,00	19,22		
Intenso	36	232,50	198,75 – 259,00	28,19		

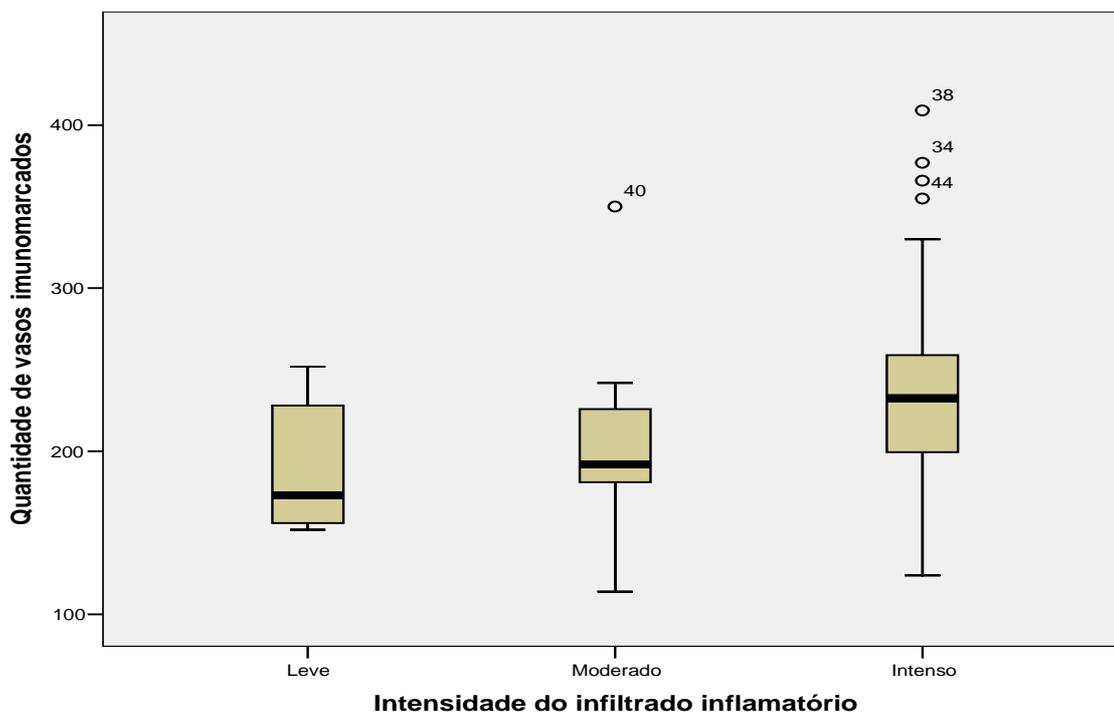


Figura 5 Box-Plot da quantidade de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório nas lesões. Natal, RN – 2008.

Com intuito de identificar possíveis diferenças no número de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW, os casos que apresentavam infiltrado inflamatório leve e moderado foram agrupados e comparados com os casos que exibiam intenso infiltrado inflamatório. A análise das medianas, através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney revelou diferença estatisticamente significativa entre

os grupos ( $p < 0.05$ ) (Tabela 10, Figura 6).

Tabela 10 Parâmetros utilizados para o cálculo do teste de Mann-Whitney para avaliação do número de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW, de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal, RN – 2008.

Infiltrado inflamatório	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	$p$
Leve/Moderado	14	191,00	155,00 – 231,50	18,57	260,00	155.00	<b>0,036</b>
Intenso	36	232,50	198,75 – 259,00	28,19	1015,00		

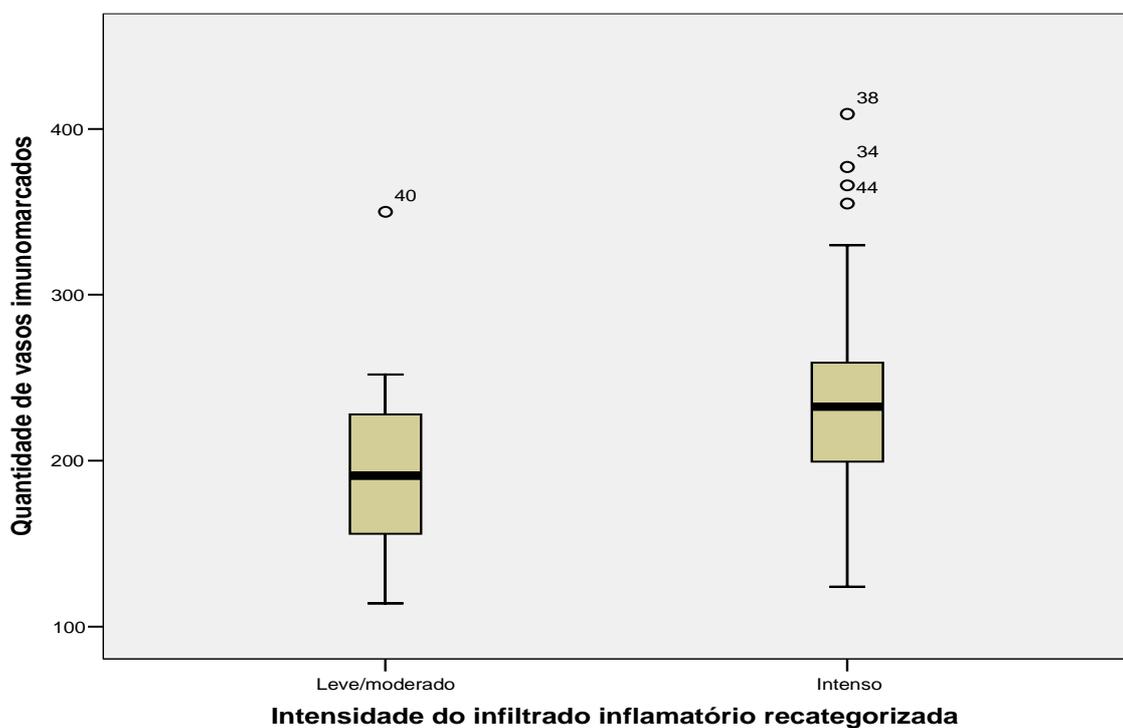


Figura 6 Box-Plot da quantidade de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório nas lesões. Natal, RN – 2008.

Foi realizada, ainda, análise da correlação entre o número de células imunopositivas para o VEGF e a quantidade de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW. Em virtude dos dados não apresentarem distribuição normal, foi realizado cálculo do coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ), o qual revelou não

haver correlação entre a quantidade de células imunorreativas para o VEGF e o número de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW ( $r = 0.224$ ;  $p = 0,118$ ).

#### 5.4 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA MMP-9

Todos os casos de granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais apresentaram imunexpressão de MMP-9. Foi possível identificar imunorreatividade em células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos), fibroblastos e células endoteliais de vasos sanguíneos (Figura 16). Além disso, houve marcação variável na matriz extracelular e, em cistos periapicais e cistos periapicais residuais, também foi constatada imunorreatividade nas células epiteliais.

A avaliação semi-quantitativa da expressão da MMP-9 realizada nas células endoteliais revelou no grupo dos granulomas periapicais, 14 casos (70%) com forte expressão, 3 casos (15%) com moderada expressão e 3 espécimes (15%) com fraca imunorreatividade. Por sua vez, no grupo dos cistos periapicais, 14 casos (70%) apresentaram forte imunexpressão de MMP-9, 2 casos (10%) revelaram moderada expressão e 4 espécimes (20%) exibiram fraca imunexpressão. Para os cistos periapicais residuais, 6 casos (60%) revelaram fraca expressão de MMP-9 e 4 espécimes (40%) demonstraram forte imunorreatividade para MMP-9.

A análise da expressão de MMP-9 em células endoteliais em relação à intensidade do infiltrado inflamatório revelou que, do total de lesões com leve infiltrado inflamatório, 4 espécimes (80%) exibiam fraca expressão de MMP-9 e apenas 1 caso (20%) revelava forte expressão desta protease. Dentre os casos com moderado infiltrado inflamatório, 2 espécimes (22,2%) apresentavam fraca expressão de MMP-9, 2 casos (22,2%) demonstravam moderada expressão e 5 espécimes (55,6%) revelavam forte expressão de MMP-9. Por sua vez, dentre as lesões com intenso infiltrado inflamatório, 7 casos (19,4%) exibiam fraca imunorreatividade para MMP-9, 3 casos (8,3%) apresentavam moderada expressão de MMP-9 e 26 espécimes (72,2%) demonstravam forte imunexpressão de MMP-9 em células endoteliais.

Com intuito de verificar possíveis diferenças na expressão de MMP-9 em

células endoteliais em relação à intensidade do infiltrado inflamatório, os casos que apresentavam infiltrado inflamatório leve e moderado foram agrupados e comparados com os casos que apresentavam intenso infiltrado inflamatório. O teste exato de Fisher revelou valor de  $p=0,055$ , o qual pode ser considerado como situado no limiar da significância estatística (Tabela 11). Dessa forma, foi constatada associação significativa entre a forte imunexpressão de MMP-9 em células endoteliais e a presença de intenso infiltrado inflamatório.

Tabela 11 Parâmetros utilizados no cálculo do teste exato de Fisher para análise da intensidade de expressão da MMP-9 de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal, RN – 2008.

Expressão MMP-9	Infiltrado inflamatório		Total n (%)	<i>p</i>
	Leve/ Moderado n (%)	Intenso n (%)		
Fraca/ Moderada	8 (44,4)	10 (55,6)	18 (100)	<b>0,055</b>
Forte	6 (18,8)	26 (81,3)	32 (100)	

Foram avaliadas, também, possíveis diferenças na expressão de MMP-9 em células endoteliais em relação ao número de células imunopositivas para o VEGF. Para isso, os casos com fraca expressão e moderada expressão de MMP-9 foram agrupados e comparados com os casos que apresentavam forte imunexpressão. A análise das medianas, por meio do teste não-paramétrico de Mann-Withney, revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p<0.01$ ) (Tabela 12, Figura 7). Dessa forma, lesões com forte imunexpressão de MMP-9 em células endoteliais apresentaram maior número de células imunopositivas para o VEGF.

Além disso, foram analisadas possíveis diferenças no número de vasos sangüíneos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW em relação à intensidade de expressão de MMP-9 em células endoteliais. Para isso, mais uma vez, os casos com intensidade de expressão de MMP-9 categorizados como fraca e moderada foram agrupados e comparados com os casos que apresentavam forte imunexpressão. A análise das medianas, por meio do teste não-paramétrico de Mann-Withney, revelou valor de  $p = 0,051$ , o qual pode ser considerado como situado no limiar da

significância estatística (Tabela 13, Figura 8). Dessa forma, lesões com forte imunoe expressão de MMP-9 em células endoteliais apresentaram maior número de vasos imunomarcados com anticorpo anti-FvW.

Tabela 12 Parâmetros utilizados para o cálculo do teste de Mann-Whitney para avaliação do número de células imunopositivas para o VEGF, de acordo com a intensidade de expressão de MMP-9. Natal, RN – 2008.

Intensidade de expressão	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	<i>p</i>
Fraca/Moderada	18	429,50	265,00 – 568,50	17,11	308,00	137,00	<b>0,002</b>
Forte	32	621,00	542,75 – 690,25	30,22	967,00		

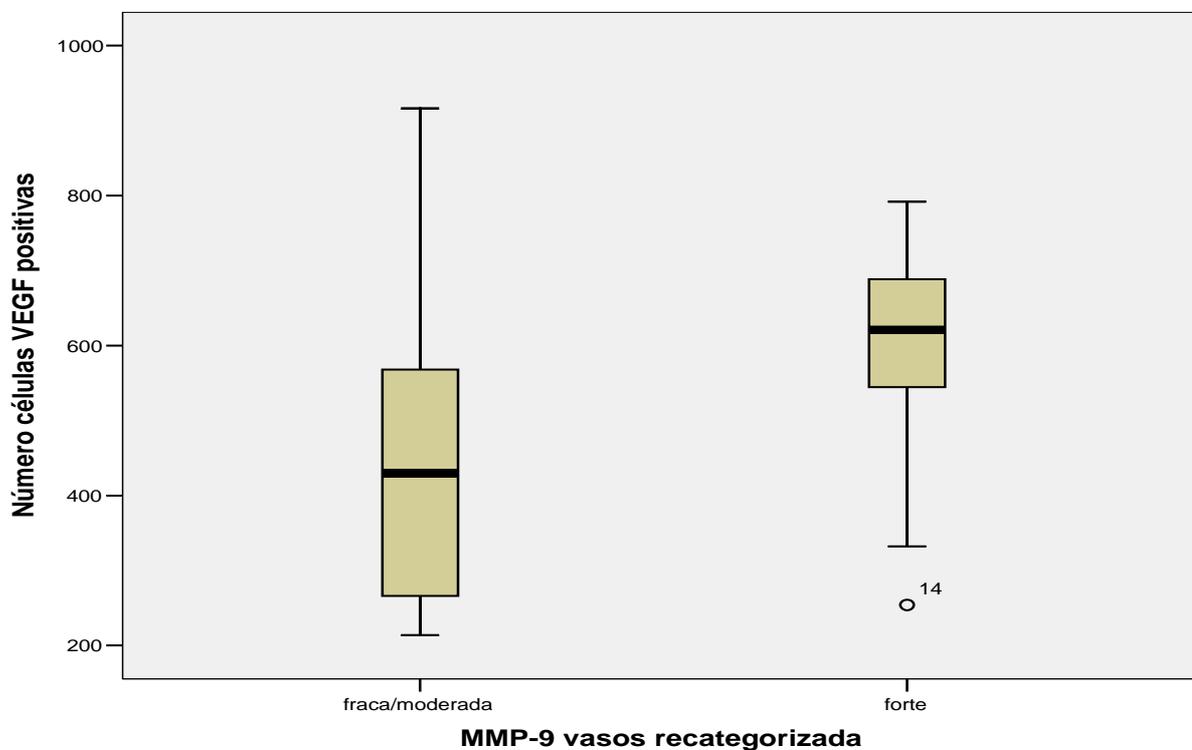


Figura 7 Box-Plot da quantidade de células imunopositivas para o VEGF de acordo com a intensidade de expressão de MMP-9 em vasos sanguíneos. Natal, RN – 2008.

Tabela 13 Parâmetros utilizados para o cálculo do teste de Mann-Whitney para avaliação do número de vasos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW, de acordo com a intensidade de expressão de MMP-9. Natal, RN – 2008.

Intensidade de expressão	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	p
Fraca/Moderada	18	193,00	158,25 – 243,75	20,14	362,50	191.50	<b>0,051</b>
Forte	32	225,50	198,75 – 265,75	28,52	912,50		

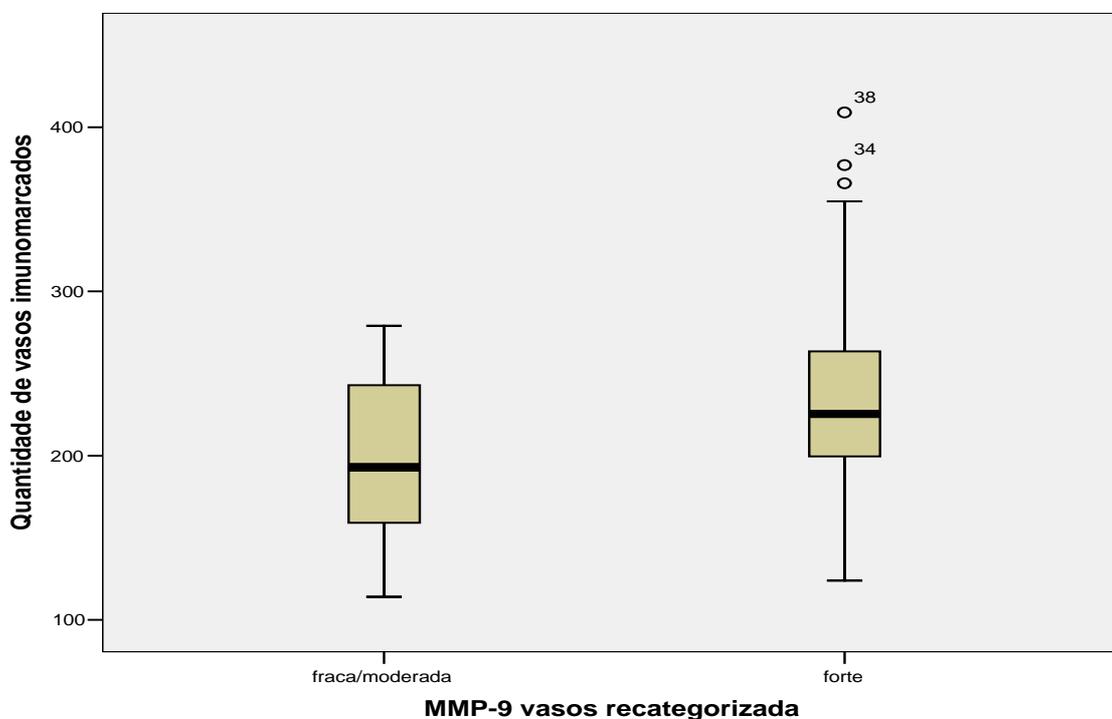


Figura 8 Box-Plot da quantidade de vasos imunomarcados com anticorpo anti-FvW de acordo com a intensidade de expressão de MMP-9 em vasos sanguíneos. Natal, RN – 2008.

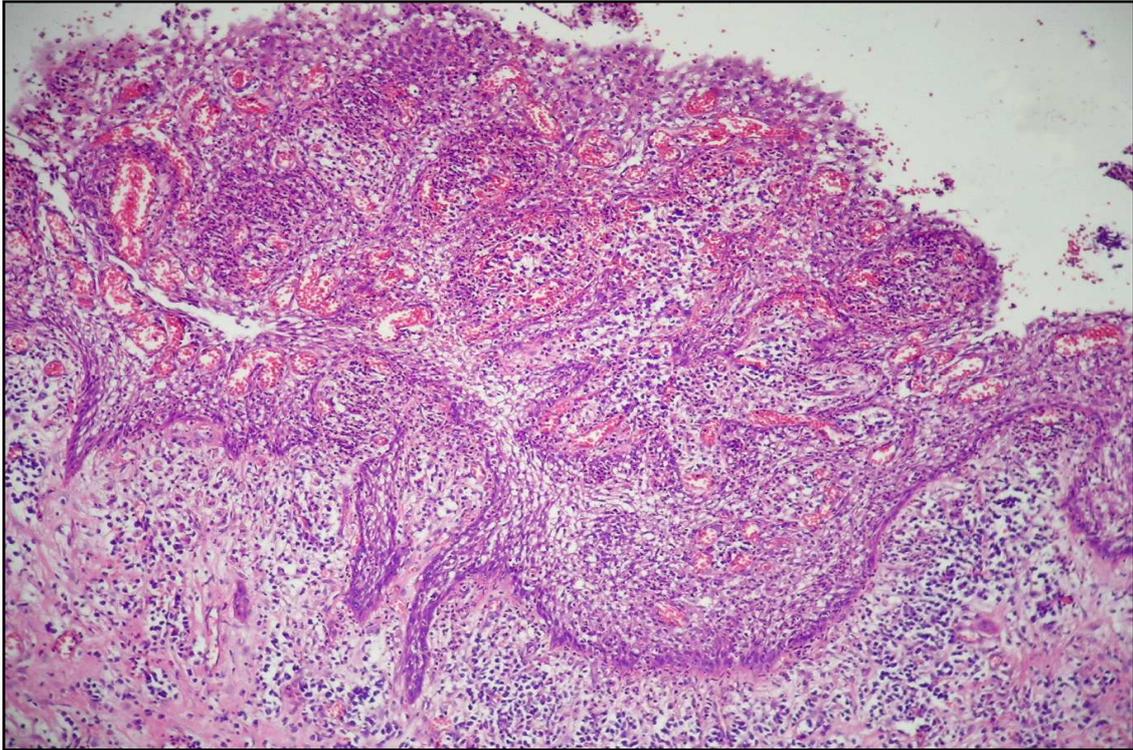


Figura 9 Cisto periapical exibindo revestimento epitelial do tipo hiperplásico, com áreas de exocitose e espongiose. Na cápsula fibrosa, constatam-se feixes de fibras colágenas, numerosos vasos sangüíneos ingurgitados e, em posição justaepitelial, infiltrado inflamatório de predomínio mononuclear (Hematoxilina/ Eosina – 200x).

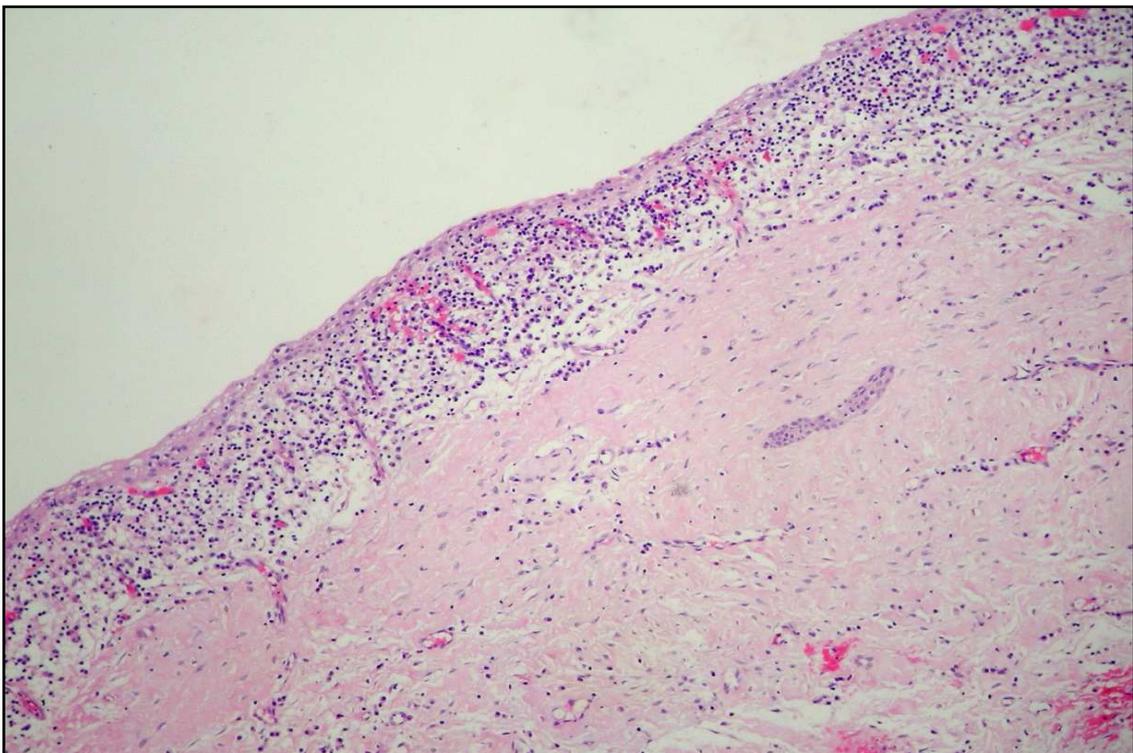


Figura 10 Cisto periapical residual exibindo revestimento epitelial do tipo atrófico, com focos de degeneração hidrópica. Na cápsula fibrosa, constatam-se feixes de fibras colágenas, densamente organizados, vasos sangüíneos ingurgitados e, em posição justaepitelial, infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (Hematoxilina/ Eosina – 200x).

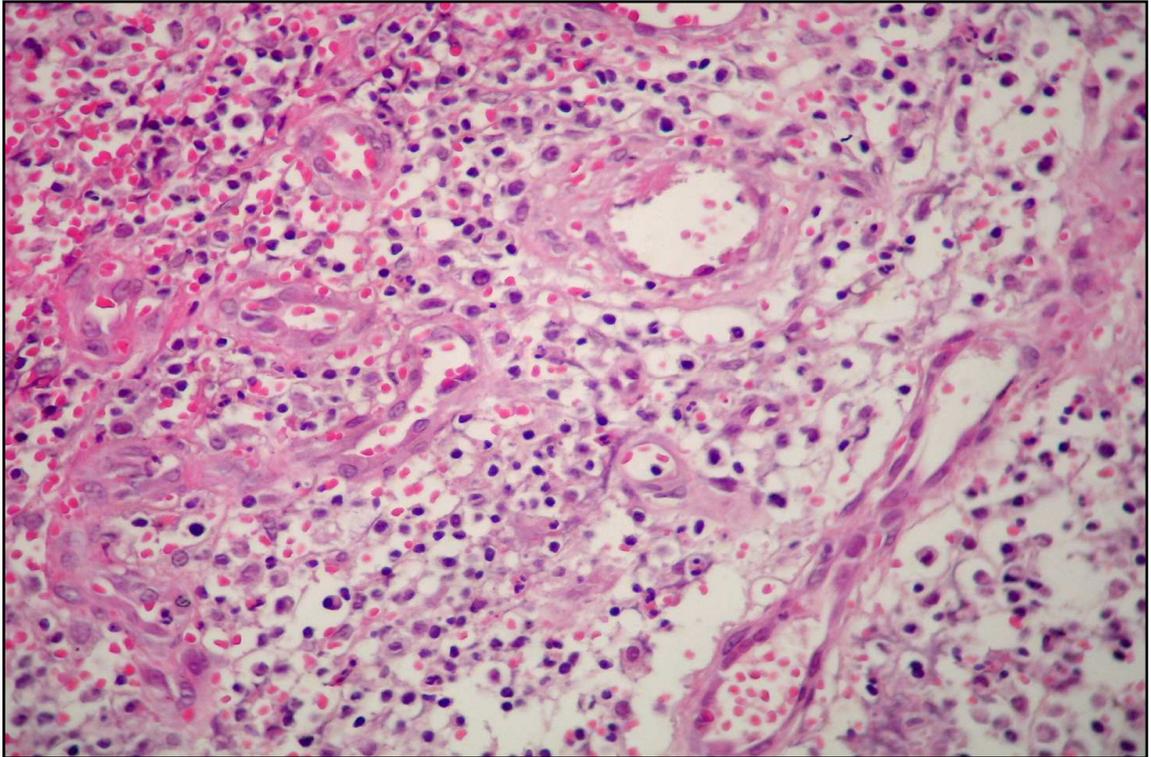


Figura 11 Granuloma periapical constituído por tecido conjuntivo fibroso frouxamente organizado, entremeado por fibroblastos e vasos sangüíneos com células endoteliais volumosas. De permeio, intenso infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos (Hematoxilina/ Eosina – 400x).

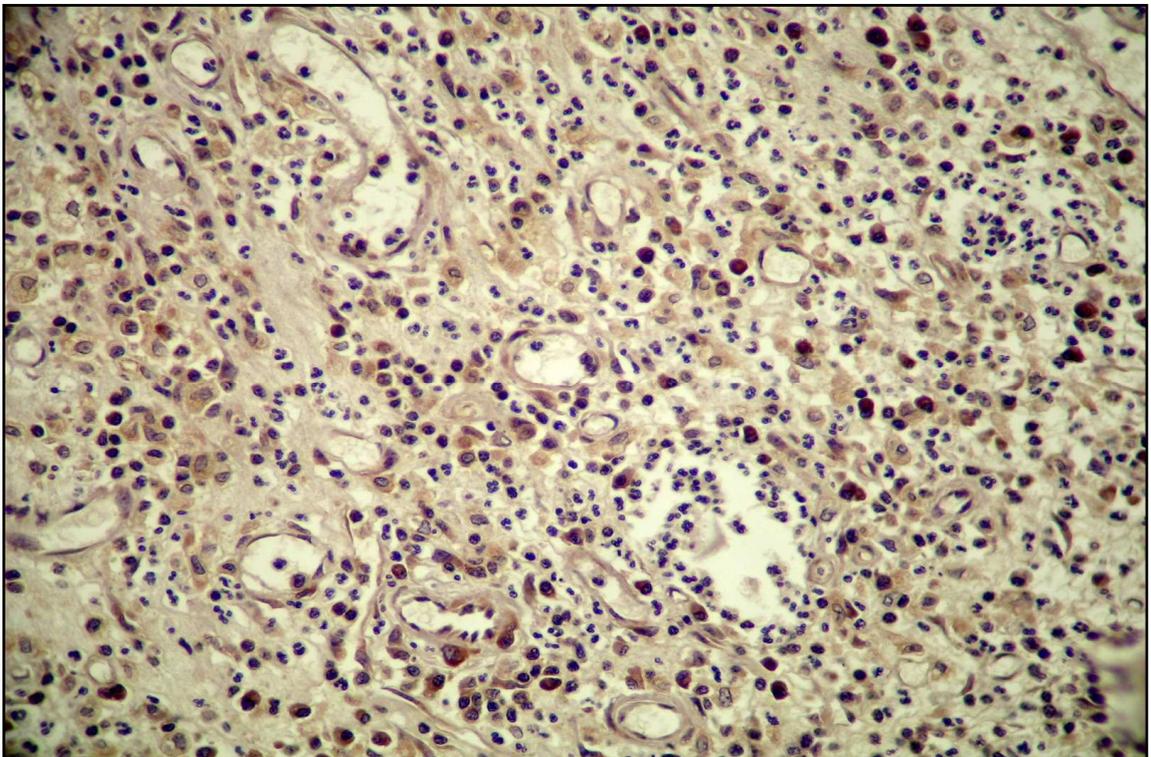


Figura 12 Expressão imuno-histoquímica de VEGF em espécime de granuloma periapical com intenso infiltrado inflamatório, revelando numerosas células imunopositivas (Estreptoavidina-Biotina – 400x).

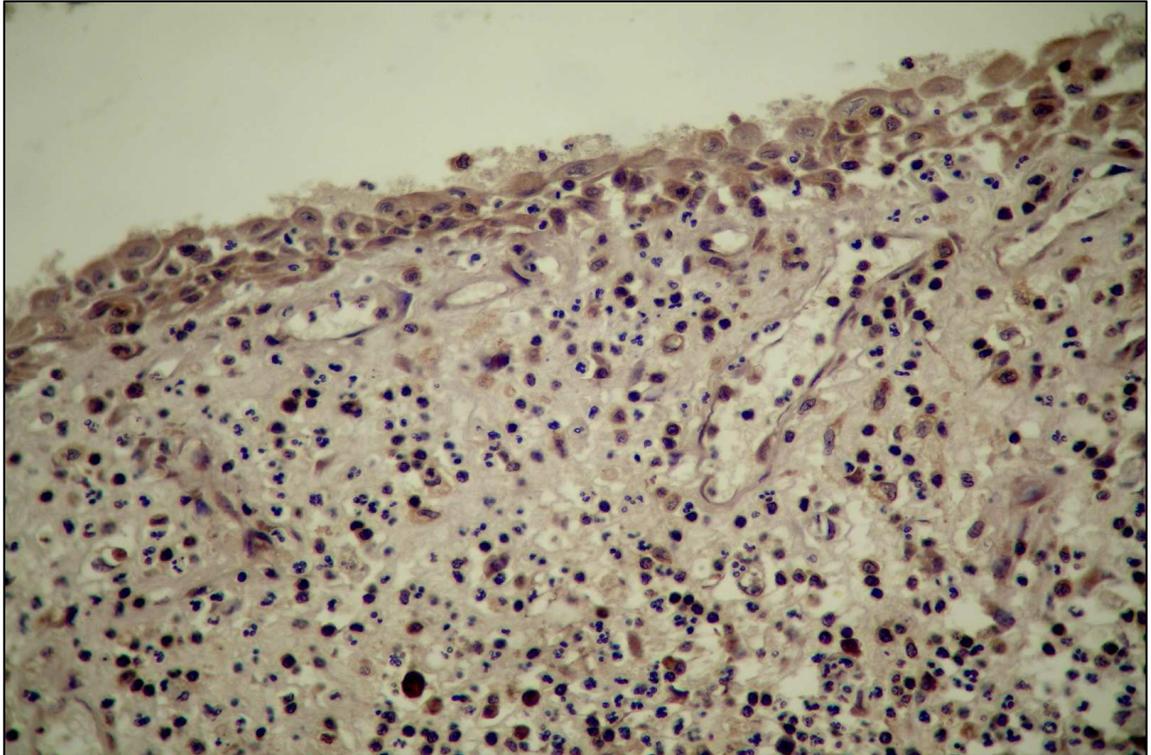


Figura 13 Expressão imuno-histoquímica de VEGF nas células do revestimento epitelial, classificado como atrófico, em espécime de cisto periapical (Estreptoavidina-Biotina – 400x).

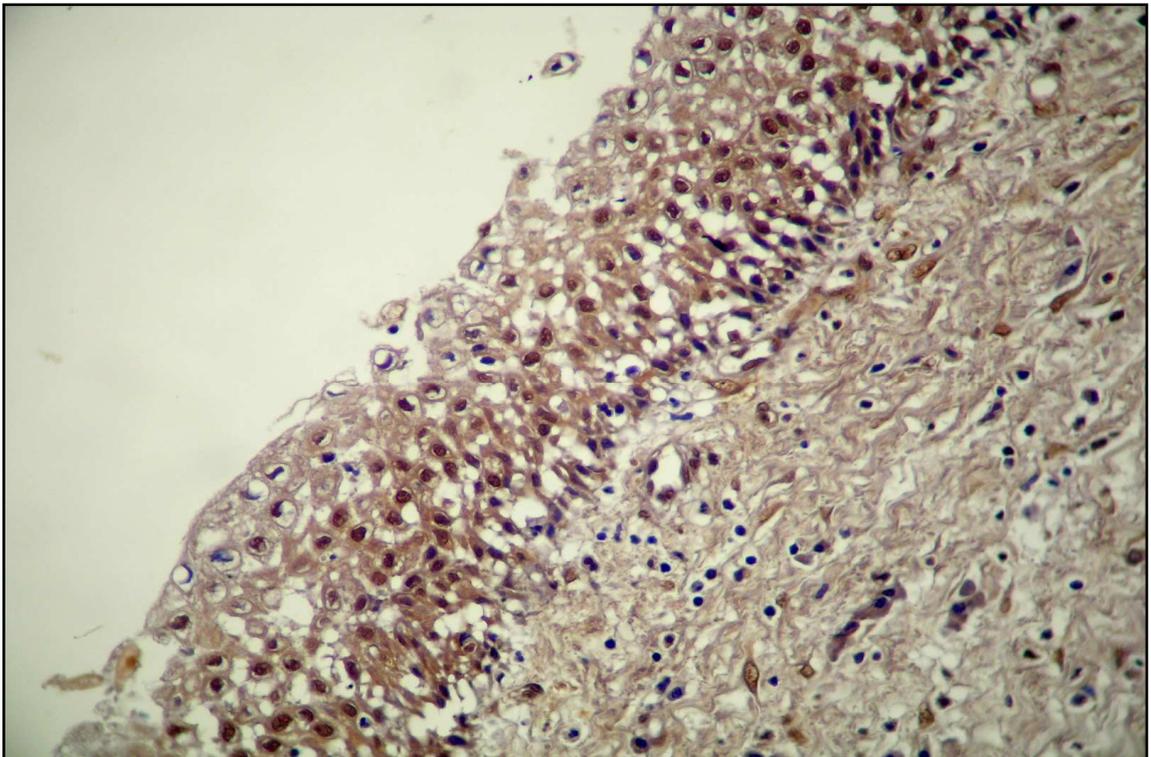


Figura 14 Expressão imuno-histoquímica de VEGF nas células do revestimento epitelial, classificado como hiperplásico, em espécime de cisto periapical residual (Estreptoavidina-Biotina – 400x).

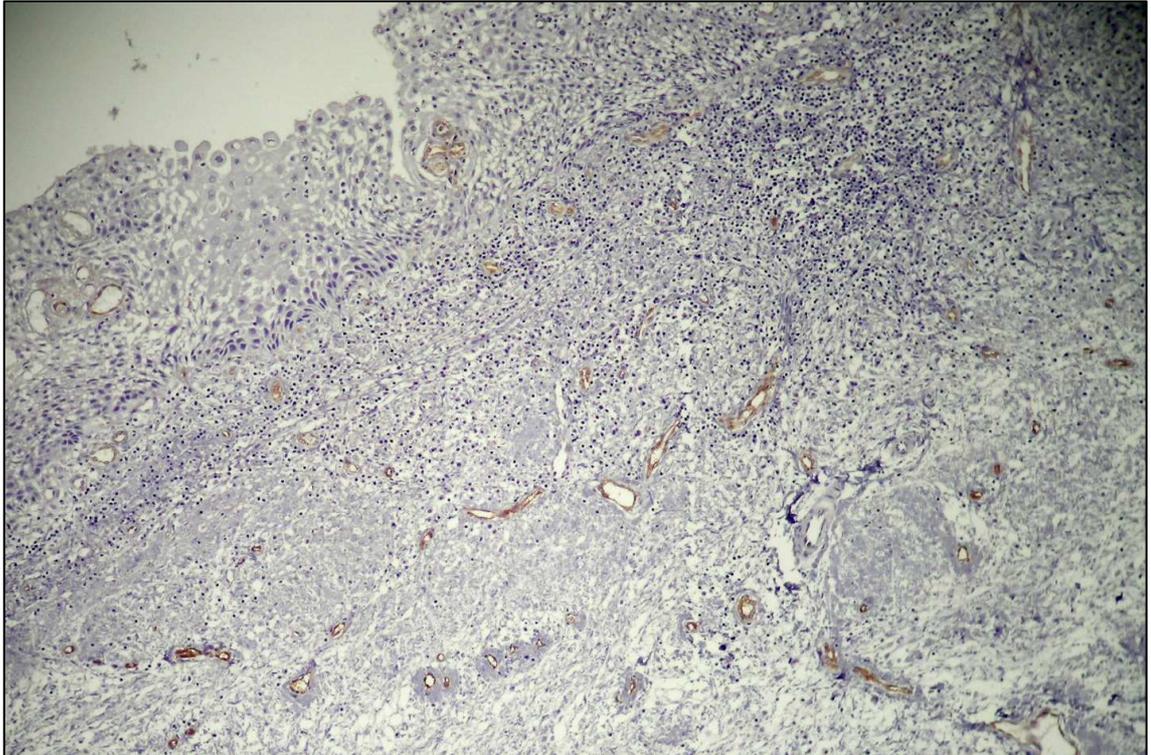


Figura 15 Expressão imuno-histoquímica do FvW em espécime de cisto periapical, revelando numerosos vasos sangüíneos ao longo da cápsula fibrosa (Estreptoavidina-Biotina – 200x).

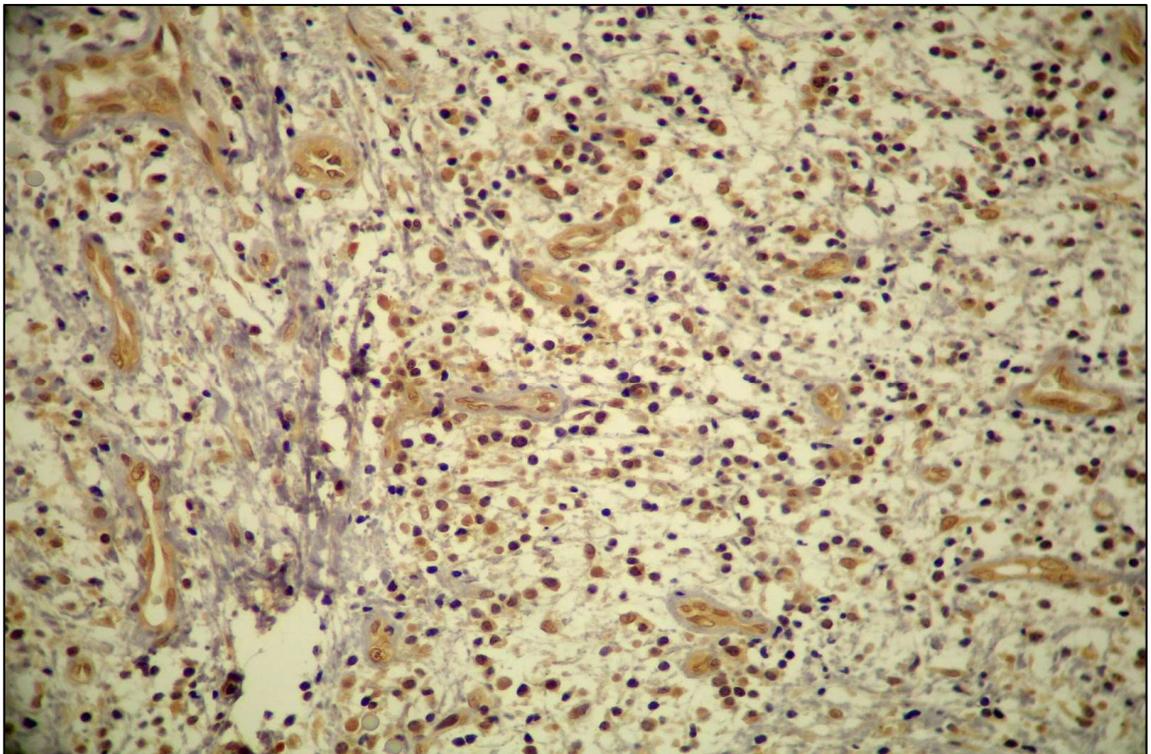


Figura 16 Expressão imuno-histoquímica de MMP-9 nas células endoteliais dos vasos sangüíneos, em espécime de granuloma periapical (Estreptoavidina-Biotina – 400x).

## 6 DISCUSSÃO

As lesões periapicais são as lesões osteolíticas mais comuns na maxila e na mandíbula e representam, essencialmente, uma reação defensiva secundária à destruição do tecido pulpar e à infecção microbiana do sistema de canais radiculares. No intuito de conter o avanço dos produtos tóxicos em direção à região periapical, são mobilizados mecanismos de defesa que incluem reações inflamatórias e imunológicas, as quais culminam em destruição tecidual e indução de reabsorção óssea (FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; NAIR, 2007; NEVILLE et al., 2004).

O granuloma periapical é uma seqüela comum desta infecção pulpar, e o processo inflamatório, típico desta lesão, pode ativar e induzir à proliferação dos restos epiteliais de Malassez gerando o granuloma epitelizado, o qual dará origem ao cisto periapical quando do estabelecimento de uma cavidade patológica central. Ambas as lesões são tratadas pela terapia endodôntica convencional se o dente puder ser mantido, pois o sucesso do tratamento se baseia na redução e eliminação dos microrganismos agressores. Os elementos dentais sem possibilidades restauradoras devem ser extraídos e todo tecido mole periapical deve ser curetado. Caso contrário pode originar-se um cisto periapical residual (NEVILLE et al., 2004; REGEZI, SCIUBBA, 2000; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004).

A literatura é escassa e ainda se discutem os mecanismos pelos quais ocorre o desenvolvimento de cisto periapical residual a partir de remanescentes de lesões prévias de cistos periapicais deixados após a extração dos dentes envolvidos, pois, apesar de muitos dentes com granulomas periapicais e cistos periapicais serem extraídos, o número de casos de cistos periapicais residuais diagnosticados é muito pequeno (MENINGAUD et al., 2006; VARINAUSKAS; GERVICKAS; KAVOLIUNIENE, 2006).

Destarte, fica evidente que os granulomas periapicais, os cistos periapicais e os cistos periapicais residuais representam, na verdade, diferentes estágios de desenvolvimento do mesmo processo inflamatório e sua patogênese ocorre de forma progressiva. Por isso apresentam-se clínica e radiograficamente de maneira bem semelhante (NEVILLE et al., 2004; PULHEZ, 2004; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004). Contudo, apesar destas lesões compartilharem diversas

similaridades, o seu metabolismo é distinto e dependente da intensidade do infiltrado inflamatório (GAO et al., 1998; PULHEZ, 2004; TAKAHASHI, 1998).

Partindo desta premissa, realizou-se, inicialmente, um estudo morfológico dos granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais no intuito de obter subsídios para um melhor entendimento do metabolismo destas lesões e de aspectos que poderiam, de alguma forma, influenciar as variáveis de estudo em questão. Conhecer o metabolismo de uma lesão é essencial para adoção das medidas terapêuticas mais indicadas para cada caso, evitando que o paciente seja submetido a um tratamento mais rigoroso que o necessário ou que a escolha de procedimentos inadequados venha a aumentar os riscos de desenvolvimento de lesões recorrentes.

Em decorrência das dificuldades em se estabelecer parâmetros inquestionáveis para distinção entre granulomas epitelizados e cistos periapicais incipientes, uma vez que para tanto seriam necessários cortes seriados envolvendo desde a periferia até o centro do espécime, foram incluídos na amostra deste estudo apenas espécimes de granulomas periapicais que não apresentavam qualquer remanescente epitelial odontogênico. Por sua vez, para os cistos periapicais e cistos periapicais residuais foram utilizados espécimes que apresentavam cavidade patológica evidente, revestida total ou parcialmente por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado, de acordo com os aspectos histopatológicos descritos por Neville et al. (2004) e Regezi e Sciubba (2000).

Também, foram levados em consideração os aspectos radiográficos destas lesões, descritos pelos mesmos autores, que foram determinantes para distinguir os cistos periapicais dos cistos periapicais residuais, uma vez que os primeiros, à semelhança dos granulomas periapicais, são representados por imagem radiolúcida oval ou circular associada ao ápice radicular com perda da lâmina dura, enquanto que nos últimos esta imagem está localizada no interior do processo alveolar associada a sítio de uma extração prévia. Assim, foram incluídos na amostra apenas espécimes que apresentavam radiografias periapicais anexadas às fichas de requisição de exame anátomo-patológico, o que determinou amostra menor de cistos periapicais residuais.

A análise da intensidade do infiltrado inflamatório revelou que a maioria dos granulomas periapicais e os cistos periapicais apresentaram infiltrado inflamatório intenso (95% e 70%, respectivamente), enquanto que os cistos periapicais residuais

tenderam a um infiltrado inflamatório leve ou moderado (70%), dados que corroboram os achados de Suzuki et al. (2001). Estas diferenças de intensidades do infiltrado inflamatório apresentadas pelos cistos periapicais residuais em relação aos granulomas periapicais e cistos periapicais reflete a diferença no metabolismo destas lesões, haja vista tratar-se o cisto periapical residual de uma lesão menos ativa que os granulomas periapicais e cistos periapicais, que são lesões tipicamente ativas e expansivas, uma vez que a fonte de irritação constante representada pela infecção oriunda do canal radicular, que determina intensa reação inflamatória, foi reduzida com a extração dentária (PULHEZ, 2004; SUZUKI et al., 2001; SUZUKI et al., 2002).

Além da intensidade do infiltrado inflamatório, alguns autores acreditam que a espessura do revestimento epitelial tenha relação com o potencial de crescimento e expansão das lesões císticas, representando um parâmetro histológico confiável para avaliação da atividade metabólica e/ou da atividade de crescimento destas lesões (CURY et al., 1998; MOREIRA et al., 2000). No presente estudo, observou-se nos cistos periapicais maior número de casos com revestimento epitelial hiperplásico (70%), enquanto os cistos periapicais residuais demonstraram revestimento epitelial atrófico na maior parte da amostra (60%).

Apesar de não ter sido evidenciada diferença estatisticamente significativa em relação à espessura do revestimento epitelial ( $p > 0.05$ ), os resultados percentuais obtidos no presente estudo sugerem uma diferença no potencial de crescimento e expansão dos cistos periapicais e dos cistos periapicais residuais. De acordo com Cury et al. (1998), o revestimento epitelial hiperplásico indica um comportamento mais ativo das lesões que o possuem quando comparadas às de revestimento epitelial atrófico. De fato, os estudos de Suzuki et al. (2001), Suzuki et al. (2002) e Pulhez (2004) confirmaram o baixo potencial proliferativo do revestimento epitelial dos cistos periapicais residuais em comparação ao dos cistos periapicais, o que caracterizaria uma fase quiescente e de regressão do crescimento dos cistos periapicais residuais após a remoção do irritante inflamatório. Coerentemente, High e Hirschmann (1986) confirmaram que com o tempo, a maior parte dos cistos periapicais residuais exibem uma redução no tamanho, atrofia do revestimento epitelial, redução da intensidade do infiltrado inflamatório e aumento da ocorrência de calcificações distróficas, podendo ocorrer resolução espontânea mediante a ausência do estímulo irritante.

Esta modulação negativa para a expansão das lesões císticas periapicais pode ser explicada pela maior quantidade de células imunossupressoras encontradas especificamente nos cistos periapicais residuais (PULHEZ, 2004) e nos cistos periapicais de revestimento epitelial atrófico (MOREIRA et al., 2000) em comparação ao aumento da porcentagem de linfócitos T auxiliares nos cistos periapicais de revestimento epitelial hiperplásico, principalmente em períodos de crescimento ativo (CURY et al., 1998). Assim, alguns acreditam que a intensidade e a composição celular do infiltrado inflamatório podem ter relação com a espessura do revestimento epitelial das lesões císticas periapicais.

Partindo deste pressuposto, avaliou-se a intensidade do infiltrado inflamatório e a espessura do revestimento epitelial, constatando-se que as lesões de revestimento epitelial atrófico tenderam a apresentar infiltrado inflamatório leve e moderado (66,7%), enquanto que as de revestimento epitelial hiperplásico possuíam intenso infiltrado inflamatório na maioria dos casos (72,2%), sem, contudo, haver associação estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ) entre a espessura do revestimento epitelial e a intensidade do infiltrado inflamatório. Este resultado concorda com o relatado por Moreira et al. (2000) no qual, em números absolutos, foi evidenciada menor quantidade de infiltrado inflamatório nos cistos periapicais com revestimento epitelial atrófico que nos cistos periapicais de revestimento epitelial hiperplásico, não ocorrendo diferença estatisticamente significativa.

Os estudos realizados sobre as lesões periapicais nas últimas décadas têm focado as reações imunológicas como determinantes para o metabolismo, principalmente no que se refere à indução da proliferação epitelial, à formação da cavidade cística e à degradação do osso circundante (FIGUEIREDO; SANTOS; ALBUQUERQUE JÚNIOR, 1999; TAKAHASHI, 1998; PIRES et al., 2007). Contudo, os mecanismos moleculares específicos envolvidos na formação do tecido de granulação e crescimento das lesões não foram ainda totalmente esclarecidos. Estudos recentes sobre a biologia das lesões periapicais destacaram a importância da angiogênese na patogênese das lesões periapicais crônicas, estando relacionada ao estabelecimento e manutenção da lesão, uma vez que os vasos sanguíneos neoformados suprem a contínua demanda de nutrientes e oxigênio pelas células em proliferação e contribuem para a inflamação por serem uma fonte constante de citocinas, quimiocinas e proteases, estando também relacionada ao reparo tecidual que segue a sua resolução (GRIFFOEN; MOLENA, 2000; MAJNO, 1998).

Por este motivo, estudou-se a vascularização em granulomas, cistos periapicais e cistos periapicais residuais, no intuito de comparar seus comportamentos no que tange os mecanismos envolvidos na indução da neoformação vascular e crescimento endotelial. De acordo com Graziani et al. (2006), a associação da mensuração vascular à expressão de fatores angiogênicos faz-se necessária para um melhor entendimento do papel da angiogênese no desenvolvimento das lesões periapicais.

Tem sido caracterizada uma ampla variedade de fatores angiogênicos, mas o VEGF tem sido universalmente aceito como um potente indutor de mitose das células endoteliais por atuar especificamente sobre receptores da superfície destas células, além de outros mecanismos favoráveis à angiogênese. Diversos estímulos presentes em processos patológicos, tais como o LPS, citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e hipóxia tecidual, podem induzir a produção deste fator angiogênico por células endoteliais, células epiteliais, macrófagos e fibroblastos (DVORAK et al., 1995; HANAHAN; FOLKMAN, 1996). Partindo deste pressuposto analisou-se a expressão do VEGF nas células do tecido conjuntivo dos granulomas periapicais, dos cistos periapicais e dos cistos periapicais residuais e no revestimento epitelial destas lesões císticas.

Foi observada expressão imuno-histoquímica de VEGF em todos os casos das lesões estudadas. A imunorreatividade pôde ser constatada em fibroblastos, macrófagos, células epiteliais e células endoteliais, concordando com os achados de Graziani et al. (2006). Contudo, Leonardi et al. (2003) evidenciaram imunorreatividade do VEGF nos fibroblastos e nas células inflamatórias apenas nos granulomas periapicais, mas não nos cistos periapicais.

A imunoexpressão do VEGF em fibroblastos e células inflamatórias observada neste estudo e por Graziani et al. (2006) é justificada devido ao fato destas células serem consideradas as principais fontes de síntese e secreção deste fator angiogênico (DVORAK et al., 1995; PEPPER, 1997) e à natureza proliferativa peculiar das lesões periapicais crônicas, caracterizada pela presença de elementos de reparação, como os fibroblastos, além da intensa reação de granulação rica em macrófagos (NEVILLE et al., 2004; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004). Os resultados diferentes encontrados por Leonardi et al. (2003) podem ser devidos ao reduzido tamanho da amostra (apenas 6 cistos periapicais), ao diferente anticorpo utilizado (anti-VEGF A-20, um anticorpo policlonal), e à avaliação semi-quantitativa

que pode determinar diferenças significativas.

Estes autores observaram que muitos vasos sanguíneos pequenos neoformados, distribuídos pelas lesões e especialmente concentrados nas regiões de intenso infiltrado inflamatório, exibiram expressão do VEGF, assim como também foi evidenciado neste estudo, fato que confirma o importante papel deste fator na indução da angiogênese nas lesões periapicais, assim como indicado para outras lesões, como nas hemorragias cerebrais (LEE et al., 2007), hemangiomas (TAKAHASHI, 1994; VAQUERO et al., 1999) e neoplasias malignas (ZHANG et al., 2006; ZHENG et al., 2006).

As medianas obtidas a partir da contagem das células imunomarcadas pelo anticorpo anti-VEGF não mostraram diferença estatisticamente significativa entre as lesões estudadas ( $p > 0.05$ ). No entanto, em termos absolutos houve maior número médio de células que expressaram o VEGF nas amostras de granulomas periapicais e cistos periapicais (564,9 e 565,0, respectivamente) que nos cistos periapicais residuais (443,9). O maior número médio de células do tecido conjuntivo imunopositivas para o VEGF nos granulomas periapicais e cistos periapicais contribui para a evidência de que estas lesões possuem maior atividade metabólica e potencial proliferativo, sendo tipicamente mais ativas e expansivas que os cistos periapicais residuais, conforme sugeriram Pulhez (2004), Suzuki et al. (2001) e Suzuki et al. (2002), uma vez que maior expressão do VEGF tem sido reportada em lesões na fase tipicamente proliferativa (TAKAHASHI et al., 1994).

Partindo da premissa que a atividade metabólica das lesões periapicais está relacionada com o grau de inflamação, analisou-se o número de células do tecido conjuntivo imunorreativas para o VEGF em relação à intensidade do infiltrado inflamatório. Lesões com intenso infiltrado inflamatório apresentaram maior mediana em relação ao número de células imunorreativas ao VEGF, em comparação com lesões com infiltrado inflamatório leve ou moderado. Este resultado foi estatisticamente significativo ( $p < 0.01$ ) e concorda com os estudos sobre a angiogênese das lesões periapicais que demonstraram relação positiva entre a expressão de fatores angiogênicos e a intensidade do infiltrado inflamatório (GRAZIANI et al., 2006; LEONARDI et al., 2003; MOLDAUER; VELEZ; KUTTLER, 2006; TETE' et al., 2005).

Esta observação confirma a importância relatada por Griffioen e Molena (2000) do VEGF nas lesões inflamatórias crônicas, no caso as periapicais mais

ativas, uma vez que as células do infiltrado inflamatório, ativadas e em proliferação, requerem contínua demanda de nutrientes e oxigênio e, para tanto, estimulam a produção e secreção do VEGF para indução da angiogênese. Além disso, o aumento da permeabilidade vascular promovida por este fator determina contínua migração das células inflamatórias e contribui para o aumento da intensidade do infiltrado inflamatório (GRAZIANI et al., 2006; LEONARDI et al., 2003).

No tocante à expressão do VEGF nas células epiteliais, Leonardi et al. (2003) verificaram forte imunorreatividade em todas as camadas do revestimento epitelial das lesões periapicais, característica igualmente observada neste estudo. A análise da expressão do VEGF no revestimento epitelial dos cistos revelou tendência a forte imunorreatividade tanto nos cistos periapicais (55%) quanto nos cistos periapicais residuais (70%), padrão observado também nos casos de epitélio atrófico (66,7%) e hiperplásico (55,6%), não havendo, contudo, diferença estatisticamente significativa na intensidade de expressão epitelial de VEGF entre os dois tipos de cistos ( $p>0.05$ ) e entre os cistos com revestimento epitelial atrófico e cistos com revestimento epitelial hiperplásico ( $p>0.05$ ).

Apesar dos cistos periapicais residuais se apresentarem como lesões de menor potencial proliferativo epitelial, conforme indicaram Suzuki et al. (2001), Suzuki et al. (2002) e Pulhez (2004), no presente estudo, foi observada forte expressão do VEGF no revestimento epitelial destas lesões, independente da espessura do revestimento cístico. Dessa forma, apesar do menor estímulo antigênico recebido e, conseqüentemente, inflamação menos intensa, a expressão de VEGF no revestimento epitelial dos cistos periapicais residuais em percentuais similares aos dos cistos periapicais, sugere a existência de um potencial de crescimento para estas lesões.

Os resultados obtidos neste, em adição aos dos outros estudos das lesões periapicais (GRAZIANI et al., 2006; LEONARDI et al., 2003) e de outras lesões císticas (SATO et al., 1997; VAQUERO et al., 1999), reforçam a participação do VEGF na patogênese dos granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais. O VEGF expresso pelos fibroblastos, células inflamatórias, endoteliais e epiteliais destas lesões contribui para a manutenção e a expansão das lesões periapicais por diversos mecanismos. Além de estimular a formação de novos vasos, aumentando o suprimento de oxigênio, ocasiona permeabilidade vascular persistente em vasos pré-existentes, permitindo a deposição de matriz rica em

fibrina necessária para a migração celular, acúmulo de células inflamatórias, e, mais tardiamente, de fluido na cavidade cística (GRAZIANI et al., 2006; LEONARDI et al., 2003). Adicionalmente, o VEGF também contribui para o desenvolvimento das lesões periapicais auxiliando no processo de reabsorção óssea e atuando diretamente no recrutamento de osteoclastos (TETE' et al., 2005).

É interessante ressaltar que muitas moléculas envolvidas na indução da expressão do VEGF, tais como a IL-1, a IL-8, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , também têm sido reportadas em níveis aumentados nas lesões periapicais (BANDO et al., 1993; MEGHJI et al. 1996; STASHENKO et al., 1994; TAKAHASHI, 1998; TORABINEJAD, 1994). Desta forma, a ação de outros fatores, como as proteases e citocinas, no desenvolvimento e evolução destas lesões não deve ser desprezada, já que intensificam a resposta tecidual à ação deste fator angiogênico.

A mensuração vascular é considerada um valioso indicador do potencial angiogênico das lesões periapicais (GRAZIANI et al., 2006). Embora haja opiniões conflitantes em relação à indicação do marcador imuno-histoquímico que ofereça melhores resultados na quantificação da angiogênese, os anticorpos anti-CD31 e anti-FvW são os mais recomendados na literatura (FREITAS et al., 2005; GLEICH et al., 1997; JACQUEMIER et al., 1998; PAZOUKI et al., 1997; SHOR et al., 1998; SION-VARDY et al., 2001; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007; TAKAHASHI et al., 1994; TOMODA et al., 1999). Destes, o anticorpo anti-FvW tem apresentado melhores resultados por determinar imunomarcacão mais uniforme e de mais fácil interpretação (FREITAS et al., 2005; GLEICH et al., 1997; SION-VARDY et al., 2001; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007) e por esta razão optou-se pela utilização deste anticorpo para quantificação da vascularização neste experimento.

Todos os espécimes de granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais exibiram marcação positiva para o anticorpo anti-FvW. Foi identificada imunorreatividade ao anticorpo anti-FvW em células endoteliais de vasos sangüíneos com lúmen conspícuo, bem como em brotamentos capilares de lúmens pouco distintos, corroborando a literatura pertinente que afirma ter o anticorpo anti-FvW afinidade específica por epítomos da célula endotelial, além de megacariócitos (DAKO, 2003; GLEICH et al., 1997; SCHOR et al., 1998; TAKAHASHI et al., 1994).

No que diz respeito às técnicas para a quantificação da angiogênese, os estudos destacam a da densidade microvascular (MVD, do inglês *microvessel density*), a do volume microvascular (MVV, do inglês *microvascular volume*) e a da

contagem microvascular (MVC, do inglês *microvessel count*) (FREITAS et al., 2005; MAEDA et al., 1995; MARINHO et al., 1997; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007; PAZOUKI et al., 1997; SCHOR et al., 1998).

A técnica do MVV, apesar de bastante sensível, é mais trabalhosa e tem sido utilizada como indicador prognóstico para cânceres em estágio precoce (PAZOUKI et al., 1997), não se aplicando, desta forma, ao estudo em questão. Segundo Freitas et al. (2005), a MVC é um método de mensuração da angiogênese mais simples e que não apresenta diferença estatisticamente significativa entre a mensuração realizada pela MVD. Dessa forma, a MVC foi adotada neste estudo, por ser um método de quantificação da vascularização mais rápido, de fácil realização, simples e eficaz, conforme demonstrado em trabalhos anteriores (FREITAS et al., 2005; MARINHO et al., 1997; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007).

Na contagem dos vasos que expressavam o FvW, o número médio de vasos imunorreativos nos granulomas periapicais foi 210,4, nos cistos periapicais 250,8 e nos cistos periapicais residuais foi 217,0. Apesar de um maior número médio de vasos imunomarcados pelo anticorpo anti-FvW em cistos periapicais, a comparação das medianas demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p>0.05$ ), indicando, desta maneira, que a vascularização é importante na manutenção das lesões periapicais crônicas, independente do tipo de lesão, assim como também demonstraram Tete' et al. (2005).

Levando em consideração o fato de que a intensidade do infiltrado inflamatório é capaz de influenciar significativamente o processo de angiogênese em lesões periapicais, conforme comentado anteriormente, analisou-se neste estudo o número de vasos imunomarcados pelo anticorpo anti-FvW em relação à intensidade do infiltrado inflamatório. Lesões com intenso infiltrado inflamatório apresentaram maior mediana em relação ao número de células imunorreativas ao FvW, em comparação com lesões com infiltrado inflamatório leve e moderado. Contudo, este resultado não foi estatisticamente significativo ( $p>0.05$ ). Entretanto, quando foram os casos que apresentavam infiltrado inflamatório leve e moderado foram agrupados, observou-se que a mediana deste grupo para o número de vasos imunomarcados era inferior à mediana das lesões com intenso infiltrado inflamatório ( $p<0.05$ ).

Neste aspecto, os resultados deste estudo concordam com os relatos da literatura que indicam neoformação vascular aumentada em espécimes que apresentam maior severidade de inflamação nas lesões periapicais (GRAZIANI et

al., 2006; TETE' et al., 2005). Este achado reforça o papel modulador do infiltrado inflamatório sobre a atividade angiogênica destas lesões.

A maior vascularização observada nas lesões de maior severidade de infiltrado inflamatório, somada ao fato dos cistos periapicais terem apresentado, na análise imuno-histoquímica, em números absolutos, maior quantidade de vasos, e, na análise morfológica, infiltrado inflamatório predominantemente intenso, contribui para a argumentação de que estas lesões representam processos biologicamente mais ativos e de maior potencial proliferativo que os cistos periapicais residuais, como sugerido por Suzuki et al. (2001), Suzuki et al. (2002) e Pulhez (2004).

Embora a mensuração da vascularização em espécimes teciduais seja considerada um bom indicador do potencial angiogênico nas lesões periapicais (GRAZIANI et al., 2006), os marcadores utilizados rotineiramente (anti-CD31 e anti-FvW) falham por não diferenciarem os vasos neoformados dos vasos pré-existentes (GLEICH et al., 1997; SCHOR et al., 1998). A evidência neste estudo de imunoexpressão do FvW em brotamentos capilares, além das células endoteliais de vasos sangüíneos com lúmen conspícuo, sugere a ocorrência da angiogênese nas lesões estudadas, uma vez que a presença de uma rede vascular está relacionada ao grau de angiogênese, pois novas estruturas vasculares podem se originar a partir destes brotamentos através de um processo germinativo (FOLKMAN; SHING, 1992). Apesar disto, para obter resultados mais fidedignos, relacionou-se nesta pesquisa a imunoexpressão do VEGF, cuja principal função é a indução à angiogênese, com a MVC.

Com o intuito de avaliar se a expressão do FvW exibia correlação significativa com a expressão do VEGF nos espécimes de granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais, o teste de correlação de Spearman foi aplicado nos resultados apresentados pela amostra em questão. Os resultados mostraram que não houve correlação entre a quantidade de células que expressaram o VEGF e o número de vasos que exibiram expressaram do FvW ( $r=0.224$ ;  $p=0.118$ ).

Discordaram deste resultado, Graziani et al. (2006) que observaram vascularização aumentada associada à maior expressão de VEGF pelas células do tecido conjuntivo dos cistos periapicais. É possível que esta discrepância dos resultados seja causada pela diferença metodológica especialmente no que diz respeito ao critério utilizado para mensurar a imunoexpressão do VEGF (semi-

quantitativo), além de diferença quanto ao anticorpo empregado para a marcação dos vasos sanguíneos (anti-CD34), fatores que podem influenciar na mensuração da angiogênese segundo Schor et al. (1998).

Apesar de poucos, os estudos indicam que a angiogênese desempenha um papel fundamental no estabelecimento e desenvolvimento das lesões periapicais (GRAZIANI et al., 2006; LEONARDI et al., 2003; TETE' et al., 2005). As células endoteliais pré-existentes nestas lesões são induzidas à proliferação, migração e formação de novos vasos sanguíneos pelos fatores angiogênicos, principalmente o VEGF, secretados em resposta às citocinas geradas pelo processo inflamatório (DVORAK et al., 1995). Contudo, somente a indução à angiogênese não é suficiente para que a neoformação vascular ocorra efetivamente (HAAS et al., 2000; HAAS; MADRI, 1999; MOSES, 1997; RUNDHAUG, 2003).

A atividade proteolítica desempenha um importante papel durante a angiogênese, uma vez que a migração das células endoteliais através da membrana pericapilar, a fragmentação da membrana basal que precede este evento e a subsequente migração das células endoteliais pela MEC do tecido que está sendo neovascularizado são alguns dos eventos angiogênicos dependentes da proteólise, sendo esta comandada pelas MMPs (MOSES, 1997; PEPPER, 2001).

As MMPs são uma família de endopeptidases que coletivamente, são capazes de degradar a maior parte dos componentes da matriz extracelular, determinando sua proteólise e remodelação (MOTT; WERB, 2004; SORSA; VISSE; NAGASE, 2003). Na angiogênese, contribuem de várias maneiras: liberando fatores angiogênicos seqüestrados na MEC, facilitando a migração das células endoteliais pelos tecidos adjacentes através da interrupção das barreiras físicas da MEC e permitindo que os brotamentos vasculares se formem devido à degradação da membrana basal de vasos sanguíneos (HAAS et al., 2000; KENAGY et al., 1997; PEPPER, 2001; RUNDHAUG, 2003; STERNLICHT; WERB, 2001; VALABLE et al., 2005; ZHANG et al., 2006).

As principais MMPs envolvidas na remodelação da membrana basal vascular são as gelatinases uma vez que estas proteases têm como substrato o colágeno tipo IV e a laminina, componentes da membrana basal de vasos sanguíneos. Assim, promovem a degradação necessária ao brotamento vascular induzido pelos fatores angiogênicos (ASAHI et al., 2001; KENAGY et al., 1997; LEE et al., 2007; VALABLE et al., 2005; WANG; KEISER, 1998).

Além da remodelação da membrana basal vascular, a MMP-9 desempenha outro importante papel funcional na angiogênese, pois a clivagem proteolítica do colágeno tipo IV por ela promovida culmina em exposição de um sítio crítico somente evidenciado em vasos sanguíneos em proliferação, cuja ligação à integrina  $\alpha_v\beta_3$  é essencial para que ocorra a angiogênese. Estudos demonstraram que na ausência da MMP-9 ocorre redução da exposição destes sítios e conseqüente redução da neoformação vascular em aproximadamente 75%, enquanto que a redução promovida pela ausência da MMP-2 é mínima. Desta maneira, acredita-se que a MMP-9 seja a principal responsável pela exposição destes sítios críticos para o estabelecimento da neovascularização (HANGAI et al., 2002; XU et al., 2001).

A grande evidência da associação da MMP-9 no processo de angiogênese encontra-se nos estudos que demonstraram que o bloqueio de sua atividade por seus inibidores seletivos naturais ou sintéticos determina inibição da migração celular endotelial (BERGERS et al., 2000; BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005; FODA; ZUCKER, 2001; IURLARO et al., 1999; KENAGY et al., 1997; KOIVUNEN et al., 1999; LEE et al., 2007; VU et al., 1998; ZHENG et al., 2006).

Diversos estudos têm demonstrado efetivo aumento da expressão da MMP-9 em condições que requerem neoformação vascular como as tumorais, degenerativas, vasculares, inflamatórias e infecciosas (BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005; LEE et al., 2007; TSAI et al., 2003; TSAI et al., 2005; VICENTE et al., 2005), inclusive nas enfermidades orais, como a cárie dental, pulpite, doenças periodontais, perimplantares e tumorais (CHANG et al., 2002; CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; O'BOSKEY; PANAGAKOS, 1998; PINHEIRO et al., 2004; SOUZA; LINE, 2002; TJÄDERHANE et al., 1998; TSAI et al., 2003; TSAI et al., 2005; VICENTE et al., 2005).

Estudos recentes sobre a biologia das lesões periapicais também destacam a atuação das MMPs, na patogênese das lesões periapicais, atuando ativamente na regulação da proliferação epitelial e migração do tecido epitelial, na degradação tecidual e remodelação da cápsula fibrosa e da parede cística, bem como nos mecanismos de expansão inerentes destas lesões, solubilizando a matriz óssea e regulando o início da reabsorção (KUBOTA et al., 2000; LEONARDI; CALTABIANO; LORETO, 2005; LIN et al., 1997; LIN et al., 2002; SHIN et al., 2002; SILVEIRA et al., 2007; SOARES et al., 2007; TERONEN et al., 1995a, TERONEN et al., 1995b; WAHLGREN et al., 2001; WAHLGREN et al., 2002; WAHLGREN et al., 2003).

Contudo, a despeito desta grande quantidade de artigos relacionando as MMPs e a patogênese das lesões periapicais, além do reconhecido papel da MMP-9 na angiogênese (ASAHI et al., 2001; KENAGY et al., 1997; LEE et al., 2007; VALABLE et al., 2005; WANG; KEISER, 1998), não são encontrados estudos na literatura, envolvendo estas proteases na patogênese de lesões periapicais no que diz respeito à remodelação de membrana basal de vasos sanguíneos durante a angiogênese.

Neste contexto, por serem as lesões periapicais crônicas processos inflamatórios que requerem neoformação vascular, realizou-se neste estudo uma análise imuno-histoquímica da expressão da MMP-9 pelas células endoteliais dos granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais no intuito de verificar a participação desta enzima em sua patogênese, principalmente no que diz respeito à angiogênese.

Todos os casos de granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais apresentaram imunoexpressão de MMP-9. Foi possível identificar imunorreatividade em células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos), fibroblastos e células endoteliais de vasos sanguíneos. Além disso, houve marcação variável na matriz extracelular e nas células epiteliais do revestimento de cistos periapicais, corroborando os achados de Kubota et al. (2000) e Silveira et al. (2007), e cistos periapicais residuais, assim como também evidenciaram Silveira et al. (2007). Estes autores apontaram a influência da MMP-9 no crescimento epitelial nas lesões periapicais, mas nada inferiram no tocante à angiogênese. Contudo, Wang e Keiser (1998) chamaram atenção para o fato de que a localização da MMP-9 nas células endoteliais, conforme observado neste estudo, indica seu papel espacialmente controlado na degradação da membrana basal subendotelial, e isto é um passo crucial no estágio inicial da angiogênese.

A avaliação semi-quantitativa revelou marcada tendência à forte expressão da MMP-9 nas células endoteliais na maioria dos casos de granulomas periapicais (70%) e cistos periapicais (70%). Por sua vez, os cistos periapicais residuais exibiram fraca expressão da MMP-9 no endotélio na maior parte de sua amostra (60%). Esta diferença no padrão de expressão da MMP-9 pelas células endoteliais observada entre os granulomas periapicais e cistos periapicais e os cistos periapicais residuais reflete o metabolismo distinto entre estas lesões, o que também foi sugerido por Silveira et al. (2007) ao evidenciarem diferente padrão de

imunomarcção de algumas MMPs nos cistos periapicais e cistos periapicais residuais.

É possível que haja uma associação da expressão de MMP-9 em relação às fases de desenvolvimento das lesões periapicais, levando em consideração que os granulomas periapicais, os cistos periapicais e os cistos periapicais residuais representam fases distintas do mesmo processo patológico. O fato dos cistos periapicais residuais expressarem fracamente a MMP-9 nas células endoteliais na maior parte de sua amostra pode ter relação com a menor atividade proliferativa destas lesões, sugerida por Suzuki et al. (2001), Suzuki et al. (2002) e Pulhez (2004), em relação aos granulomas periapicais e cistos periapicais, uma vez que para o processo de crescimento destas lesões, a angiogênese assume primordial importância, havendo necessidade de ruptura da membrana basal vascular, com clivagem de proteínas que são o substrato preferencial da MMP-9, como o colágeno tipo IV, segundo Asahi et al. (2001), Björklund e Koivunen (2005); Kenagy et al. (1997), Lee et al. (2007), Valable et al. (2005), Wang e Keiser (1998) e Xu et al. (2005).

A MMP-9 diferencia-se por sua expressão altamente regulada, não sendo sintetizada constitutivamente como a MMP-2 mas, induzida por um acionamento adequado, o qual pode ser fornecido pelas células inflamatórias, através de associação direta entre as células, por exemplo, linfócitos e monócitos, ou da secreção de citocinas, como a IL-1, o TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ . Adicionalmente, alguns tipos de leucócitos podem ativar quimicamente a MMP-9, removendo o grupamento sulfidrila-cisteína no pró-domínio (MATTU et al., 2000, OPDENAKKER; VAN DEN STEEN; VAN DAMME, 2001; XU et al., 2005).

Neste contexto, realizou-se análise da expressão da MMP-9 nas células endoteliais em relação à intensidade do infiltrado inflamatório, a qual revelou associação significativa entre a forte imunoexpressão de MMP-9 em células endoteliais e a presença de intenso infiltrado inflamatório. Do total das lesões que apresentaram leve infiltrado inflamatório a maior parte da amostra (80%) exibiu fraca expressão da MMP-9 nas células endoteliais. Por outro lado, as lesões de moderado infiltrado inflamatório tenderam a forte expressão da MMP-9 (55,6%), assim como as lesões de intenso infiltrado inflamatório (72,2%). Agrupando-se os casos que apresentaram infiltrado inflamatório leve e moderado e comparando-os com os de intenso infiltrado inflamatório, a análise estatística revelou valor de  $p=0,055$ , o qual

pode ser considerado como situado no limiar da significância estatística.

Estes resultados contribuem para a determinação de maior atividade proliferativa nos granulomas periapicais e cistos periapicais em relação aos cistos periapicais residuais, uma vez que as lesões de intenso infiltrado inflamatório, representadas caracteristicamente pelos granulomas periapicais e cistos periapicais no estudo morfológico, exibiram forte imunexpressão da MMP-9. Vale ressaltar o fato de que alguns estudos têm relacionado a expressão aumentada da MMP-9 com a expansão e reabsorção óssea das lesões periapicais, sendo esta protease essencial na completa degradação do colágeno da matriz óssea não mineralizada, atividade associada à clivagem inicial realizada pela MMP-1 (OKADA et al., 1995; TERONEN et al., 1995b).

Além da indução pelas células inflamatórias e suas citocinas, tem sido demonstrado que fatores angiogênicos determinam aumento da expressão da MMP-9 (HOLBORN et al., 2007; LEE et al., 2007; VALABLE et al., 2005; WANG; KEISER, 1998; ZHENG et al., 2006). No presente estudo, avaliando-se a expressão da MMP-9 em células endoteliais em relação ao número de células imunopositivas para o VEGF, verificou-se que lesões com forte imunexpressão de MMP-9 apresentaram maior número de células imunopositivas para o VEGF que as lesões que exibiram fraca ou moderada expressão da MMP-9 ( $p < 0.01$ ), corroborando os relatos da literatura supramencionados.

Na verdade, segundo Holborn et al. (2007), no tocante à relação da MMP-9 com o VEGF, há um *feedback* positivo entre as duas moléculas em condições de hipóxia, como a encontrada nas lesões periapicais crônicas. O VEGF induz à expressão gênica da MMP-9 pelas células endoteliais por meio de uma sinalização autócrina e, da mesma forma, a MMP-9 determina aumento da expressão do VEGF pela estimulação da sua transcrição gênica e secreção. Esta relação entre a MMP-9 e o VEGF também foi indicada por Bergers et al. (2000), Belotti et al. (2003), Lee et al. (2007), Valable et al. (2005) e Wang e Keiser (1998).

Desta maneira, pode-se sugerir que a MMP-9 favorece a angiogênese nas lesões periapicais não somente pela remodelação da membrana basal dos vasos sanguíneos, mas também pela indução da síntese e secreção de potentes fatores angiogênicos indutores da proliferação endotelial. Adicionalmente, ao realizar a proteólise da MEC, a MMP-9 libera VEGF e ativa TGF- $\beta$  produzidos pelas células ativadas pelo estímulo angiogênico, que estavam seqüestrados na MEC (HAAS et

al., 1999; HAAS; MADRI, 1999; ODA et al., 1999). Por sua vez, estes fatores angiogênicos induzem alterações nas células endoteliais, as quais aumentam a expressão dos fatores transcricionais, de algumas MMPs (MT1-MMP, MMP-1, MMP-3 e MMP-9), de subunidades de integrinas ( $\beta_3$ ) e de receptores, como o CD40. Uma vez reconhecidos pelas células T abundantes em processos inflamatórios crônicos, estes receptores determinam aumento da ativação da MMP-2, indução à síntese e secreção da MMP-9 e aumento da expressão da MMP-1 e MMP-3 intersticiais, favorecendo a angiogênese (BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005; STERNLICHT; WERB, 2001; YU; STAMENKOVIC, 2000).

Apesar de diversos trabalhos ressaltarem a importância das MMPs para a angiogênese, os estudos encontrados na literatura sobre a vascularização das lesões periapicais não avaliaram a relação das MMPs neste processo.

A análise da intensidade de expressão de MMP-9 em células endoteliais em relação ao número de vasos sanguíneos imunomarcados com o anticorpo anti-FvW revelou que lesões com forte imunoexpressão de MMP-9 em células endoteliais apresentaram maior número de vasos imunomarcados com anticorpo anti-FvW que as lesões com fraca ou moderada imunorreatividade a este anticorpo ( $p=0,051$ ). Este resultado indica o importante papel da MMP-9 na neoformação vascular das lesões periapicais, processo essencial para o estabelecimento e desenvolvimento destas lesões.

Em conjunto, os resultados do presente estudo revelam uma importante influência da intensidade do infiltrado inflamatório sobre o número de vasos sanguíneos, a expressão de MMP-9 em células endoteliais e a expressão de VEGF em células do tecido conjuntivo, em todos os espécimes estudados. Em virtude do maior desafio antigênico, granulomas periapicais e cistos periapicais revelam maior expressão de VEGF e MMP-9, bem como maior número de vasos, em comparação com cistos periapicais residuais. Coerentemente, tais achados concordam com a existência de um ambiente metabolicamente mais ativo em granulomas periapicais e cistos periapicais, sugerindo uma maior capacidade de crescimento e expansão nestas lesões.

Apesar da menor expressão de VEGF e da menor quantidade de vasos, os resultados obtidos nesta pesquisa revelam a existência de um potencial de crescimento para os cistos periapicais residuais. Em decorrência da forte expressão de VEGF nas células do revestimento epitelial dos cistos periapicais residuais, é

possível que este componente atue como mantenedor de um status de permeabilidade vascular aumentada nestas lesões, favorecendo o acúmulo de líquido no interior da cavidade cística. Desta forma, a expressão epitelial de VEGF nos cistos periapicais residuais não apresentaria, como papel principal, estímulo à formação de novos vasos sanguíneos.

É importante ressaltar que os resultados obtidos neste estudo impõem limitações para inferências mais conclusivas a respeito da angiogênese nas lesões periapicais. Mais estudos devem ser conduzidos, empregando outros fatores de crescimento vascular, para melhor entendimento da complexidade do processo de angiogênese no desenvolvimento e evolução das lesões periapicais, o que poderá sugerir novas oportunidades terapêuticas para estas lesões.

## 7 CONCLUSÕES

Com base na metodologia delineada para o presente experimento, pode-se concluir:

- a) o VEGF pode atuar como importante estímulo à expressão de MMP-9 em células endoteliais de vasos sanguíneos, influenciando o processo de angiogênese em granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais;
- b) a maior quantidade de vasos em lesões com forte expressão de MMP-9 em células endoteliais ( $p < 0.01$ ), sugere participação importante desta protease no processo de angiogênese nas lesões estudadas;
- c) a intensidade do infiltrado inflamatório desempenha importante influência no número de vasos sanguíneos, identificados através da expressão do FvW, na expressão de MMP-9 em células endoteliais e na expressão de VEGF em células do tecido conjuntivo, nas lesões do presente estudo;
- d) a forte expressão do VEGF no revestimento epitelial dos cistos periapicais residuais sugere a existência de um potencial de crescimento nestas lesões, provavelmente em virtude da manutenção de um status de permeabilidade vascular aumentada.

## REFERÊNCIAS

AIMES, R. T.; QUIGLEY, J. Q. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. *J Biol Chem*, v. 270, n. 11, p. 5872-5876, Mar. 1995.

ALBERTS, B. et al. Junções celulares, adesão celular e a matriz extracelular. In: \_\_\_\_\_. *Biologia molecular da célula*. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. cap. 19, p. 949-1009.

ASAHI M. et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci*, v. 21, n. 19, p. 7724-7732, Oct. 2001.

BAKER, A. H.; EDWARDS, D. R.; MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Science*, v. 115, n. 19, p. 3719-3727, Oct. 2002.

BANDO, Y. et al. Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts. *J Oral Pathol Med*, v. 22, n. 5, p. 221-227, May 1993.

BANNIKOV, G. A. et al. Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide. *J Biol Chem*, v. 277, n. 18, p. 16022-16027, May 2002.

BARKHORDAR, R. A.; DESOUZA, Y. G. Human T-lymphocyte subpopulations in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 65, n. 6, p. 763-766, June 1988.

BARROS, S. S. L. V. *Expressão imuno-histoquímica de metaloproteínas em carcinoma epidermóide de lábio inferior e língua*. 2006. 128 f. Tese (Doutorado). Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

BEIN, K.; SIMONS, M. Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J Biol Chem*, v. 275, n. 41, p. 32167-32173, Oct. 2000.

BELLON, G.; MARTINY, L.; ROBINET, A. Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*, v. 49, n. 3, p. 203-220, Mar. 2004.

BELOTTI, D. et al. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Res*, v. 63, n. 17, p. 5224-5229, Sept. 2003.

BERGERS, G. et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*, v. 2, n. 10, p. 737-744, Oct. 2000.

BJÖRKLUND, M.; KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, v. 1755, n. 1, p. 37-69, May 2005.

BODE, W.; FERNANDEZ-CATALAN, C.; TSCHESCHE, H. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci*, v. 55, n. 4, p. 639-652, Apr. 1999.

BORKAKOTI, N. Structural studies of matrix metalloproteinases. *J Mol Med*, v. 78, n. 5, p. 261-268, July 2000.

BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, v. 1477, n. 1-2, p. 267-283, Mar. 2000.

BROOKS, P. C.; CLARK, R. A. CHERESH, D. A. Requirement of vascular integrin  $\alpha_v\beta_3$  for angiogenesis. *Science*, v. 264, n. 5158, p. 569-571, Apr. 1994.

BROOKS, P. C. et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin  $\alpha_v\beta_3$ . *Cell*, v. 85, n. 5, p. 683-693, May 1996.

BROOKS, P. C. et al. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell*, v. 92, n. 3, p. 391-400, Feb. 1998.

CHANG, Y. et al. Stimulation of matrix metalloproteinases by black-pigmented *bacteroides* in human pulp and periodontal ligament cell cultures. *J Endod*, v. 28, n. 2, p. 90-93, Feb. 2002.

CHAUSSAIN-MILLER, C. et al. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res*, v. 85, n. 1, p. 22-32, Jan. 2006.

CHIAPASCO, M. Spontaneous bone regeneration after enucleation of large mandibular cysts: a radiographic computed analysis of 27 consecutive cases. *J Oral Maxillofac Med*, v. 58, n. 9, p. 942-948, Sept. 2000.

CORNELIUS, L. A. et al. Metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol*, v. 161, n. 12, p. 6845-6852, Dec. 1998.

CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their role in tumor invasion and metastasis. *Eur J Canc*, v. 36, n. 13, p. 1621-1630, Aug. 2000.

CURY, V. C. F. et al. Immunohistochemical study of apical periodontal cysts. *J Endod*, v. 24, n. 1, p. 36-37, Jan. 1998.

DAKO. *Monoclonal mouse anti-human von Willebrand factor*. 2003. Disponível em: <[http://www.dakousa.com/prod\\_downloadpackageinsert.pdf?objectid=104615002](http://www.dakousa.com/prod_downloadpackageinsert.pdf?objectid=104615002)>. Acesso em: 16 abr. 2008, 15:44.

DALES, J. P. et al. Long-term prognostic significance of neoangiogenesis in breast carcinomas: comparison of Tie-2 /Tek, CD-105 e CD-31 immunocytochemical expression. *Hum Pathol*, v. 35, n. 2, p. 176-183, Feb. 2004.

DANTAS, C. J. S. Reparação tecidual: aspectos celulares e moleculares. In: SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; DANTAS, C. J. S. *Mecanismos celulares e moleculares da inflamação*. São Paulo: Medsi, 2000a. cap. 16, p. 173-196.

DANTAS, C. J. S. Reparação tecidual: aspectos biodinâmicos. In: SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; DANTAS, C. J. S. *Mecanismos celulares e moleculares da inflamação*. São Paulo: Medsi, 2000b. cap. 17, p. 197-225.

DELAISSÉ, J. M. et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta*, v. 291, n. 2, p. 223-234, Feb. 2000.

DERYUGINA, E. I. et al. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin  $\alpha\beta 3$  promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res*, v. 263, n. 2, p. 209–223, Feb. 2001.

DIMITROULIS, G.; CURTIN, J. Massive residual dental cyst: case report. *Aust Dent J*, v. 43, n. 4, p. 234-237, Aug. 1998.

DVORAK, H. F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*, v. 146, n. 5, p. 1029-1039, May 1995.

ELICEIRI, B. P.; CHERESH, D. A. The role of  $\alpha_v$  integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest*, v. 103, n. 9, p. 1227-1230, May 1999.

FANG, J. et al. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 97, n. 8, p. 3884-3389, Apr. 2000.

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. *Rev Pós Grad*, v. 6, n. 2, p. 180-187, abr./jun. 1999.

FODA, H. D.; ZUCKER, S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Disc Today*, v. 6, n. 9, p. 478-482, May 2001.

FOLKMAN, J. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston: clinical applications of research on angiogenesis. *N Eng J Med*, v. 333, n. 26, p. 1757-1753, Dec. 1995.

FOLKMAN, J.; D'AMORE, P. A. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*, v. 87, n. 7, p. 1153-1155, Dec. 1996.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. *J Biol Chemistry*, v. 267, n. 16, p.110931-110934, June 1992.

FREITAS, T. M. et al. Assessment of angiogenic markers in oral hemangiomas and pyogenic granulomas. *Exp Mol Pathol*, v. 79, n. 1, p. 79-85, Aug. 2005.

FRIDMAN, R. et al. Cell surface association of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Cancer Metastasis Rev*, v. 22, n. 2-3, p. 153-166, June 2003.

FRIEDLANDER, M. et al. Definition of two angiogenic pathways by distinct Alpha v integrins. *Science*, v. 270, n. 5241, p. 1500-1502, Dec. 1995.

GAO, Z. et al. Immunocytochemical examination of immune cells in periapical granulomata and odontogenic cysts. *J Oral Pathol*, v. 17, n. 2, p. 84-90, Feb. 1988.

GAO, Z.; FLAITSZ, C. M.; MACKENZIE, L. C. Expression of keratinocyte growth factor in periapical lesions. *J Dent Res*, v. 75, n. 9, p. 1658-1663, Sept. 1996.

GLEICH, L. L. et al. Tumor angiogenesis as a prognostic Indicator in t2-t4 oral cavity squamous cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation. *Head Neck*, v. 19, n. 4, p. 276-280, July 1997.

GUEDEZ, L. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 alters the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma via divergent effects on tumor growth and angiogenesis. *Am J Pathol*, v. 158, n. 4, p. 1207-1215, Apr. 2001.

GOLUB, L. M. et al. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflamm Res*, v. 46, n. 8, p. 310-319, Aug. 1997.

GONZÁLEZ, S. et al. Avances en la estructura y función de la membrana basal. *Dermatol Chile*, v. 10, n. 3, p. 181-184, 1994.

GRAZIANI, F. et al. Microvessel density and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human radicular cysts. *Am J Dent*, v. 19, n. 1, p.11-14, Feb. 2006.

GRIFFOEN, A. W.; MOLEMA, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases and chronic inflammation. *Pharmacol Rev*, v. 52, n. 2, p. 237-268, June 2000.

GRUPTA, K. et al. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp Cell Res*, v. 247, n. 2, p. 495-505, Mar. 1999.

HAAS, T. L.; DAVIS, S. J.; MADRI, J. A. Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*, v. 273, n. 6, p. 3604-3610, Feb. 1998.

HAAS, T. L. et al. Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *J Biol Chem*, v. 274, n. 32, p. 22679-22685, Aug. 1999.

HAAS, T. L. et al. Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 279, n. 4, p. H1540-H1547, Oct. 2000.

HAAS, T. L.; MADRI, J. A. Extracellular matrix-driven matrix metalloproteinase production in endothelial cells: implications for angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, v. 9, n. 3-4, p. 70-77, Apr./May 1999.

HAJITOU, A. et al. Down-regulation of vascular endothelial growth factor by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: effect on *in vivo* mammary tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res*, v. 61, n. 8, p. 3450-3457, Apr. 2001.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, v. 68, n. 3, p. 353-364, Aug. 1996.

HANGAI, M. et al. Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis. *Am J Pathol*, v. 161, n. 4, p. 1429-1437, Oct. 2002.

HIGH, A. S.; HIRSCHMANN, P. N. Age changes in residual radicular cysts. *J Oral Pathol*, v. 15, n. 10, p. 524-528, Nov. 1986.

HIGH, A. S.; HIRSCHMANN, P. N. Symptomatic residual radicular cysts. *J Oral Pathol*, v. 17, n. 2, p. 70-72, Feb. 1988.

HIRAOKA, N. et al. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell*, v. 95, n. 5, p. 365-377, Oct. 1998.

HOLBORN, M. et al. Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 48, n. 9, p. 4360-4367, Sept. 2007.

IKEBE, T. et al. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis*, v. 17, n. 4, p. 315-323, June 1999.

ITOH, T. et al. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res*, v. 58, n. 5, p. 1048-1051, Mar. 1998.

IURLARO, M. et al. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Eur J Clin Invest*, v. 29, n. 9, p. 793-801, Sept. 1999.

JACQUEMIER, J. D. et al. Angiogenesis as a prognostic marker in breast carcinoma with conventional adjuvant chemotherapy: a multiparametric and immunohistochemical analysis. *J Pathol*, v. 184, n. 2, p. 130-135, Feb. 1998.

JOHN, A.; TUSZYNSKY, G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res*, v. 7, n. 1, p. 14-23, 2001.

JONES, A. V.; CRAIG, G. T.; FRANKLIN, C. D. Range and demographics cysts diagnosed in a UK population over 30-year period. *J Oral Pathol Med*, v. 35, n. 8, p. 500-507, Sept. 2006.

JORDAN, R. C. K. et al. Advanced diagnostic methods in oral and maxillofacial pathology. Part II: immunohistochemical and immunofluorescent methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 93, n. 1, p. 56-74, Jan. 2002.

KENAGY, R. D. et al. Primate smooth muscle cell migration from aortic explants is mediated by endogenous platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor acting through matrix metalloproteinases 2 and 9. *Circ*, v. 96, n. 10, p. 3555-3560, Nov. 1997.

KIM, Y. M. et al. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase 2. *Cancer Res*, v. 60, n. 19, p. 5410-5413, Oct. 2000.

KOIVUNEN, E. et al. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat Biotech*, v.17, n. 19, p. 768-774, Aug. 1999.

KONTIAINEN, S.; RANTA, H.; LAUTENSCHLAGER, I. Cells infiltrating human periapical inflammatory lesions. *J Oral Pathol*, v. 15, n. 10, p. 544-546, Nov. 1986.

KOPP, W.; SCHWARTING, R. Differentiation of T lymphocyte subpopulations, macrophages, and HLA-DR-restricted cells of apical granulation tissue. *J Endod*, v. 15, n. 2, p. 72-75, Feb. 1989.

KRÄLING, B. M. et al. The role of matrix metalloproteinase activity in the maturation of human capillary endothelial cells in vitro. *J Cell Sci*, v. 112, n. 10, p. 1599–1609, May 1999.

KUBOTA, Y. et al. Interleukin-1 $\alpha$ -dependent regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion and activation in the epithelial cells of odontogenic jaw cysts. *J Dent Res*, v. 79, n. 6, p. 1423-1430, June 2000.

LABAT-ROBERT, J. Cell-matrix interactions in aging: role of receptors and matricryptins. *Ageing Res Rev*, v. 3, n. 2, p. 233-247, Apr. 2004.

LAMOREAUX, W. J. et al. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decrease release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells *in vitro*. *Microvasc Res*, v. 55, n.1, p. 29-42, Jan. 1998.

LEE, C. Z. et al. Matrix metalloproteinase-9 inhibition attenuates vascular endothelial growth factor-induced intracerebral hemorrhage. *Stroke*, v. 38, n. 9, p. 2563-2568, Sept. 2007.

LEONARDI, R.; CALTABIANO, R.; LORETO, C. Collagenase-3 (MMP-3) is expressed in periapical lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J*, v. 38, n. 5, p. 297-301, May 2005.

LEONARDI, R. et al. Detection of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in periapical lesions. *J Endod*, v. 29, n. 3, p. 180-183, Mar. 2003.

LEVI, E. et al. Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 93, n. 14, p. 7069-7074, July 1996.

LIJNEN, H. R. et al. Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochem*, v. 37, n. 14, p. 4699-4702, Apr. 1998.

LIN, L. M. et al. Detection of epidermal growth factor receptor in inflammatory periapical lesions. *Int Endod J*, v. 29, n. 3, p. 179-184, May 1996.

LIN, L. M.; HUANG, G. T. J.; ROSENBERG, P. A. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cyst after periapical wound healing. *J Endod*, v. 33, n. 8, p. 908-916, Aug. 2007.

LIN, S. K. et al. Immunolocalization of interstitial collagenase (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in radicular cysts. *J Oral Patol Med*, v. 26, n. 10, p. 458-463, Nov. 1997.

LIN, S. K. et al. Sequential expressions of MMP-1, TIMP-1, IL-6, and COX-2 genes in induced periapical lesions in rats. *Eur J Oral Sci*, v. 110, n. 3, p. 246-253, June 2002.

LUKIC, A. et al. Quantitative analysis of the immunocompetent cells in periapical granuloma: correlation with the histological characteristics of the lesions. *J Endod*, v. 16, n. 3, p. 119-122, Mar. 1990.

MAALOUF, E. M.; GUTMANN, J. L. Biological perspectives on the non-surgical endodontic management of periradicular pathosis. *Int Endod J*, v. 27, n. 3, p. 154-162, May 1994.

MACH, F. et al. T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism. Implications for tube formation. *Am J Pathol*, v. 154, n. 1, p. 229-238, Jan. 1999.

MAEDA, K. S. et al. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicator in gastric carcinoma. *Br J Cancer*, v. 72, n. 2, p. 339-323, Aug. 1995.

MAJNO, G. Chronic inflammation. Links with angiogenesis and wound healing. *Am J Pathol*, v. 153, n. 4, p. 1035-1039, Oct. 1998.

MARINHO, A. et al. Angiogenesis in breast cancer is related to age but not to other prognostic parameters. *Pathol Res Pract*, v. 193, n. 4, p 267-273, 1997.

MÁRTON, I. J. et al. Distribution of interleukin-2 receptor  $\alpha$ -chain and cells expressing major histocompatibility complex class II antigen in chronic human periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol*, v. 13, n. 4, p. 259-262, Aug. 1998.

MATTU, T. S. et al. O-glycan analysis of natural human neutrophil gelatinase B using a combination of normal phase-HPLC and online tandem mass spectrometry:

implications for the domain organization of the enzyme. *Biochem*, v. 39, n. 51, p. 15695-15704, Dec. 2000.

MEGHJI, S. et al. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. *Archs Oral Biol*, v. 41, n. 6, p. 523-531, June 1996.

MENINGAUD, J. P. et al. Odontogenic cysts: a clinical study of 695 cases. *J Oral Sci*, v. 48, n. 2, p. 59-62, June 2006.

MOHAN, R. et al. Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. *J Biol Chem*, v. 275, n. 14, p. 10405-10412, Apr. 2000.

MOLDAUER, I.; VELEZ, I.; KUTTLER, S. Upregulation of basic fibroblastic growth factor in human periapical lesions. *J Endod*, v. 32, n. 5, p. 408-411, May 2006.

MONTESANO, R. et al. Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing middle T oncogene. *Cell*, v. 62, n. 3, p. 435-445, Aug. 1990.

MOOK, O. R. F.; FREDERIKS, W. M.; VAN NOORDEN, C. J. F. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta*, v. 1705, n. 2, p. 69-89, Dec. 2004.

MOREIRA, P. R. et al. CD57<sup>+</sup> cells in radicular cyst. *Int Endod J*, v. 33, n. 2, p. 99-102, Mar. 2000.

MOSES, M. A. The regulation of neovascularization by matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells*, v. 15, n. 3, p. 180-189, May 1997.

MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol*, v. 16, n. 5, p. 558-564, Oct. 2004.

NAGASE, H; WOESSNER JUNIOR, J. F. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, v. 274, n. 31, p. 21491-21494, July 1999.

NAIR, P. N. R. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000*, v. 13, p. 121-148, Feb. 1997.

NAIR, P. N. R. Patobiologia da periodontite apical primária. In: COHEN, S.; HARGREAVES, K. M. *Caminhos da polpa*. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2007. cap. 14, p. 541-579.

NAIR, P. N. R. New perspectives on radicular cysts: do they heal? *Int Endod J*, v. 31, n. 3, p. 155-160, May 1998.

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, n. 1, p. 93-102, Jan. 1996.

NAIR, P. N. R.; SCHMID-MEIER, E. An apical granuloma with epithelial integument. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 62, n. 6, p. 698-703, Dec. 1986.

NAKATA, K. et al. Anaerobic bacterial extracts influence production of matrix metalloproteinase and their inhibitors by humane dental pulp cells. *J Endod*, v. 26, n. 7, p. 410-413, July 2000.

NGUYEN, M.; ARKELL, J.; JACKSON, C. J. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 33, n. 10, p. 960-970, Oct. 2001.

NEVILLE, B. W. et al. Doenças da polpa e do periápice. In: \_\_\_\_\_. *Patologia oral e maxilofacial*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 3, p. 105-132.

O'BOSKEY, F. J.; PANAGAKOS, F. S. Cytokines stimulate matrix metalloproteinase production by human pulp cells during long-term culture. *J Endod*, v. 24, n. 1, p. 7-10, Jan. 1998.

OCHSENIUS, G. et al. Odontogenic cysts: analysis of 2.944 cases in Chile. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal*, v. 12, n. 2, p. E85-E91, Mar. 2007.

ODA, N. et al. ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin  $\beta_3$ . *J Cell Physiol*, v. 178, n. 2, p. 121-132, Feb. 1999.

OKADA, Y. et al. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest*, v. 72, n. 3, p. 311-322, Mar. 1995.

OLIVEIRA, M. D. C. *Expressão de proteínas da matriz extracelular em cistos odontogênicos*. 2000. 113 f. Tese (Doutorado em Patologia Oral) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2000.

OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E.; VAN DAMME, J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *TRENDS Immunol*, v. 22, n. 10, p. 571-579, Oct. 2001.

O'REILLY, M. S. et al. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J Bio Chem*, v. 274, n. 41, p. 29568-29571, Oct. 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Application of the international classification of diseases to dentistry and stomatology. 3rd. ed. Geneva: WHO, 1995. p. 66-67.

PATTERSON, B. C.; SANG, Q. X. A. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem*, v. 272, n. 46, p. 28823-28825, Nov. 1997.

PAZOUKI, S. et al. The association between tumor progression and vascularity in the oral mucosa. *J Pathol*, v. 183, n. 1, p.39-43, Sep. 1997.

PEPPER, M. S. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 17, n. 4, p. 605-619, Apr. 1997.

PEPPER, M. S. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 21, n. 7, p. 1104-1117, July 2001.

PFEIFER, A. et al. Suppression of angiogenesis by lentiviral delivery of PEX, a noncatalytic fragment of matrix metalloproteinase 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 97, n. 22, p. 12227- 12232, Oct. 2000.

PIATTELLI, A. et al. Immune cells in periapical granuloma: morphological and immunohistochemical characterization. *J Endod*, v. 17, n. 1, p. 26-29, Jan. 1991.

PINHEIRO, J. J. V. et al. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathol*, v. 45, n. 1, p. 65-72, July 2004.

PIRES, D. A. et al. Formación de los granulomas y quistes radiculares: una revisión de los aspectos inmunopatológicos. *Rev ADM*, v. LXIV, n. 3, p. 91-96, May./Jun. 2007.

POLETTE, M. et al. Tumor invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol*, v. 49, n. 3, p. 179-186, Mar. 2004.

PULHEZ, D. A. *Análise imunohistoquímica de granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos residuais*. 2004. 53 f. Dissertação (Mestrado em Estomatopatologia) - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2004.

QIAN, X. et al. Thrombospondin-1 modulates angiogenesis *in vitro* by upregulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells. *Exp Cell Res*, v.235, n. 9, p. 403-412, Sep. 1997.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J. Cistos da boca. In: \_\_\_\_\_. *Patologia bucal: correlações clinicopatológicas*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 10, p. 260-291.

ROLLI, M. et al. Activated integrin  $\alpha v \beta 3$  cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 100, n. 16, p. 9482-9487, Aug. 2003.

RUIZ, P. A. et al. Mecanismos inmunológicos involucrados en la patogénesis de los quistes periapicales: una revisión de los aspectos actuales. *Rev ADM*, v. LXI, n. 2, p. 54-58, Mar./Abr. 2004.

RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases, angiogenesis and cancer. *Clin Cancer Res*, v. 9, n. 2, p. 551-554, Feb. 2003.

SANCÉAU, J. et al. Interferons inhibit tumor necrosis factor-alpha-mediated matrix metalloproteinase-9 activation via interferon regulatory factor-1 binding competition with NF-kappa B. *J Biol Chem*, v. 277, n. 38, p. 35766-35775, Sept. 2002.

SATO, K. et al. Increased concentration of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in cyst fluid of enlarging and recurrent thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 82, n. 6, p. 1968-1973, June 1997.

SCHMALFELDT, B. et al. Increased expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and urokinase type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, v. 7, n. 8, p. 2396-2404, Aug. 2001.

SCHOR, A. M. et al. Assessment of vascularity in histological sections: effects of methodology and value as an index of angiogenesis in breast tumours. *Histochem J*, v. 30, n. 12, p. 849-856, Dec.1998.

SENGER, D. R. Molecular framework for angiogenesis: a complex web of interactions between extravasated plasma proteins and endothelial cell proteins induced by angiogenic cytokines. *Am J Pathol*, v. 149, n. 1, p. 1-7, July 1996.

SHIN, S. J. et al. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod*, v. 28, n. 4, p.313-315, Apr. 2002.

SILLETTI, S. et al. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin  $\alpha_v\beta_3$  by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, v. 98, n. 1, p. 119-124, Jan. 2001.

SILVEIRA, E. J. et al. Participação das metaloproteinases da matriz na etiopatogenia dos cistos odontogênicos. *J Bras Patol Med Lab*, v. 43, n. 3, p. 203-209, mai./jun. 2007.

SION-VARDY, N. et al. Neoangiogenesis in squamous cell carcinoma of the larynx-biological and prognostic associations. *Pathol Res Pract*, v. 197, n. 1, p. 1-5, 2001.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N. LOPES, H. P. Patologias pulpar e periradicular. In: SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; LOPES, H. P. *Endodontia: biologia e técnica*. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2004. cap. 2, p. 17-77.

SO, F. et al. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factors FGF-1 and FGF-2 and receptors FGFR2 and FGFR3 in the epithelium of human odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med*, v. 30, n. 7, p. 428-433, Aug. 2001.

SOARES, A. F. et al. Expressão das MMPs -1, -2 e -9 em cistos radiculares com e sem tratamento endodôntico. *Odont Clin Cient*, v. 6, n. 3, p. 249-254, 2007.

SOL, M. A. et al. Characterization of lymphocyte subpopulations in periapical lesions by flow cytometry. *Oral Microbiol Immunol*, v. 13, n. 4, p. 253-258, Aug. 1998.

SORSA, T. et al. Effects of tetracyclines on neutrophil, gingival, and salivary collagenases. A functional and Western blot assessment with special reference to their cellular sources in periodontal diseases. *Annals of New York Academy of Science*, v. 732, n. 6, p. 112-131, Sept. 1994.

SORSA, T.; TJÄDERHANE, L.; SALO, T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis*, v. 10, n. 6, p. 311-318, Nov. 2004.

SOUZA, G. F. M.; FREITAS, R. A.; MIRANDA, J. L. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. *Cienc Odontol Bras*, v. 10, n. 1, p. 12-18, jan./mar. 2007.

SOUZA, A. P.; LINE, S. R. P. The biology of matrix metalloproteinases. *Rev FOB*, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2002.

STASHENKO, P. et al. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 78, n. 4, p. 494-502, Oct. 1994.

STASHENKO, P.; YU, S. M.; WANG, C. Y. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod*, v. 18, n. 9, p. 422-426, Sept. 1992.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 17, p. 463-516, 2001.

SUZUKI, T. et al. Immunohistochemical analysis of CD 1 a-labeled Langerhans cells in human dental periapical inflammatory lesions – correlation with inflammatory cells and epithelial cells. *Oral Dis*, v. 7, n. 6, p. 336-343, Nov. 2001.

SUZUKI, T. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and heat shock proteins in periapical inflammatory lesions. *J Oral Pathol Med*, v. 31, n. 8, p. 488-493, Sept. 2002.

TAKAHASHI, K. Microbial, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J*, v. 31, n. 5, p. 311-325, Sept. 1998.

TAKAHASHI, K. et al. Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma

during infancy and childhood. *J Clin Invest*, v. 93, n. 6, p. 2357-2364, June 1994.

TAKAHASHI, K.; MAC DONALD, D. G.; KINANE, D. F. Analysis of immunoglobulin-synthesizing cells in human dental periapical lesions by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Oral Pathol Med*, v. 25, n. 6, p. 331-335, July 1996.

TAYLOR, A. M. et al. Quistes odontogénicos. Análisis de 856 casos. *Med Oral*, v. 7, n. 2, p. 89-96, Mar./Abr. 2002.

TERONEN, O. et al. Characterization of interstitial collagenases in jaw cyst wall. *Eur J Oral Sci*, v. 103, n. 3, p. 141-147, June 1995a.

TERONEN, O. et al. Identification and characterization of gelatinase/type IV collagenase in jaw cysts. *J Oral Pathol Med*, v. 24, n. 2, p. 78-84, Feb. 1995b.

TETE', S. et al. Immunohistochemical evaluation of CD31 in human cystic radicular lesions and in keratocysts. *Int J Immunopathol Pharmacol*, v. 18, n. 3, p. 39-45, July/Sept. 2005.

TJÄDERHANE, L. et al. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesion. *J Dent Res*, v. 77, n. 8, p. 1622-1629, Aug. 1998.

TOMODA, M. et al. Intratumoral neovascularization and growth pattern in early gastric carcinoma. *Cancer*, v. 85, n. 11, p. 2340-2346, Nov. 1999.

TORABINEJAD, M. The role of immunological cyst formation and the fate of epithelial cells after root canal therapy: a theory. *Int J Oral Surg*, v. 12, n. 1, p. 14-22, Feb. 1983.

TORABINEJAD, M. Mediators of acute and chronic periradicular lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 78, n. 4, p. 511-21, Oct. 1994.

TORABINEJAD, M.; KETTERING, J. D. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endod*, v. 11, n. 3, p. 122-125, Mar. 1985.

TSAI, C. H. et al. Matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 expression in human oral squamous cell carcinoma and the effect of protein kinase

inhibitors: preliminary observations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 95, n. 6, p. 710-716, Jun. 2003.

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, n. 3, p. 156-161, Mar. 2004.

TSAI, C. H. et al. The upregulation of matrix metalloproteinase-9 in inflamed human dental pulps. *J Endod*, v. 31, n. 12, p. 860-862, Dec. 2005.

TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie*, v. 87, n. 3-4, p. 287-297, Mar./Apr. 2005.

VALABLE, S. et al. VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 25, n. 11, p. 1491-1504, Nov. 2005.

VAQUERO, J. et al. Vascular permeability factor expression in cerebellar hemangioblastomas: correlation with tumor-associated cysts. *J Neuroonc*, v. 41, n. 1, p. 3-7, Jan. 1999.

VARINAUSKAS, V.; GERVICKAS, A.; KAVOLIUNIENE, O. Analysis of odontogenic cysts of the jaws. *Medicina (Kaunas)*, v. 42, n. 3, p. 201-207, 2006.

VERMEULEN, P. B. et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. *Eur J Cancer*, v. 38, n. 12, p. 1564-1579, Aug. 2002.

VERSTAPPEN, J.; HOFF, J. W. V. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res*, v. 85, n. 12, p. 1074-1084, Dec. 2006.

VICENTE, J. C. et al. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, v. 41, n. 3, p. 283-293, Mar. 2005.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, v. 92, n. 8, p. 827-839, May 2003.

VU, T. H. et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*, v. 93, n. 3, p. 411-422, May 1998.

WAKULICH, C. et al. Immunohistochemical localization of growth factors fibroblast growth factor-1 and fibroblast growth factor-2 and receptors fibroblast growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-3 in normal oral epithelium, epithelial dysplasias, and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 93, n. 5, p. 573-579, 2002.

WAHLGREN, J. et al. Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. *J Pathol*, v. 194, n. 2, p. 217-224, June 2001.

WAHLGREN, J. et al. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. *Int Endod J*, v. 35, n. 11, p. 897-904, Nov. 2002.

WAHLGREN, J. et al. Laminin-5 gamma 2 chain is colocalized with gelatinase-A (MMP-2) and collagenase-3 (MMP-13) in odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med*, v. 32, n. 2, p. 100-107, Feb. 2003.

WANG, H.; KEISER, J. A. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1, *Circ Res*, v. 83, n. 8, p. 832-840, Oct. 1998.

WANG, C. Y.; TANI-ISHII, N.; STASHENKO, P. Bone resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. *Oral Microbiol Immunol*, v. 12, n. 2, p. 65-71, Apr. 1997.

WIKIPEDIA. *Vascular endothelial growth factor*. Disponível em: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Vascular\\_endothelial\\_growth\\_factor#cite\\_ref-1](http://en.wikipedia.org/wiki/Vascular_endothelial_growth_factor#cite_ref-1)>. Acesso em: 29 mai. 2008, 23:04.

XU, J. et al. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Cell Biol*, v. 154, p. 1069-1079, n. 5, Sept. 2001.

XU, X. et al. Functional basis for the overlap in ligand interactions and substrate specificities of matrix metalloproteinases-9 and -2 (MMP-9 and -2). *Biochem J*, v. 392, p. 127-134, 2005.

YANG, Z.; STRICKLAND, D. K.; BORNSTEIN, P. Extracellular MMP2 levels are regulated by the low-density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem*, v. 276, n. 11, p.8403-8408, Mar. 2001.

YU, S. M.; STASHENKO, P. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions, *J Endod*, v. 13, n. 11, p. 535-540, Nov. 1987.

YU, Q.; STAMENKOVIC, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*, v. 14, n. 2, p. 163-176, Jan. 2000.

ZHANG, A. et al. Enhanced in vitro invasiveness of ovarian cancer cells through up-regulation of VEGF and induction of MMP-2. *Oncol Rep*, v. 15, n. 4, p. 831-836, Apr. 2006.

ZHENG, H. et al. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. *Anticancer Res*, v. 26, n. 5(A), p. 3579-3584, Sept./Oct. 2006.

ZECCHI-ORLANDINI, S. et al. Radicular cysts are involved in the recruitment of osteoclast precursors. *J Oral Pathol Med*, v. 25, n. 6, p. 325-330, July 1996.

ZUCKER, S. et al. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer*, v. 75, n. 5, p. 780-786, Mar. 1998.













## ANEXO

ANEXO A Documento de aprovação do projeto de pesquisa (135/2007) pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Comitê de Ética em Pesquisa –CEP/FS

### PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto: 135/2007

Título do Projeto: “Expressão imuno-histoquímica das gelatinases e fatores angiogênicos em granulomas e cistos periapicais”.

Pesquisadora Responsável: Patrícia Alvarez Ruíz

Data de Entrada: 03/12/2007.

Com base nas Resoluções 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto 135/2007 com o título: “Expressão imuno-histoquímica das gelatinases e fatores angiogênicos em granulomas e cistos periapicais”. Analisado na 11ª Reunião, realizada no dia 11 de dezembro de 2007.

O pesquisador responsável fica, desde já, notificado da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 19 de dezembro de 2007.

Prof. Volnei Garrafa  
Coordenador do CEP-FS/UnB

Campus Universitário Darcy Ribeiro  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Cep: 70.910-900