

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

DAWTON ABRANCHES PULHEZ
Cirurgião-Dentista

**ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE
GRANULOMAS PERIAPICAIS, CISTOS RADICULARES E
CISTOS RESIDUAIS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Estomatopatologia na área de Estomatologia.

**Piracicaba
2004**

DAWTON ABRANCHES PULHEZ

Cirurgião-Dentista

**ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE
GRANULOMAS PERIAPICAIS, CISTOS RADICULARES E
CISTOS RESIDUAIS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Estomatopatologia na área de Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior

Prof^a. Dr^a. Maria Regina Sposto

Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia

Suplente:

Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes

**Piracicaba
2004**

Ficha Catalográfica

P966a	<p>Pulhez, Dawton Abranches. Análise imunohistoquímica de granulomas periapicais, cistos radiculares e cistos residuais. / Dawton Abranches Pulhez. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2004. x, 63f. : il.</p> <p>Orientador : Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Inflamação. I. Jorge Júnior, Jacks. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

Dedicatória

Aos meus pais, ***Newton e Élide***.
Hoje eu sei que cada tropeço e cada vitória terão valido a pena
porque terão sido com vocês e por vocês.

Aos meus irmãos, ***Élton e Júnior***, minha cunhada ***Josi*** e meu
sobrinho ***Rafael***, por terem feito parte da minha vida em momentos
tão importantes.

Ao ***Gohan***, o melhor amigo que eu já pude conhecer.

*“Chegará o dia, em que o homem conhecerá o íntimo de
um animal, e neste dia, todo crime contra um animal será
um crime contra a humanidade.”*

(Leonardo da Vinci)

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior** por todos os ensinamentos transmitidos, que foram fundamentais durante a minha formação pessoal e profissional nestes anos de Mestrado e por sua imensa generosidade.

*“Os monges e os estudiosos deveriam aceitar
minha palavra não por respeito, mas
analisando-a como um ourives analisa o ouro,
cortando-o, derretendo-o, raspando-o e
esfregando-o”.*

Buda

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Thales de Mattos Rocha Filho**;

Ao **Prof. Dr. Pablo Augustin Vargas**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

Aos professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, por todos os ensinamentos transmitidos;

Ao **Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela importante contribuição para a realização deste trabalho;

À bióloga **Marisa**, do Laboratório de Patologia Experimental da UNICAMP pela contribuição com as técnicas de imunohistoquímica utilizadas nesta pesquisa;

Ao **Prof. Dr. Spyros Liapatas**, da Faculdade de Odontologia da Universidade de Atenas, pela contribuição com os artigos utilizados para a elaboração deste trabalho;

À **Ana Paula**, por fazer parte de forma tão agradável da minha vida ao lado de meu irmão;

Aos colegas de Mestrado, **Juliana, Jorge, Michele, Michelle, e Sabrina**, por todos os momentos de aprendizado e descontração vividos nestes anos. ;

A **Karina e Michele**, por terem compartilhado comigo momentos tão importantes durante nossa vida acadêmica até aqui;

Ao colega de Patologia, **Cléverton Roberto de Andrade**, por todas as contribuições importantes para a realização deste trabalho;

A todos os colegas de Patologia que verdadeiramente torceram por mim e souberam compartilhar momentos de alegria ou não, permanecendo sempre ao meu lado;

À **Christiane Yorioka, Adriana e Amália**. Próximos ou distantes sempre continuo torcendo por todos nós;

Aos amigos **Laura, Carlos, Marlise e Neimar**, que compartilharam comigo todos meus passos e me brindaram com a verdadeira amizade da qual jamais abrirei mão;

À **Valéria Totti**, por ter me ensinado que sempre estamos aprendendo e evoluindo também no aspecto pessoal, e que este é tão importante quanto o intelectual. Obrigado por sua amizade;

Aos funcionários do laboratório de Patologia: **Adriano Luís Martins, Cristiane Rizzo do Amaral, Eli Cristina Gomes Alves, João Carlos Gomes da Silva Júnior, Katiane da Costa e Silva, Maria Helena de Vasconcelos Peron e Rosa Maria Fornasiari**;

À técnica de laboratório **Ana Cristina do Amaral Godoy**, que representou não apenas a peça fundamental para a realização deste trabalho, mas também, grande amiga com quem pude contar em todos os momentos de alegria e aflição;

Aos funcionários e amigos do Orocentro: **Aparecida Campion, Christiane, Débora, Dinha, Elizabeth, Rosinha, Francisco Carlos, Juliana, Marco Antonio, Rogério, e Valéria**. Foi muito gratificante trabalhar com vocês;

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Epígrafe

“Que o homem tenha saber e bondade, porém que a bondade seja mais importante, pois sem ela pouco vale a primeira”.

Ariosto

Sumário

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1. Etiopatogenia	9
2.2. Prevalência	10
2.3. Células inflamatórias: da fase inicial à cronicidade	11
2.4. Linfócitos T e B	11
2.5. Plasmócitos	12
2.6. Macrófagos	12
2.7. Mastócitos	13
2.8. Membrana Basal: Laminina e Colágeno IV	13
2.9. Laminina e colágeno IV em lesões periapicais	14
2.10. Marcadores de proliferação celular: Ki-67 e PCNA	14
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivos específicos	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. Obtenção do material	19
4.2. Obtenção dos cortes	19
4.3. Imunohistoquímica	20
4.4. Leitura dos resultados	22
4.5. Análise dos resultados	23
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÕES	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

Lista de Abreviaturas

°C	graus Celsius
µm	micrometros
µm²	micrometros quadrados
100X	aumento microscópico de cem vezes
40X	aumento microscópico de quarenta vezes
CD20+	imunohistoquimicamente positivo para o cluster de diferenciação vinte
CD68+	imunohistoquimicamente positivo para o cluster de diferenciação sessenta e oito
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	diaminobenzidina
DMSO	dimetil- sulfóxido
DO	densidade óptica
EGF	fator de crescimento epidérmico (epidermal growth factor)
FNT-α	fator de necrose tumoral alfa
FOP-UNICAMP	Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas
GP	granuloma periapical
HE	Hematoxilina e Eosina
IgA	imunoglobulina A
IgE	imunoglobulina E
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IL-1	interleucina um
IL-10	interleucina dez
IL-2	interleucina dois
IL-4	interleucina quatro
IL-6	interleucina seis
IL-8	interleucina oito
KDa	quiloDaltons
LB	linfócitos B
LT	linfócitos T
LT-4	linfócitos T auxiliares
LT-8	linfócitos T citotóxicos / supressores
LT-CD3+	linfócitos T imunohistoquimicamente positivos para o cluster de diferenciação três
LT-CD4+	linfócitos T imunohistoquimicamente positivos para o cluster de diferenciação quatro
LT-CD8+	linfócitos T imunohistoquimicamente positivos para o cluster de diferenciação oito
MB	membrana basal
min	minutos
mM	milimolar

MMP	metaloproteinase de matriz
PBS	solução fosfatada tamponada (phosphate-buffered saline)
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular (proliferating cellular nuclear antigen)
PGD2	prostaglandina D dois
PGE2	prostaglandina E dois
pH	potencial de hidrogênio
PM	peso molecular
PMN	polimorfonucleares
RAD	cisto radicular
RES	cisto residual
TGF	fator de crescimento transformante (transforming growth factor)
vol	volume
WHO	Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

Lista de Figuras e Tabelas

Figuras	Página
Figura 1: Lesão periapical aderida a um dente extraído.	21
Figura 2: Visão macroscópica de lesão periapical.	21
Figura 3: Marcação imunohistoquímica para LT-CD3+.	26
Figura 4: Marcação imunohistoquímica para LT-8.	26
Figura 5: Marcação imunohistoquímica para linfócitos B.	28
Figura 6: Marcação imunohistoquímica para plasmócitos.	28
Figura 7: Marcação imunohistoquímica para macrófagos.	30
Figura 8: Marcação imunohistoquímica para mastócitos.	30
Figura 9: Marcação imunohistoquímica para Ki-67 e PCNA.	33
Figura 10: Marcação imunohistoquímica para colágeno IV e laminina.	33
Gráfico 1: Porcentagem de células com marcação imunohistoquímica positiva para cada anticorpo utilizado, entre as três lesões analisadas.	32
Tabela 1: Relação de anticorpos utilizados na pesquisa.	21
Tabela 2: Porcentagens: total, em cápsula e central/subepitelial de células com marcação imunohistoquímica positiva para anticorpos anti-CD3, CD8, CD20, CD68, plasmócitos e mastócitos, entre as lesões analisadas.	31
Tabela 3: Valores de porcentagem, área e densidade óptica das células imunohistoquimicamente positivas para os anticorpos anti-Ki-67 e anti-PCNA entre os cistos radiculares e residuais.	31
Tabela 4: Valores de área e densidade óptica das membranas basais com marcação imunohistoquímica positiva para os anticorpos anti-colágeno IV e anti-laminina nos cistos radiculares e residuais.	32

Resumo

Os granulomas periapicais (GP) e cistos radiculares (RAD) estão entre as lesões de origem dental mais freqüentes na cavidade bucal. Estas lesões têm origem inflamatória a partir de um estímulo agressor à polpa dental, normalmente infeccioso. Quando o dente envolvido é extraído, mas o cisto não é completamente removido, os RAD podem dar origem aos cistos residuais (RES). Cada uma destas lesões apresenta características peculiares quanto ao infiltrado inflamatório, apesar da origem comum a partir da agressão ao periápice dental. O objetivo deste estudo foi caracterizar e comparar as diferenças entre o infiltrado inflamatório presente nas três lesões e relacioná-lo ao padrão de proliferação epitelial dos RAD e RES, bem como às características da membrana basal (MB) do epitélio cístico. Por meio de análise imunohistoquímica, verificou-se que os linfócitos T (LT) e plasmócitos são os tipos celulares mais freqüentes no infiltrado inflamatório destas lesões. Os LT foram mais freqüentes nos cistos e os plasmócitos predominaram nos GP. A distribuição de linfócitos B (LB) entre as lesões acompanhou a dos plasmócitos e foi localizada principalmente na região central dos GP e subepitelial dos RAD. Macrófagos estiveram distribuídos principalmente na região central de GP e na cápsula de RES. Os mastócitos foram encontrados principalmente na região de cápsula das três lesões. O índice de proliferação epitelial foi maior nos RAD em relação aos RES e foi relacionado principalmente à presença de LB e LT totais (LT-CD3+), mas não de LT supressores/citotóxicos (LT-8). Os RES apresentaram os maiores valores de área das MB. As diferenças na quantidade e qualidade do infiltrado inflamatório entre GP, RAD e RES podem influenciar na proliferação epitelial e no comportamento da MB epitelial e sua interação com outros componentes destas lesões.

Abstract

The periapical granulomas (GP) and radicular cysts (RAD) are among the most frequent lesions of dental origin in the oral cavity. These inflammatory lesions start from an aggression to the dental pulp, usually infectious. When the tooth associated with a radicular cyst is removed and remains the cystic lesion stay in the area, the lesion is called residual cyst (RES). Despite their common pathogenic background, these lesions show specific patterns in inflammatory infiltrate. The aim of this study was to characterize and to compare the differences of inflammatory infiltrated present in the three lesions and to correlate it with the epithelial proliferation pattern of RAD and RES. Immunohistochemistry analysis showed that the most common type of inflammatory cells were the T-lymphocyte (LT), concentrated mainly in cystic lesions; and plasma cells, observed mainly in GP lesions. B-lymphocytes's (LB) distribution was similar to the plasma cells distribution among the lesions. LB was found mainly in the central area of GP and near the epithelium of RAD. Macrophages predominate in the central area of GP and in the capsule of RES. The mast cells were concentrated in the capsule of the three lesions. The index of epithelial proliferation was larger in RAD in relation to the RES, and it was related mainly the presence of LB and pan-LT (LT-CD3+), but not of cytotoxic/suppressor-LT (LT-8). RES presented the largest values of basement membrane's (MB) area. These differences in the amount and quality of the inflammatory infiltrated among GP, RAD and RES can influence in the epithelial proliferation and the behavior of the epithelial MB and its interaction with other components of these lesions.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os granulomas periapicais (GP) e cistos radiculares (RAD) estão entre as lesões mais freqüentemente encontradas na cavidade bucal e este último representa a maioria dos cistos odontogênicos (Ledesma-Montes et al, 2000; Satorres et al, 2001; Mosqueda-Taylor et al, 2002). Apesar de menos freqüentes, os cistos residuais (RES) originam-se de cistos radiculares prévios e sua importância está centrada nos aspectos terapêuticos dos RAD (Schaffer, 1997; Gardner, 1997). Embora estas lesões possam ter períodos de agudização, em geral apresentam predomínio de infiltrado inflamatório crônico (Yu and Stashenko, 1987; Liapatas et al, 2003). Diversos estudos caracterizaram o infiltrado inflamatório presente nas lesões periapicais (Babal et al, 1987; Lukic et al, 1990; Alavi et al, 1998), e sabe-se que os aspectos quantitativos e qualitativos das células inflamatórias nestas lesões são variáveis (Kopp and Schwarting, 1989; Marton and Kiss, 1993; Liapatas et al, 2003). Os RES apresentam infiltrado inflamatório menos intenso, uma vez que o contato direto com a fonte de infecção é bloqueado, enquanto que os RAD mostram um infiltrado inflamatório mais intenso e epitélio com maior potencial proliferativo (Oehlers, 1970; Walton, 1996; Sciubba et al, 2001).

O potencial indutivo das células inflamatórias no epitélio dos cistos odontogênicos também é relatado na literatura e sabe-se que as lesões com infiltrado inflamatório mais intenso apresentam alterações epiteliais (Paula et al, 2000). Diversas substâncias biologicamente ativas produzidas pelos leucócitos são capazes de estimular a diferenciação e proliferação das células epiteliais (Li et al, 1997; Kubota et al, 2000). As MB epiteliais em cistos odontogênicos também apresentam variações em seu comportamento de acordo com o potencial proliferativo da lesão (Oliveira et al, 2002). O infiltrado inflamatório e sua relação com a MB e potencial proliferativo das lesões pode ser avaliado por meio de marcação imunohistoquímica (Abrahamson, 1986; Tripi et al, 2003).

Essas relações foram observadas neste trabalho e são importantes para o entendimento da patogênese e do comportamento clínico de cada lesão.

2. Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Etiopatogenia

Cistos e granulomas periapicais são caracterizados por processo inflamatório crônico inespecífico (WHO, 1995; Sciubba et al, 2001) onde predominam células mononucleares, principalmente linfócitos, plasmócitos e macrófagos (Takahashi, 1998; Marton and Kiss, 2000), embora polimorfonucleares neutrófilos também possam ser encontrados, assim como mastócitos e eosinófilos (Yu and Stashenko, 1987; Piattelli et al, 1991; Gutmann, 1992; Marton and Kiss, 1993; Marton and Kiss, 2000).

Quando a polpa dental é lesada por agentes infecciosos de caráter inespecífico e sofre necrose, a penetração destes agentes na região do periápice dental é facilitada (Takahashi et al, 1996; Takahashi, 1998). Eles podem atuar diretamente, pela liberação de enzimas proteolíticas, ou indiretamente, por meio de fragmentos estruturais com capacidade antigênica. Fragmentos do próprio tecido pulpar degradado também podem atuar como esses agentes (Shinoda et al, 1986; Nair et al, 1993). Todos estes estímulos dão origem a uma resposta inflamatória que é responsável pela eliminação dos agentes agressores e pelo reparo da região periapical. A área inflamada possui aspecto arredondado; semelhante a um “pequeno grão”, sendo chamada de granuloma periapical. GP são, portanto, reações inflamatórias crônicas no tecido ósseo da região apical e periodontal onde há também o aumento do número de fibroblastos, das fibrilas colágenas, células endoteliais e capilares, em associação com hiperemia e edema devido à penetração de agentes infecciosos e irritantes no periápice dental (Yanagisawa, 1980; Marton and Kiss, 2000; Sciubba et al, 2001). A concentração de agentes irritantes na periferia da lesão é menor, permitindo maior concentração de fibroblastos, osteoblastos e fibras colágenas, que formam uma “cápsula”, separando o tecido de granulação do osso adjacente (Yanagisawa, 1980; Bergenholtz et al, 1983).

Diversas teorias foram propostas para explicar o processo de formação da cavidade nos cistos radiculares. Sabe-se que essas lesões são originárias de lesões prévias de GP que persistiram por longos períodos. A persistência da inflamação na região do periápice estimula os restos epiteliais de Malassez por meio de citocinas, endotoxinas bacterianas e

fatores de crescimento de células epiteliais (Lin et al, 1996; Meghji et al, 1996; Gao et al, 1996; Takahashi, 1998). Com a proliferação epitelial, a nutrição das células no centro da lesão fica prejudicada, ocorre necrose dessas células e a conseqüente formação de cavidade patológica, revestida por epitélio escamoso estratificado e preenchida por material líquido e células descamadas (Seltzer et al, 1969; WHO, 1995; Sciubba et al, 2001). O RAD pode estar em contato íntimo com a abertura do canal radicular ou não (Ramachandran Nair et al, 1996). Pode também apresentar células gigantes multinucleadas, cristais de colesterol, corpos hialinos de Rushton, corpúsculos de Russell e "macrófagos espumosos", que sofreram degeneração gordurosa após fagocitar o material lipóide e/ou hemossiderina (Takahashi, 1998; Sciubba et al, 2001).

Remanescentes de RAD deixados no rebordo alveolar após a remoção do dente envolvido dão origem aos cistos residuais (Oehlers, 1970; Sciubba et al, 2001). Seu diagnóstico depende da associação das características clínicas, radiográficas e histológicas, especialmente quando há evidências de envolvimento dentário prévio (Dimitroulis and Curtin, 1998). Parte dos RAD tende a regredir após a exodontia ou tratamento endodôntico adequado do dente envolvido, uma vez que o estímulo inflamatório responsável pelo desenvolvimento da lesão é removido (Walton, 1996). Entretanto, algumas dessas lesões podem permanecer estáveis ou mesmo evoluir de forma a causar dor e expansão da cortical óssea (High and Hirschmann, 1988; Dimitroulis and Curtin, 1998). A literatura é escassa e ainda se discutem os mecanismos pelos quais ocorre o desenvolvimento de RES a partir de remanescentes de lesões prévias de RAD deixados após a extração dos dentes envolvidos (Walton, 1996; Schaffer, 1997; Gardner, 1997; Walton, 1997). O RES é microscopicamente semelhante ao RAD, mas tende a apresentar menor número de células inflamatórias e atrofia epitelial (High and Hirschmann, 1986; Sciubba et al, 2001).

2.2. Prevalência

Há grande variação nos relatados da literatura sobre a prevalência das lesões apicais, mas sabe-se que são bastante comuns (Ramachandran Nair et al, 1996; Sanchis et al, 1998). Os RES são menos frequentes que os RAD (Killey, 1977), mas a real frequência de ambas as lesões ainda não é consenso. Há também a necessidade estudos epidemiológicos possam

determinar as eventuais variações de prevalência em áreas geográficas distintas. No Brasil, há poucos estudos epidemiológicos sobre esta categoria de lesões. Adicionalmente, ao menos parte da variação da prevalência pode ser creditada à falta de critérios unificados de diagnóstico e de amostragem nas diferentes pesquisas publicadas até o momento (Spatafore et al, 1990; Ramachandran Nair et al, 1996).

2.3. Células inflamatórias: da fase inicial a cronicidade

Muito se tem discutido a respeito da presença de células inflamatórias em lesões periapicais; sua concentração, distribuição e papel na patogênese dessas lesões. Polimorfonucleares neutrófilos (PMN) e macrófagos atuam como primeira linha de defesa do organismo (Takahashi, 1998; Marton and Kiss, 2000). Fagocitose de neutrófilos mortos, realizada por macrófagos, tem papel importante na manutenção da cronicidade das lesões juntamente com a ação de mediadores químicos da inflamação (Hamachi et al, 1995; Kawashima et al, 1996; Wang et al, 1997). LT e LB predominam em lesões periapicais e têm papel importante na resposta imune antígeno-específica por meio da imunidade celular e humoral (Yu and Stashenko, 1987).

2.4. Linfócitos T e B

De forma geral, a proporção de LT é maior que a de LB nas lesões periapicais e os mesmos estão dispostos em infiltrados difusos, enquanto os LB predominam em infiltrados inflamatórios focais e em lesões periapicais de dentes endodonticamente tratados, sugerindo que a resposta humoral é mais ativa no processo de reparo que na doença em evolução (Torabinejad and Kettering, 1985; Kontiainen et al, 1986; Yu and Stashenko, 1987; Lukic et al, 1990; Alavi et al, 1998; Marton and Kiss, 2000). Apesar disto, há evidências de que a resposta humoral pode ser de grande importância nos GP, sendo comparável à resposta mediada por células (Babal et al, 1987).

Os LT podem ser identificados imunohistoquimicamente através da marcação das proteínas CD3. Elas constituem um grupo de cinco cadeias polipeptídicas invariáveis que estão presentes na membrana dos LT e participam da transdução de sinais para o interior da célula após sua ligação ao antígeno (Erber et al, 1984; Campana et al, 1987).

A proporção entre LT-supressores/citotóxicos (LT-CD8+ ou LT-8) e os LT-auxiliares (LT-CD4+ ou LT-4) parece ser importante durante a fase de progressão das lesões no periápice (Cymerman et al, 1984; Barkhordar and Desouza, 1988; Sol et al, 1998). LT-8 são encontrados em maior concentração que os LT-4 nos cistos em relação aos GP (Oliveira and Lara, 2001). Os primeiros participam mais ativamente no processo de estabilização das lesões periapicais inflamatórias, enquanto os LT-4 têm maior participação na fase inicial ou destrutiva das lesões (Konttinen et al, 1986; Piattelli et al, 1991; Alavi et al, 1998; Marton and Kiss, 2000).

2.5. Plasmócitos

Acredita-se que os plasmócitos participam mais ativamente no processo de reparo que na iniciação e desenvolvimento das lesões periapicais, uma vez que células positivas para imunoglobulinas G e E (IgG e IgE, respectivamente) predominam nas fases tardias, onde se observam indícios de reparo tecidual e estabilização da reabsorção óssea (Akamine et al, 1994b). Apesar de não haver evidências da participação direta de anticorpos no processo de reparo, as células IgG positivas parecem atuar na quimiotaxia para neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Yanagisawa, 1980). Adicionalmente, imunoglobulinas A e M (IgA e IgM, respectivamente) são encontradas em concentrações elevadas nos GP, parede e fluido císticos (Yanagisawa, 1980; Johannessen et al, 1983; Torres et al, 1994).

2.6. Macrófagos

Não parece haver diferença na quantidade e distribuição de macrófagos em cistos e GP (Oliveira and Lara, 2001). Estas células predominam em áreas de inflamação ativa, como no centro dos GP e logo abaixo do epitélio cístico. Macrófagos atuam por meio da liberação de citocinas, como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral- α (FNT- α), prostaglandina E2 (PGE-2) e metaloproteinases de matriz (MMP), estimulando a reabsorção óssea e a progressão das lesões (Stashenko, 1990). Estas células têm importante relação com a formação de osteoclastos, pois, além de produzirem citocinas que estimulam a formação destas células, são também seus próprios precursores (Vaes, 1988). Podem ser

observados como células de aspecto espumoso em fases mais tardias das lesões periapicais, por fagocitarem lipídeos (Akamine et al, 1994a; Takahashi, 1998).

2.7. Mastócitos

Mastócitos são escassos nas lesões periapicais (Kontinen et al, 1986; Piattelli et al, 1991; Marton and Kiss, 2000). Talvez participem do controle da progressão dessas lesões (Marton and Kiss, 2000), mas nem sempre são observadas variações na concentração dessas células entre cistos e GP (Yanagisawa, 1980; Piattelli et al, 1991). São encontrados na periferia das lesões periapicais em associação com linfócitos ou, mais comumente, de forma isolada (Piattelli et al, 1991; Marton and Kiss, 2000). Podem inibir a produção de mediadores químicos que promovem a resposta imune e a destruição óssea, como a IL-2 e o interferon- γ , por meio da liberação de histamina e supressão da atividade de células T frente aos antígenos (Dohlsten et al, 1987; Piattelli et al, 1991). Participam também do controle da formação de fibras colágenas e, conseqüentemente, na formação da cápsula fibrosa na zona periférica das lesões (Yanagisawa, 1980; Marton and Kiss, 2000).

2.8. Membrana Basal: Laminina e Colágeno IV

A membrana basal é essencial para a organogênese e manutenção da função de órgãos maduros e a laminina é importante para o estabelecimento de sua formação, arquitetura e estabilidade, participando no controle da permeabilidade seletiva às macromoléculas, invasão tecidual pelas células, separação e conexão de tecidos (Vracko, 1974; Foidart et al, 1980; Timpl, 1989; Aumailley and Smyth, 1998).

Laminina é a mais abundante glicoproteína não colagênica presente nas membranas basais e nos componentes da matriz extracelular (Timpl et al, 1979). Está freqüentemente associada a membros de outras famílias de moléculas, como colágeno IV (Foidart et al, 1980; Laurie et al, 1982; Engvall, 1994; Aumailley and Smyth, 1998; Chen et al, 1998). A laminina-1 tem peso molecular (PM) entre 800 e 1000 KDa e é formada por 3 cadeias polipeptídicas diferentes que são unidas por meio de pontes dissulfeto, resultando em aspecto cruciforme, com 3 braços curtos e um braço longo. A cadeia A, ou $\alpha 1$, tem PM entre 400 e 440 KDa; a cadeia B1, ou $\beta 1$, tem PM de 220 KDa, enquanto a cadeia B2 ou $\gamma 1$

tem PM de 200 a 220 KDa (Foidart et al, 1980; Timpl, 1989; Engel, 1992; Engvall, 1993; Aumailley and Smyth, 1998; Chen et al, 1998). (Laurie et al, 1982; Couchman et al, 1983; Kleinman et al, 1985; Fried et al, 1992; Tryggvason, 1993; High and Robinson, 1994; Engvall, 1994; Coletta et al, 1997; Aumailley and Smyth, 1998) A laminina está envolvida em patologias associadas a deficiências na membrana basal e aderência epitelial, como a epidermólise bolhosa e bolsas periodontais (Christiano and Uitto, 1996; Giannelli et al, 1997; Mullen et al, 1999). Está presente na lâmina basal e influencia na formação dos restos epiteliais de Malassez, já que atua na diferenciação e manutenção dos tecidos epiteliais (Hamamoto et al, 1991). Dentre as proteínas que se ligam a esta proteína nas membranas basais, pode-se citar a fibronectina e o colágeno IV (Timpl, 1989; Engel, 1992; Tryggvason, 1993; Chen et al, 1998). Assim como a laminina, o colágeno IV também está presente nas membranas basais (Abrahamson, 1986; Aumailley and Smyth, 1998). É uma proteína de alto peso molecular e possui duas cadeias polipeptídicas com conformação em tripla hélice e constitui um dos principais componentes desta estrutura, fornecendo o arcabouço sobre o qual se ancoram os outros componentes da matriz (Laurie et al, 1982).

2.9. Laminina e Colágeno IV em lesões periapicais

A distribuição de colágeno IV e laminina foi estudada de maneira comparativa em GP e RAD para identificar sua influência no comportamento destas lesões (Delzangles et al, 1997). A distribuição da laminina acompanha a distribuição do colágeno IV e parece ser importante na coesão tecidual em lesões periapicais (Birembaut et al, 1983; Delzangles et al, 1997). O estudo destes componentes na membrana basal mostrou níveis de expressão diferentes em queratocistos, cistos radiculares e dentígeros, o que pode estar relacionado com diferenças no padrão de crescimento destes cistos (Oliveira et al, 2002).

2.10. Marcadores de proliferação celular

O padrão de proliferação epitelial entre os cistos odontogênicos varia (Li et al, 1994; Li et al, 1995; Tosios et al, 2000; Piattelli et al, 2001). Esses índices podem ser avaliados por meio da expressão de marcadores específicos que indicam se as células se encontram

em estágios de apoptose ou de duplicação celular (Hall et al, 1990; Li et al, 1995; Carvalhais et al, 1999). Marcadores como o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e o Ki-67 têm sido utilizados para determinar as diferenças entre os índices de proliferação epitelial entre os cistos odontogênicos. O Ki-67 permite identificar as células em proliferação (Gerdes et al, 1984; Szekeres, 1993). Ele é encontrado em todas as fases ativas do ciclo celular e da mitose, mas está ausente durante a fase G0 (Brown and Gatter, 1990). Nos cistos odontogênicos, os padrões de proliferação epitelial podem ser determinados avaliando-se a presença de células positivas para Ki-67 no epitélio cístico (Slootweg, 1995; Paula et al, 2000). PCNA mostrou-se significativamente mais expresso nos queratocistos em relação aos cistos radiculares e dentígeros (Li et al, 1994; Li et al, 1995). Da mesma forma, o Ki-67 mostrou menor contagem de células positivas e distribuição menos organizada nos cistos radiculares e dentígero, quando comparados ao queratocisto (Slootweg, 1995).

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é avaliar a presença e a distribuição de células inflamatórias, de proteínas da membrana basal e o potencial de crescimento epitelial em lesões periapicais e cistos residuais por meio de marcação imunohistoquímica.

Objetivos específicos:

- a.** Determinar a presença, por meio de marcação imunohistoquímica específica, de LT-CD3+, LT-8, LB, plasmócitos, mastócitos e macrófagos em GP, RAD e RES;
- b.** Quantificar e comparar estas células por meio de contagem em microscópio óptico, com auxílio de programa de computador (KS-400[®]), em GP, RAD e RES;
- c.** Determinar a localização predominante destas células, por meio de observação em microscopia óptica conforme protocolo de localização pré-estabelecido em GP, RAD e RES;
- d.** Quantificar e comparar a área em μm^2 e a densidade óptica da MB, por meio de marcação imunohistoquímica de laminina e colágeno IV, em microscópio óptico, com auxílio de programa de análise computadorizada de imagens (KS-400[®], Karl Zeiss, Alemanha); em RAD e RES;
- e.** Determinar e comparar a expressão dos marcadores de proliferação celular Ki-67 e PCNA nos epitélios císticos por meio da percentagem de células positivas, da área em μm^2 e da densidade óptica da área com marcação imunohistoquímica positiva em RAD e RES.

4. Materiais e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP), segundo protocolo 128/2002, previamente à sua execução.

4.1. Obtenção do material

Foram selecionados 34 casos de GP, 31 de RAD e 36 casos de RES dos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), do período de 1966 a 2003. Os espécimes deste serviço são rotineiramente fixados em formol 10% tamponado; incluídos em parafina, cortados com 5 μ m de espessura e corados com Hematoxilina & Eosina (HE). Foram realizados novos cortes após a pré-seleção e estes foram corados com HE para confirmação do diagnóstico das lesões. Todos os casos foram avaliados e selecionados considerando-se o diagnóstico e a preservação estrutural e espacial das lesões (figuras 1 e 2), para que fosse possível a observação das cápsulas, distinguindo-as da zona central de inflamação, nos GP, e da região do epitélio cístico, nos RAD e RES. Os casos onde não havia preservação estrutural das lesões não foram incluídos na pesquisa. Foram descartados também os espécimes que apresentavam características histológicas de inflamação aguda exacerbada.

4.2. Obtenção dos cortes

Após a seleção dos casos, foram realizados cortes semi-seriados dos blocos, com 3 μ m de espessura, e estes foram então fixados em lâminas silanizadas (3-aminopropyl-triethoxysilane, Sigma Aldrich[®], EUA) e colocados em estufa a 56°C por 24 horas. Em seqüência, os cortes foram diafanizados em xilol por 30 min em estufa a 57°C, seguindo-se uma troca de 20 min em temperatura ambiente (cerca de 25°C) e hidratação em concentrações decrescentes de etanol (absoluto, 90%, 70%, 50% e água).

4.3. Imunohistoquímica

Para a identificação imunohistoquímica das células, índice de proliferação epitelial, e membranas basais dos epitélios císticos foram utilizados os anticorpos descritos na tabela 1.

Após a re-hidratação, os cortes foram lavados em água corrente e incubados com solução aquosa de peróxido de hidrogênio (10 vol., Dinâmica - Brasil) em 5 trocas de 5 min cada, para bloqueio da peroxidase endógena.

A recuperação antigênica foi realizada em microondas para todos anticorpos, com exceção de laminina, colágeno IV e mastócitos. Foram utilizados 2 ciclos de 12 min em potência máxima no microondas, com os cortes imersos em solução de ácido cítrico 10 mM pH 6,0. A recuperação antigênica para o anticorpo anti-mastócitos, assim como para o anticorpo anti-Colágeno IV, foi realizada por digestão enzimática com solução 0,1% de Tripsina diluída em PBS (phosphate-buffered saline), pH 7,4 em estufa a 37°C por 1 hora. Na recuperação antigênica para o anticorpo anti-Laminina, foi utilizada a digestão enzimática por 50 min com solução 0,4% de pepsina diluída em glicina (GIBCO BRL®, EUA) pH 2,2 em estufa a 37°C. Após a recuperação antigênica; os cortes foram lavados por três vezes de 5 minutos cada, com solução fosfatada tamponada (PBS) e incubados com os anticorpos primários, em câmara úmida a 4°C por 16 horas. Em seqüência foram lavados com PBS (3 trocas) e incubados com Complexo StreptABC/HRP Duet®, Mouse/Rabbit (DAKO, Dinamarca). A primeira incubação foi realizada por 30 min. a 37°C para o anticorpo secundário biotilado e a segunda incubação por mais 30 min. a 37°C com o complexo Streptavidina – Biotina (Dako, Dinamarca). Os cortes foram então corados com solução de diaminobenzidina (DAB®, Sigma Aldrich, EUA), peróxido de hidrogênio hidrogênio (10 vol., Dinâmica - Brasil) e dimetil sulfoxido (DMSO®, Sigma Aldrich, EUA) por 5 minutos e contra-corados com hematoxilina de Carazzi (Nuclear, Brasil).



Figura 1: Lesão periapical removida com um dente extraído, preservando sua estrutura espacial.



Figura 2: Aspecto macroscópico interno de uma lesão com preservação estrutural.

Tabela 1: Relação dos anticorpos utilizados (DAKO[®], Dinamarca) segundo o clone, a concentração e a especificidade de marcação.

Anticorpo	Clone	Concentração	Análise
Anti- T Cell, CD3	---	1:500	Linfócitos T-CD3+
Anti- T Cell, CD8	C8/144B	1:200	Linfócitos T-8
Anti- CD20cy, B Cell	L26	1:10.000	Linfócitos B
Anti-Plasma Cell	VS38c	1:200	Plasmócitos
Anti-Macrophage , CD68	PG-M1	1:400	Macrófagos
Anti-Mast Cell Tryptase	AA1	1:10.000	Mastócitos
Anti-Ki-67 antigen	MIB	1:200	Índice de proliferação
Anti-PCNA	PC10	1:16.000	Índice de proliferação
Anti-Laminin	4C7	1:50	Membrana basal
Anti-Collagen IV	CTV 22	1:10	Membrana basal

4.4. Leitura dos resultados

Para a leitura dos resultados foram selecionados seis campos para cada lâmina em microscópio óptico com ocular Kp1 40x e objetiva de 40x. Nos GP, três campos foram selecionados na região periférica (cápsula) e três campos na região central. Nos RAD e RES foram selecionados três campos na região periférica (cápsula) e três campos na região subepitelial. Para a seleção e análise dos campos, foram consideradas as áreas de maior integridade estrutural e positividade mais evidente (caso houvesse positividade) para marcação imunohistoquímica em cada corte histológico.

As células inflamatórias foram contadas individualmente, considerando-se tanto as marcações positivas quanto negativas. A contagem foi realizada com auxílio de programa de análise computadorizada de imagens (KS-400[®], Karl Zeiss, Alemanha). Os índices de positividade para cada anticorpo foram determinados por meio da percentagem de células com marcação positiva dentro do número total de células em cada campo analisado. Foi obtida uma média das três leituras realizadas para cada região (periferia ou centro) em cada caso. A expressão das proteínas de matriz na membrana basal epitelial (Laminina e Colágeno IV) foi avaliada por meio de microscópio óptico, com ocular Kp1 40x, e objetiva de 100x, com auxílio do programa de análise computadorizada de imagens (KS 400[®] Karl Zeiss, Alemanha), realizando-se a medição da área (em μm^2) e leitura da densidade óptica das membranas basais marcadas para cada uma destas proteínas. Também nestes casos, foram selecionadas três áreas de leitura e obtido um valor médio para a área da membrana basal e para a densidade óptica nas lesões marcadas com anticorpo anti- Laminina e Colágeno IV.

Para os marcadores de proliferação celular (Ki-67 e PCNA), as células com marcação positiva no epitélio cístico foram contadas individualmente utilizando-se microscópio óptico com ocular Kp1 40x e objetiva de 40x. A positividade para cada anticorpo foi determinada visualmente. O percentual de células positivas em relação ao número total de células no epitélio de cada campo avaliado determinou a expressão de cada marcador. Além disso, a área de marcação imunohistoquímica positiva nas células dentro de cada campo (em μm^2) e a densidade óptica de marcação também foram avaliadas.

Novamente, foi obtido um valor médio entre as três leituras realizadas para cada um destes itens avaliados em cada caso.

4.5. Análise dos resultados

Os dados obtidos nas leituras foram digitados em planilha eletrônica (EXCEL[®] 9.0/2000, Microsoft, EUA) e exportados, conforme a necessidade, para o programa EPI-Info 6.02b (CDC, EUA). De acordo com o tipo de cada variável e com o estudo de suposições, os resultados foram analisados por meio dos testes de Kruskal-Wallis e F. A distribuição das células inflamatórias e a expressão das proteínas de matriz e marcadores de índice de proliferação, obtidas por meio de contagem, medição de área ou densidade óptica, foram comparadas entre os campos avaliados em cada região das lesões (cápsula, centro ou subepitelial) e entre cada tipo de lesão (GP, RAD ou RES).

5. Resultados

5. RESULTADOS

As células inflamatórias mais freqüentemente encontradas foram os plasmócitos e linfócitos T. Linfócitos B e macrófagos apresentaram valores de concentração intermediários, enquanto que os menores valores obtidos foram para mastócitos. Plasmócitos e linfócitos B mostraram um padrão decrescente de concentração de acordo com o estágio evolutivo das lesões; ou seja, mais freqüentes nos GP, seguindo-se os RAD e RES. Comportamentos inversos foram observados para as concentrações de linfócitos T (CD3+) e sua subclasse LT-CD8+ (gráfico 1). Os padrões de concentração e distribuição dos diferentes tipos celulares estudados podem ser observados na tabela 2 e são descritos detalhadamente a seguir.

5.1. CD3

Os LT-CD3+ foram mais freqüentes nos RAD e nos RES. A média da porcentagem de células CD3+ nos GP foi significativamente menor em relação às duas outras lesões (Kruskal-Wallis, $p=0,000$). No entanto, as médias de porcentagem de LT-CD3+ não mostraram diferenças significativas entre RAD e RES. A análise com relação às regiões (cápsula, subepitelial e centro) de cada lesão não mostrou diferença significativa, exceto entre a região subepitelial e a cápsula dos RAD (teste F, $p=0,000$), sendo maior na região subepitelial (tabela 2) (figura 3).

5.2. CD8

Os LT-8 apresentaram concentrações significativamente diferentes entre as lesões (Kruskal-Wallis, $p=0,000$). Os maiores valores obtidos foram nos RES, com concentrações decrescentes para RAD e GP. Não houve diferença estatística na distribuição destas células em relação às regiões central ou periférica de nenhuma das lesões (tabela 2).

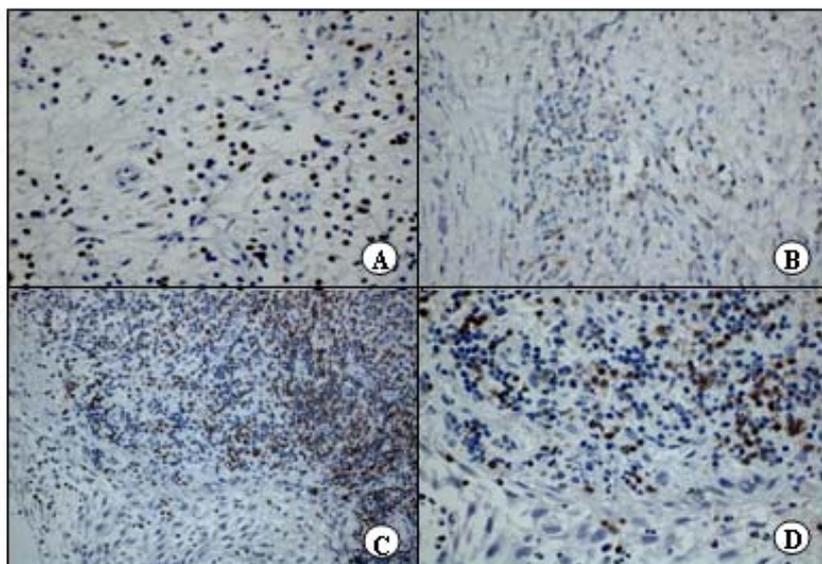


Figura 3: Marcação imunohistoquímica para CD3. A - distribuição na cápsula de cisto radicular (aumento de 400x); B - distribuição na cápsula de cisto residual (aumento de 400x); C - distribuição em região subepitelial de cisto radicular (aumento de 200x); D - detalhe em aumento de 400x de linfócitos T CD3 positivos em região subepitelial de cisto radicular.

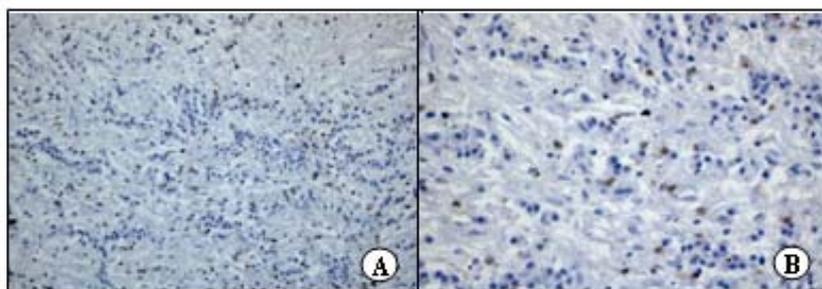


Figura 4: Distribuição de linfócitos T-8 na cápsula de cisto residual. A - aumento de 200x; B - aumento de 400x.

5.3. CD20

As médias de contagem de LB foram significativamente maiores em GP, seguidos por RAD e RES (Kruskal-Wallis, $p=0,000$). Entretanto, quando comparados RAD e RES de forma isolada, não foram encontradas diferenças significativas. Novamente, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na distribuição de LB entre as regiões central e periférica das lesões analisadas (figura5).

5.4. CD68

As médias de contagem de macrófagos (CD68+) não foram significativamente diferentes nas três lesões estudadas. No entanto, contagens significativamente maiores foram obtidas na região central dos GP (teste F, $p=0,002$) e na cápsula dos RES (teste F, $p=0,005$) (figura7), em relação às outras regiões destas lesões (tabela 2).

5.5. Plasmócitos

As contagens de plasmócitos foram significativamente diferentes entre as lesões (Kruskal-Wallis, $p=0,000$). As maiores contagens de células positivas ocorreram nos GP, sendo progressivamente menores nos RAD e RES. As contagens foram significativamente mais elevadas na região periférica dos GP (teste F, $p=0,000$) e na região subepitelial dos RES (teste F, $p=0,000$) em relação à cápsula (tabela 2) (figura6).

5.6. Mastócitos

Mastócitos foram as células inflamatórias encontradas com menor frequência em todas as lesões. Não houve diferença estatisticamente significativa na contagem de mastócitos entre os cistos. Entretanto, sua contagem nos GP foi significativamente menor que nos cistos (Kruskal-Wallis, $p=0,000$). Mastócitos foram significativamente mais frequentes na região de cápsula (figura 8) em relação à região central ou sub epitelial nas três lesões (teste F, $p=0,000$) como pode ser visto na tabela 2.

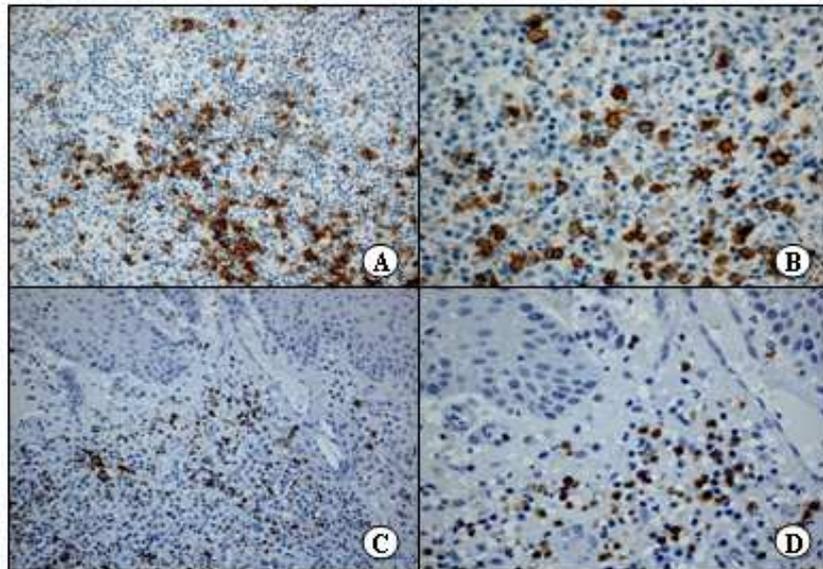


Figura 5: Marcação imunohistoquímica para linfócitos B. A - distribuição na região central de granuloma periapical (aumento de 200x); B - na cápsula de cisto residual (aumento de 400x); C - distribuição na região subepitelial de cisto periapical (aumento de 200x); D - distribuição na região subepitelial de cisto radicular (aumento de 400x).

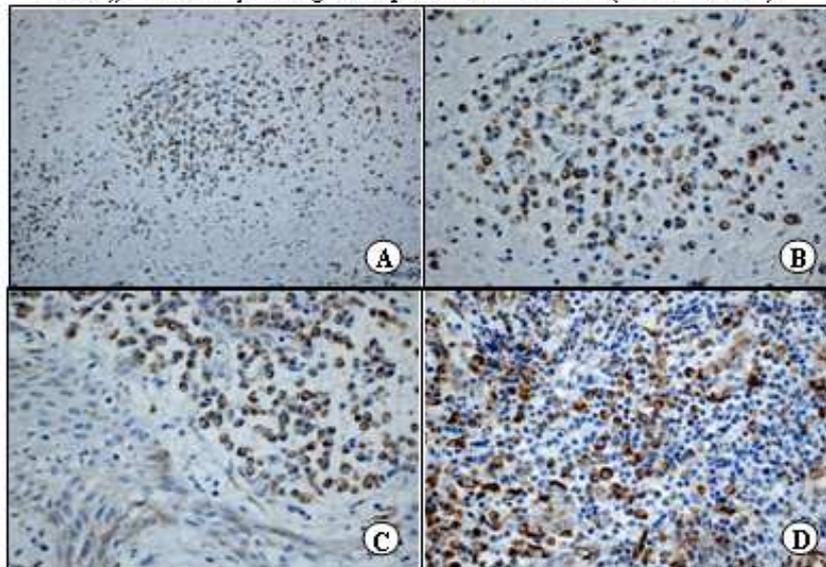


Figura 6: Marcação imunohistoquímica para plasmócitos. A - distribuição na cápsula de cisto residual (aumento de 200x); B - distribuição na cápsula de cisto residual (aumento de 400x); C - distribuição na região subepitelial de cisto radicular (aumento de 400x); D - distribuição na região central de granuloma periapical (aumento de 400x).

5.7. Marcadores de proliferação celular (Ki-67 e PCNA)

O índice de proliferação epitelial, medido por meio da porcentagem de células, positivas mostrou-se significativamente maior (Kruskal-Wallis, $p=0,000$) nos RAD em relação aos RES para os dois marcadores de proliferação analisados (PCNA e Ki-67), como pode ser visto na tabela 3. A análise da área de marcação positiva (em μm^2) produziu resultados semelhantes (Ki-67: Kruskal-Wallis $p=0,000$; PCNA: Kruskal-Wallis $p=0,001$). Apesar de ter havido diferença estatisticamente significativa nos valores de densidade óptica entre os RAD e RES, esses valores não se apresentaram homogêneos entre os dois marcadores analisados. Houve maior valor nos RES em relação aos RAD para PCNA (Kruskal-Wallis, $p=0,006$) e o inverso ocorreu para o marcador Ki-67 (Kruskal-Wallis, $p=0,006$).

5.8. Membrana Basal (Laminina e Colágeno IV)

As médias das áreas de marcação positiva em μm^2 foram significativamente maiores nas membranas basais dos RES em relação aos RAD tanto para laminina (Kruskal-Wallis, $p=0,003$) quanto para Colágeno IV (Kruskal-Wallis, $p=0,002$). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa nas médias de leitura de densidade óptica entre os dois cistos para a marcação de Colágeno IV (Kruskal-Wallis, $p=0,760$). A leitura da densidade óptica da laminina foi significativamente maior nos RAD em relação aos RES (Kruskal-Wallis, $p=0,000$), ao contrário do Colágeno IV, que apresentou maior leitura no RES, ainda que sem significância estatística (tabela 4).

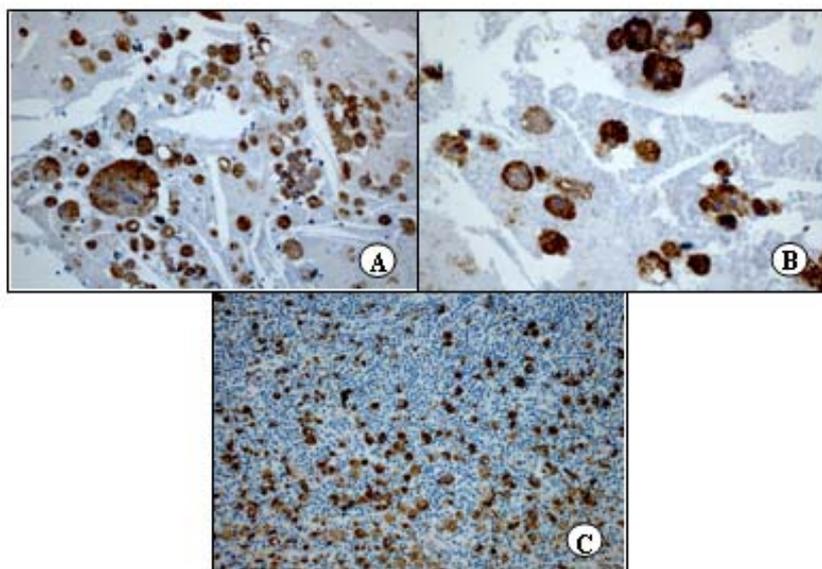


Figura 7: Marcação imunohistoquímica para macrófagos. A - distribuição na cápsula de cisto residual, associados a cristais de colesterol (aumento de 200x); B - distribuição na cápsula de cisto residual (aumento de 400x); C - distribuição na região central de granuloma periapical (aumento de 200x).

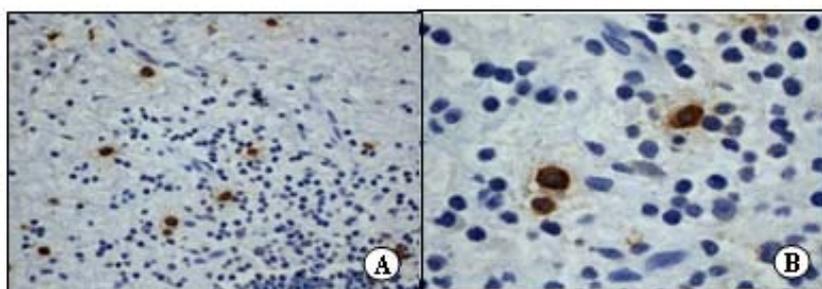


Figura 8: Marcação imunohistoquímica para mastócitos. A - distribuição na cápsula de cisto residual (aumento de 200x); B - distribuição na cápsula de cisto residual (aumento de 1000x)

Tabela 2. Médias de concentração de cada tipo celular analisado e suas distribuições entre cápsula e região central para cada lesão.

	Granuloma			Cisto Radicular			Cisto Residual		
	Centro	Cápsula	Total	Centro	Cápsula	Total	Centro	Cápsula	Total
CD3	18,77 ± 3,57	18,31 ± 2,26	18,62 ± 3,05	37,99 ± 5,22	30,23 ± 7,75	35,31 ± 5,43	35,55 ± 6,22	35,45 ± 3,06	35,85 ± 2,83
CD8	7,03 ± 1,38	6,34 ± 1,73	6,98 ± 1,37	12,58 ± 5,16	13,07 ± 4,68	13,00 ± 4,25	22,24 ± 6,08	24,05 ± 6,96	22,76 ± 6,32
CD20	12,64 ± 5,68	9,20 ± 2,89	11,93 ± 4,51	10,85 ± 3,04	8,94 ± 2,51	10,00 ± 4,00	7,52 ± 1,00	7,21 ± 2,06	7,44 ± 3,32
CD68	16,98 ± 3,94	14,08 ± 3,77	15,84 ± 3,31	14,46 ± 2,77	14,61 ± 3,09	14,55 ± 2,86	14,94 ± 2,81	17,00 ± 3,31	15,76 ± 2,93
Plasmócito	38,89 ± 5,83	45,69 ± 9,53	41,31 ± 6,49	30,57 ± 9,91	32,01 ± 9,82	31,05 ± 7,92	15,64 ± 5,54	6,01 ± 2,92	11,35 ± 4,03
Mastócito	0,57 ± 0,06	1,66 ± 0,09	0,98 ± 0,58	1,05 ± 0,08	2,18 ± 0,13	1,51 ± 0,81	0,89 ± 0,04	2,67 ± 0,18	1,68 ± 0,75

Tabela 3. Médias de percentagem de células positivas, área com marcação positiva (em μm^2) e densidade óptica (DO) das áreas positivas para a marcação com Ki-67 e PCNA nas células do epitélio dos cistos radicular e residual.

	Cisto Radicular		Cisto Residual	
	PCNA	Ki-67	PCNA	Ki-67
Percentagem	49,89 ± 5,24	20,58 ± 8,58	42,92 ± 4,39	8,05 ± 1,20
Área	838,11 ± 160,31	670,60 ± 182,99	640,67 ± 156,44	292,78 ± 98,78
DO	92,27 ± 03,58	98,39 ± 25,59	98,16 ± 11,24	87,14 ± 17,43

Tabela 4. Médias das áreas positivas (em μm^2) e densidade óptica (DO) das áreas positivas para a marcação de laminina e colágeno IV nas membranas basais dos epitélios dos cistos radiculares e residuais.

	Cisto Radicular		Cisto Residual	
	Laminina	Colágeno IV	Laminina	Colágeno IV
Área	294,90 \pm 59,05	120,22 \pm 41,77	681,42 \pm 124,89	576,07 \pm 128,48
DO	96,70 \pm 20,29	64,19 \pm 15,74	83,04 \pm 20,13	69,13 \pm 22,41

Concentração de Células Inflamatórias nos Granulomas e Cistos

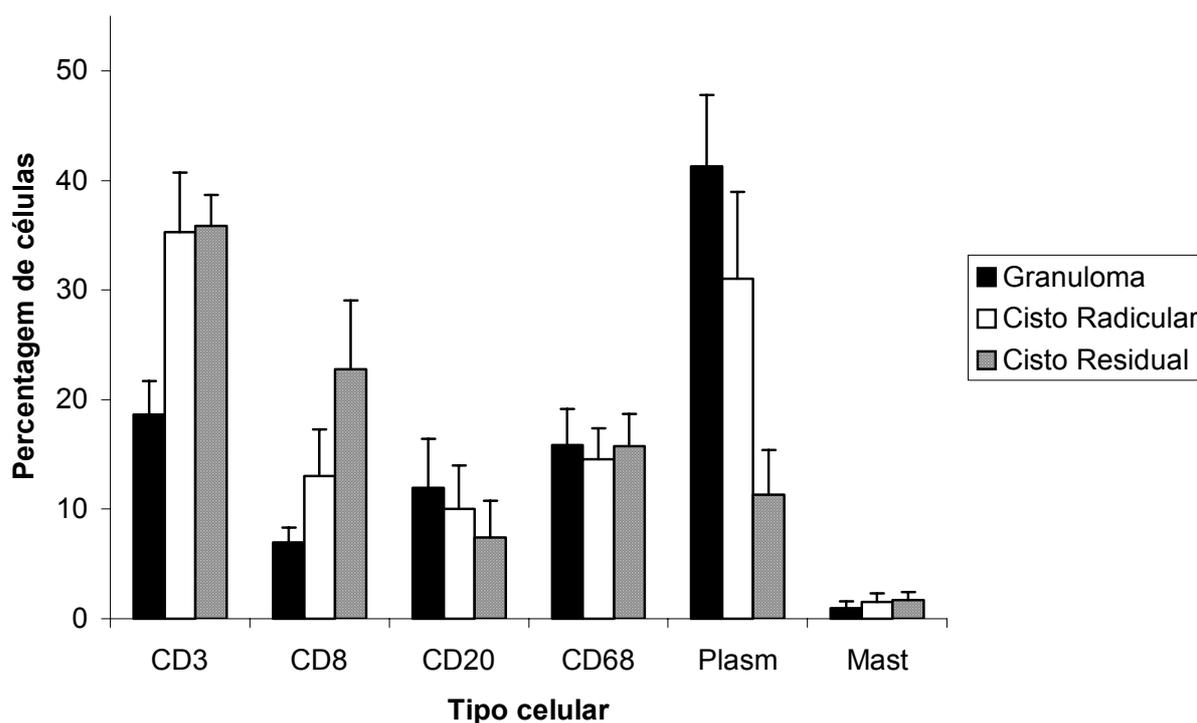


Gráfico 1: Percentagem total de linfócitos T-CD3+ (CD3), linfócitos T-8 (CD8), linfócitos B (CD20), macrófagos (CD68), plasmócitos (Plasm) e mastócitos (Mast) entre granulomas periapicais, cistos radiculares e cistos residuais.

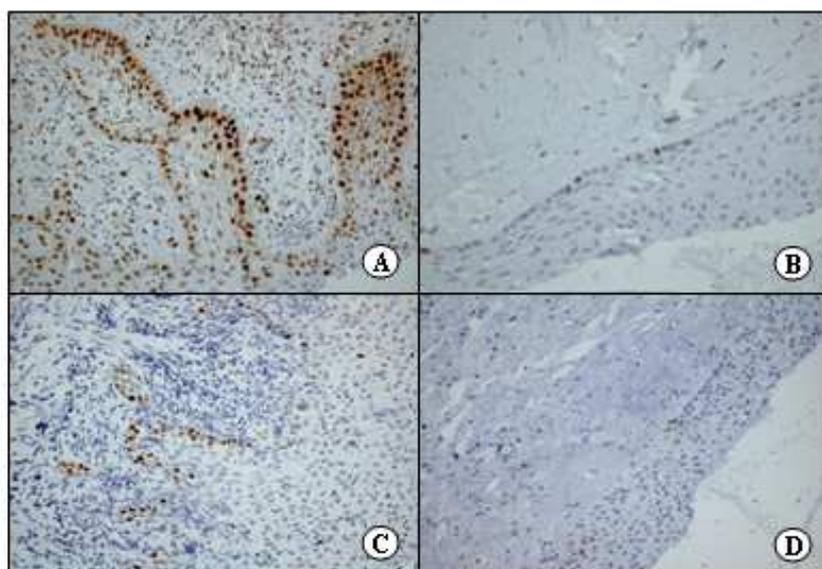


Figura 9: Evidenciação do índice de proliferação epitelial. A - marcação para PCNA em cisto radicular (aumento de 200x); B - marcação para PCNA em cisto residual (aumento de 200x); C - marcação para Ki-67 em cisto radicular (aumento de 200x); D - marcação para Ki-67 em cisto residual (aumento de 200x).

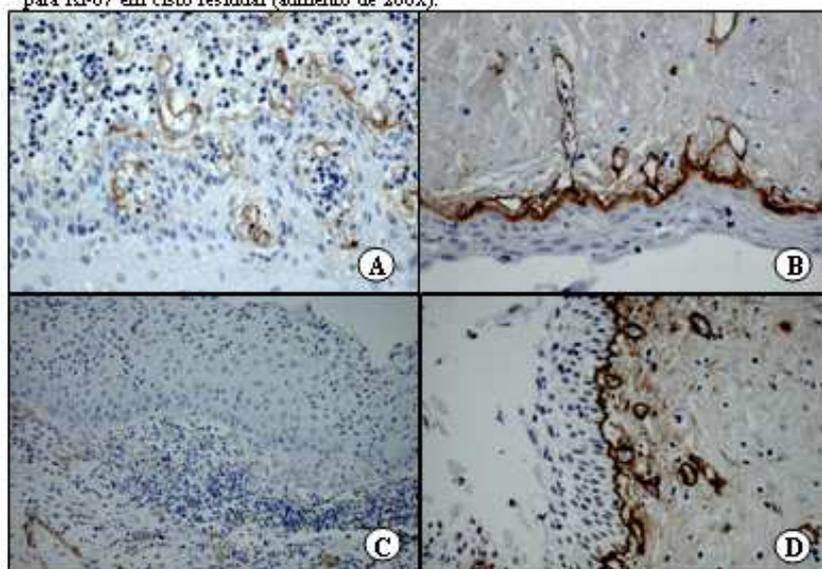


Figura 10: Evidenciação da membrana basal. A - marcação para colágeno IV em cisto radicular (aumento de 400x); B - marcação para colágeno IV em cisto residual (aumento de 400x); C - marcação negativa para laminina em cisto radicular (aumento de 200x); D - marcação para laminina em cisto residual (aumento de 400x).

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

Assim como todas as lesões com presença de infiltrado inflamatório inespecífico, a patogênese dos GP e dos RAD e RES ocorre de forma progressiva e é dependente dos diferentes tipos de células inflamatórias. Estas células desempenham papéis específicos importantes durante o desenvolvimento das lesões. Neste estudo, a relação do infiltrado inflamatório com o epitélio cístico e a MB foi determinada por meio da proximidade das células com essas regiões. A eventual “progressividade” apresentada pelos GP, RAD e RES é baseada na história natural destas lesões e permitiu avaliar o comportamento das células inflamatórias durante diferentes estágios no seu desenvolvimento. Em seus diversos estágios de evolução, GP, RAD e RES podem sofrer agudização, em geral associada com reinfecção da lesão. Nessas ocasiões, apresentam características de processo inflamatório agudo, com abundante presença de polimorfonucleares neutrófilos (Takahashi et al, 1996). Estas células são importantes na fase inicial do processo inflamatório, pois bloqueiam a disseminação da lesão no periápice e participam do recrutamento e maturação de osteoclastos, assim como na formação de tecido de granulação (Langeland et al, 1977; Kaufmann, 1993; Marton and Kiss, 2000). Entretanto, neste estudo a ênfase foi para a análise da fase crônica das lesões; descartando-se as lesões com inflamação aguda exacerbada.

Os macrófagos participam na defesa do periápice desde os primeiros momentos e foram analisados neste estudo por meio da marcação para CD-68. Apesar da grande variação relatada na proporção de células CD-68+ nas lesões periapicais, este estudo mostrou valores de concentração similares aos encontrados por outros autores (Bergenholtz et al, 1983; Kontiainen et al, 1986; Kopp and Schwarting, 1989; Marton and Kiss, 1993; Kawashima et al, 1996; Oliveira and Lara, 2001). A contagem de macrófagos situou-se logo abaixo das contagens de LT e plasmócitos, o que já foi reportado anteriormente (Piattelli et al, 1991; Marton and Kiss, 2000; Liapatas et al, 2003). Ainda que alguns trabalhos tenham relatado maior frequência de macrófagos nos RAD (Kopp and Schwarting, 1989), este estudo demonstrou uma distribuição semelhante destas células entre as lesões analisadas, em consonância com a maior parte das pesquisas disponíveis na literatura (Matsuo et al, 1992; Walker et al, 2000; Oliveira and Lara, 2001; Liapatas et al,

2003). Parece haver, entretanto, diferença na distribuição dos macrófagos quanto à região das lesões. A maior concentração encontrada na região central dos GP deve estar relacionada à atuação dos macrófagos na resposta inflamatória inespecífica, particularmente importante nos GP, e que irá favorecer a progressão para estágios mais crônicos da lesão (Oliveira and Lara, 2001). Após seu recrutamento para a região central do GP, os macrófagos fagocitam microorganismos e restos celulares e são estimulados por citocinas (Marton and Kiss, 2000). Durante esta fase, há produção de metabólitos do ácido aracdônico, radicais livres, derivados do metabolismo de óxido nítrico e metaloproteinases de matriz, que podem contribuir para a degradação ou alteração do metabolismo dos tecidos adjacentes às lesões no periápice (Birkedal-Hansen, 1987; Stashenko, 1990; Evans and Ralston, 1996).

A progressão da doença e a instalação do processo de cronicidade são influenciados também pela interação dos macrófagos com outras células durante a inflamação (Takahashi, 1998; Marton and Kiss, 2000; Oliveira and Lara, 2001). Macrófagos apresentam fragmentos antigênicos previamente digeridos por meio da expressão de complexos de histocompatibilidade maior de classe II (MHC-II) e também causam ativação de linfócitos B (Kopp and Schwarting, 1989; Kawashima et al, 1996). Produzem interleucina oito (IL-8), interleucinas 1α e 1β (IL- 1α e IL- 1β) e fator de necrose tumoral α (FNT- α), que têm, entre outras funções, a de recrutamento e ativação de monócitos, leucócitos polimorfonucleares e LT de memória, reabsorção óssea, inibição do processo de reparo e formação do tecido de granulação organizado (Nathan, 1987; Kopp and Schwarting, 1989; Bando et al, 1993; Marton and Kiss, 2000; Oliveira and Lara, 2001). Neste estudo foram observados valores similares para a contagem de macrófagos em ambos os cistos. Apesar de significativamente menores que os valores encontrados na região central de GP, não houve variação muito intensa entre as lesões. Portanto, os macrófagos parecem ter atuação contínua, direta ou indiretamente, durante toda a progressão das lesões, influenciando também na diferenciação de outros tipos celulares, como os LT (Kopp and Schwarting, 1989; Liapatas et al, 2003). Os valores significativamente maiores na concentração de macrófagos observados na região da cápsula dos RES podem parecer paradoxais, uma vez que estas lesões representam estágios onde a inflamação é menos

intensa. Contudo, esses valores são relativos. A presença de cristais de colesterol, que não foi observada de maneira tão freqüente em GP e RAD deste estudo, pode ter favorecido o acúmulo destas células. Oliveira et al (Oliveira and Lara, 2001) observaram uma maior concentração de macrófagos na região subepitelial de RAD e, assim como as células dendríticas e células apresentadoras de antígenos, estas células podem estar relacionados à proliferação epitelial nestas lesões (Gao et al, 1988b; Liapatas et al, 2003). Entretanto, a relação destas células com o epitélio dos cistos não foi evidenciada neste estudo, já que não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na sua distribuição entre a região periférica e a subepitelial (Liapatas et al, 2003). Além disso, as contagens de macrófagos foram similares em ambos os cistos, ainda que os índices de proliferação epitelial entre estas duas lesões tenham sido significativamente diferentes.

De forma geral, LT e plasmócitos foram as células mais freqüentemente encontradas nas três lesões; o que está de acordo com os relatos prévios na literatura (Kontinen et al, 1986; Yu and Stashenko, 1987; Piattelli et al, 1991; Sol et al, 1998; Liapatas et al, 2003). Os LT predominaram entre as lesões císticas, diferentemente dos plasmócitos e LB, mais freqüentes nos GP. O predomínio dos LT sobre os LB nas lesões periapicais, observado neste estudo, já foi relatado anteriormente (Torabinejad and Kettering, 1985; Kontinen et al, 1986; Piattelli et al, 1991; Sol et al, 1998). As contagens de LB, apesar de baixas, estão de acordo com as observações de estudos anteriores, que relataram percentagens pequenas de LB na população total de linfócitos em GP e RAD (Kontinen et al, 1986; Stashenko et al, 1992). Entretanto, alguns estudos relataram populações similares de LT e LB nestas lesões (Liapatas et al, 2003).

A importância das células CD-20+ parece ser maior durante as fases mais ativas da inflamação. As contagens de LB foram proporcionais às contagens de plasmócitos nas três lesões. Este comportamento pode indicar a associação de atividades entre estas duas células. Os valores obtidos indicam que a participação de ambas as células no processo inflamatório das lesões periapicais diminui à medida que ocorre a progressão de uma lesão à outra (do GP ao RES), ao contrário dos LT, que predominaram nos cistos em relação aos GP. À semelhança do que ocorre nas lesões periodontais em evolução (Seymour and Greenspan, 1979; Seymour et al, 1982), os LB encontrados nos tecidos periapicais são

ativados por lipopolissacarídeos derivados das bactérias e também por linfócitos T- auxiliares (Tew et al, 1989; Tani et al, 1992; Tough et al, 1997) e produzem citocinas, como a IL-1, capazes de estimular a reabsorção óssea (Matsushima et al, 1985). Não foram estabelecidas relações entre este tipo celular e os índices de proliferação epitelial ou o comportamento da membrana basal do epitélio cístico, já que sua distribuição não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as regiões central e periférica das lesões analisadas.

Neste estudo, os LT foram detectados em conjunto por meio da marcação com o anticorpo anti-CD3 (pan-T). Apenas o subtipo LT-8 foi analisado de forma separada. As maiores concentrações relativas de LT-CD3+ e LT-8 foram encontradas nos cistos e apresentaram-se significativamente menores nos GP. Esses valores indicam que a resposta imune celular atua de forma menos intensa nas fases iniciais da inflamação no periápice, ao contrário do que foi observado para a resposta imune humoral. Houve diferença significativa na distribuição por área de LT-CD3+ apenas em RAD. Nestas lesões os LT-CD3+ concentraram-se na região subepitelial. No entanto, foi observado que a concentração de LT-8 não foi significativamente maior na região subepitelial de RAD. Estas observações poderiam sugerir que a maior concentração de LT na região subepitelial dos RAD corresponde a outros subtipos destas células, como os LT-4. Nos RAD, já foi sugerido que a produção de IL-6 pelos LT-4 esteja relacionada à estimulação da proliferação epitelial (Cury et al, 1998). Todavia, é importante determinar se a distribuição de LT-4 confirma estes dados. Nos RES a relação entre linfócitos e o epitélio não foi claramente estabelecida, pois tanto LB quanto LT não se mostraram diretamente vinculados a esta estrutura. Os resultados deste estudo sugerem papel regulatório e imunossupressor para LT-8, com participação no processo de estabilização das lesões periapicais, posto que a proporção de LT-8 foi maior nas lesões que se encontravam em processo de estabilização (Benacerraf and Germain, 1981; Kontiainen et al, 1986; Stashenko and Yu, 1989; Stashenko et al, 1992; Marton and Kiss, 2000; Oliveira and Lara, 2001).

Os plasmócitos predominaram principalmente nos GP. Alguns estudos citam estas células como as mais frequentes nas lesões periapicais (Bergenholtz et al, 1983; Piattelli et al, 1991; Takahashi, 1998; Marton and Kiss, 2000). A participação das imunoglobulinas

(Ig) produzidas pelos plasmócitos durante a progressão das lesões periapicais ainda não é claro. Acredita-se que a influência de resposta humoral seja importante, visto que macacos imunizados apresentaram lesões periapicais menores em relação aos animais não imunizados (Dahlen et al, 1982; Akamine et al, 1994b). Embora haja estudos mostrando que diferentes tipos de Ig podem ter influência nos processos de expansão ou estabilização das lesões periapicais (Kuntz et al, 1977; Pulver et al, 1978; Stern et al, 1981; Johannessen et al, 1983; Matsumoto, 1985; Torres et al, 1994; Matsuo et al, 1995; Marton and Kiss, 2000), a participação de citocinas produzidas pelos plasmócitos e LB parece ser mais importante (Akamine et al, 1994b). A produção de IL-1, e PGE₂, induz a reabsorção óssea (Matejka et al, 1986; Takahashi, 1998). Assim como os LT, os plasmócitos podem produzir FNT- α , IL-6 e IL-10 e, portanto, podem regular a atividade de metaloproteinases de matriz (MMP) (Ahmed et al, 1994; Matthes et al, 1995; Di Girolamo et al, 1997; Di Girolamo et al, 1998). Neste estudo, a atividade dos plasmócitos sobre os processos destrutivos foi evidenciada. Estas células foram encontradas em concentrações significativamente mais elevadas nos GP, sugerindo-se que representam um componente importante durante os estágios iniciais de instalação da lesão no periápice. Ainda que o presente estudo não permita determinar o grau de atuação da resposta humoral na progressão das lesões periapicais, é possível afirmar que ela é um componente importante na resposta inicial frente à agressão ao periápice. Essa resposta adquire um caráter cada vez mais celular, com a diminuição dos estímulos inflamatórios. Na região da cápsula dos GP, os plasmócitos apresentaram-se permeando outros tipos celulares, como os macrófagos e neutrófilos. Essa característica pode ser importante para se determinar o comportamento da resposta humoral nesta região. A associação com o epitélio cístico nos RES pode estar relacionada com a diminuição do potencial proliferativo, idéia que é reforçada pela observação de que nos RAD; onde há maior proliferação epitelial, os plasmócitos não se associaram ao epitélio.

As concentrações de mastócitos encontradas entre GP, RAD e RES neste estudo, estão de acordo com os dados relatados na literatura, que mostram pequena participação destas células no infiltrado inflamatório (Marton et al, 1990; Piattelli et al, 1991). A observação de mastócitos predominantemente na cápsula das lesões pode ser um indicativo de sua participação na formação desta estrutura. A produção de substâncias biologicamente

ativas, como histamina, heparina, triptase, quimase, PGD₂, leucotrieno C₄, fator básico de crescimento de fibroblastos, FNT- α , IL-2, IL-4 e IL-8 pode ser importante durante a formação da cápsula e estabilização das lesões (Yanagisawa, 1980; Artuc et al, 1999). Estas substâncias estão relacionadas à proliferação de fibroblastos e síntese de proteínas de matriz (Dayton et al, 1989; Hatamochi et al, 1991; Ruoss et al, 1991; Gillery et al, 1992; Postlethwaite et al, 1992; Cairns and Walls, 1997; Algermissen et al, 1999). Alguns autores acreditam que os mastócitos inibem as atividades mitogênica e antigênica de LT, inibindo a produção da IL-2 e interferon- γ , ou removendo-os após as fases ativas da inflamação (Rocklin, 1976; Dohlsten et al, 1987; Piattelli et al, 1991). A concentração significativamente maior de mastócitos nos cistos em relação aos GP está de acordo com observações prévias (Yanagisawa, 1980; Piattelli et al, 1991), que sugerem participação destas células no *feedback* negativo durante a progressão das lesões periapicais. Há evidências mostrando que células epiteliais em cultura com heparina, histamina e FNT- α têm sua proliferação inibida (Harper and Flaxman, 1975; Pillai et al, 1989; Cook et al, 1991). Neste estudo, entretanto, a relação entre mastócitos e epitélio não foi evidente, pois estas células foram encontradas principalmente em regiões distantes do epitélio.

O índice de proliferação epitelial conforme medido pela expressão de Ki-67 e PCNA foi significativamente maior nos RAD, como esperado. No entanto, essas observações foram verdadeiras apenas para a percentagem de células positivas e para a área de marcação (em μm^2). A medição da densidade óptica apresentou dados contraditórios entre RES e RAD e não foi considerada como um bom indicador para análise dos índices de proliferação. Nestas lesões pode haver grande variação quanto à expressão de Ki-67 e PCNA em termos de densidade óptica. Os resultados obtidos confirmam as diferenças encontradas na literatura entre os potenciais proliferativos dos componentes epiteliais de cistos odontogênicos (Li et al, 1994; Slootweg, 1995; Sun et al, 2001). Entretanto, estes estudos compararam os potenciais proliferativos de queratocistos, cistos dentígeros e cistos radiculares. Não há relatos na literatura comparando esta característica entre RAD e RES.

Aceita-se que o potencial indutivo das células inflamatórias seja de fundamental importância na proliferação e diferenciação das células epiteliais presentes nos cistos odontogênicos (Rodu et al, 1987; Gao et al, 1988a; Li et al, 1993; Tripi et al, 2003).

Entretanto, não se sabe ao certo qual mecanismo, quais substâncias biológicas ou quais tipos celulares estejam mais envolvidos nesta estimulação. Alguns autores propuseram que substâncias como a IL-1, IL-6, FNT, MMP (principalmente, MMP-1), TGF, EGF, e até mesmo triptase derivada de mastócitos são capazes de induzir a proliferação de células epiteliais, principalmente em áreas de inflamação intensa (Meghji et al, 1996; Cairns and Walls, 1996; Lin et al, 1997; Li et al, 1997; Kubota et al, 2000). Neste estudo, a associação com o epitélio cístico dos RAD parece ter ocorrido para os LT-CD3+, mas não para os LT-8. Os LT-8 parecem não estar diretamente relacionados à proliferação epitelial, já que não foram encontradas diferenças na distribuição entre as regiões dos RAD e RES. Os mastócitos predominaram para ambos os cistos na região da cápsula e, portanto, não parecem atuar de forma direta na indução ou inibição da proliferação epitelial, como já demonstrado anteriormente em epitélio brônquico (Cairns and Walls, 1996).

As diferenças significativas entre as áreas (em μm^2) de marcação para laminina e colágeno IV nas MB dos epitélios císticos indicam que o comportamento desta estrutura varia de acordo com o potencial proliferativo destas lesões, como já observado anteriormente (Oliveira et al, 2002). Observou-se neste estudo que, em lesões com infiltrado inflamatório mais intenso, a MB epitelial tende a apresentar-se menos exuberante, enquanto que, em lesões com infiltrado inflamatório escasso, esta estrutura apresenta-se mais espessa e com marcação mais intensa. Os dados obtidos sugerem que as interações entre a MB, a qualidade do infiltrado inflamatório e os componentes mesenquimais e epiteliais podem ser importantes para caracterizar o comportamento dos GP, RAD e RES durante sua evolução (Albini et al, 1986; Mercurio and Shaw, 1988; Oliveira et al, 2002; Wahlgren et al, 2003).

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

1. Há diferenças qualitativas e quantitativas entre os componentes inflamatórios presentes em GP, RAD e RES e estas observações podem estar relacionadas ao potencial proliferativo epitelial nestas lesões, bem como ao comportamento das MB dos epitélios císticos;
2. O método de análise proposto foi eficaz para caracterizar a distribuição e comportamento dos diferentes tipos de leucócitos, das proteínas componentes da membrana basal (laminina e colágeno IV) e dos marcadores de proliferação celular (Ki-67 e PCNA) em GP, RAD e RES;
3. Plasmócitos e linfócitos-T foram as células inflamatória mais frequentemente encontradas em GP, RAD e RES;
4. Os plasmócitos e LB apresentaram-se em concentrações decrescentes em GP, RAD e RES, enquanto linfócitos-T CD3+ e CD8+ apresentaram comportamento inverso;
5. LT-CD3+ predominaram na região subepitelial de RAD;
6. Plasmócitos apresentaram concentrações significativamente maiores nas regiões de cápsula e subepitelial de GP e RES, respectivamente;
7. Macrófagos apresentaram concentrações semelhantes nas três lesões, mas foram mais numerosos na região central de GP e na cápsula de RES;
8. Mastócitos foram as células inflamatórias menos frequentes nas três lesões, sendo mais numerosas na cápsula dos cistos;
9. O índice de proliferação epitelial foi significativamente maior nos RAD em relação aos RES quando comparadas a percentagem de células positivas e a área de marcação em μm^2 ;
10. A área de marcação imunohistoquímica para laminina e colágeno IV na MB do epitélio foi significativamente maior nos RES que nos RAD;
11. As observações realizadas neste estudo são importantes para a compreensão da patogênese e do comportamento clínico de cada lesão.

8. Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Abrahamson DR. (1986). Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. *J Pathol* **149**: 257-278.
- Ahmed AA, Nordlind K, Schultzberg M, Liden S. (1994). Interleukin-1 alpha- and beta-, interleukin-6- and tumour necrosis factor-alpha-like immunoreactivities in chronic granulomatous skin conditions. *Acta Derm Venereol* **74**: 435-440.
- Akamine A, Anan H, Hamachi T, Maeda K. (1994a). A histochemical study of the behavior of macrophages during experimental apical periodontitis in rats. *J Endod* **20**: 474-478.
- Akamine A, Hashiguchi I, Toriya Y, Maeda K. (1994b). Immunohistochemical examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* **10**: 121-128.
- Alavi AM, Gulabivala K, Speight PM. (1998). Quantitative analysis of lymphocytes and their subsets in periapical lesions. *Int Endod J* **31**: 233-241.
- Albini A, Graf J, Kitten GT, Kleinman HK, Martin GR, Veillette A et al. (1986). 17 beta-estradiol regulates and v-Ha-ras transfection constitutively enhances MCF7 breast cancer cell interactions with basement membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 8182-8186.
- Algermissen B, Hermes B, Feldmann-Boeddeker I, Bauer F, Henz BM. (1999). Mast cell chymase and tryptase during tissue turnover: analysis on in vitro mitogenesis of fibroblasts and keratinocytes and alterations in cutaneous scars. *Exp Dermatol* **8**: 193-198.
- Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grutzkau A, Henz BM. (1999). Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol* **8**: 1-16.
- Aumailley M, Smyth N. (1998). The role of laminins in basement membrane function. *J Anat* **193**: 1-21.
- Babal P, Soler P, Brozman M, Jakubovsky J, Beyly M, Basset F. (1987). In situ characterization of cells in periapical granuloma by monoclonal antibodies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **64**: 348-352.
- Bando Y, Henderson B, Meghji S, Poole S, Harris M. (1993). Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts. *J Oral Pathol Med* **22**: 221-227.
- Barkhordar RA, Desouza YG. (1988). Human T-lymphocyte subpopulations in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **65**: 763-766.
- Benacerraf B, Germain RN. (1981). A single major pathway of T-lymphocyte interactions in antigen-specific immune suppression. *Scand J Immunol* **13**: 1-10.
- Bergenholtz G, Lekholm U, Liljenberg B, Lindhe J. (1983). Morphometric analysis of chronic inflammatory periapical lesions in root-filled teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **55**: 295-301.

*De acordo com as normas da FOP/UNICAMP, baseada no modelo de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Birembaut P, Caron Y, van Cauwenberge D, Foidart JM. (1983). Distribution of laminin, a basement membrane glycoprotein in epithelial proliferations. A preliminary study in the breast, the lungs and uterine cervix. *Coll Relat Res* **3**: 25-31.
- Birkedal-Hansen H. (1987). Catabolism and turnover of collagens: collagenases. *Methods Enzymol* **144**:140-171.
- Brown DC, Gatter KC. (1990). Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* **17**: 489-503.
- Cairns JA, Walls AF. (1996). Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Immunol* **156**: 275-283.
- Cairns JA, Walls AF. (1997). Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts. *J Clin Invest* **99**: 1313-1321.
- Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G. (1987). The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. *J Immunol* **138**: 648-655.
- Carvallhais J, Aguiar M, Araujo V, Araujo N, Gomez R. (1999). p53 and MDM2 expression in odontogenic cysts and tumours. *Oral Dis* **5**: 218-222.
- Chen CH, Clegg DO, Hansma HG. (1998). Structures and dynamic motion of laminin-1 as observed by atomic force microscopy. *Biochemistry* **37**: 8262-8267.
- Christiano AM, Uitto J. (1996). Molecular complexity of the cutaneous basement membrane zone. Revelations from the paradigms of epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol* **5**: 1-11.
- Coletta RD, Veiga SS, Line SR. (1997). Immunohistochemical and biochemical analysis of laminin in neonatal rat first molars. *J Nihon Univ Sch Dent* **39**: 176-181.
- Cook PW, Pittelkow MR, Shipley GD. (1991). Growth factor-independent proliferation of normal human neonatal keratinocytes: production of autocrine- and paracrine-acting mitogenic factors. *J Cell Physiol* **146**: 277-289.
- Couchman JR, Hook M, Rees DA, Timpl R. (1983). Adhesion, growth, and matrix production by fibroblasts on laminin substrates. *J Cell Biol* **96**: 177-183.
- Cury VC, Sette PS, da Silva JV, de Araujo VC, Gomez RS. (1998). Immunohistochemical study of apical periodontal cysts. *J Endod* **24**: 36-37.
- Cymerman JJ, Cymerman DH, Walters J, Nevins AJ. (1984). Human T lymphocyte subpopulations in chronic periapical lesions. *J Endod* **10**: 9-11.
- Dahlen G, Fabricius L, Heyden G, Holm SE, Moller AJ. (1982). Apical periodontitis induced by selected bacterial strains in root canals of immunized and nonimmunized monkeys. *Scand J Dent Res* **90**: 207-216.
- Dayton ET, Caulfield JP, Hein A, Austen KF, Stevens RL. (1989). Regulation of the growth rate of mouse fibroblasts by IL-3-activated mouse bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* **142**: 4307-4313.
- Delzangles B, Boy-Lefevre ML, Forest N. (1997). Glycoproteins expression in apical pathologic tissues: clinical incidences. *J Endod* **23**: 565-568.
- Di Girolamo N, Tedla N, Lloyd A, Wakefield D. (1998). Expression of matrix metalloproteinases by human plasma cells and B lymphocytes. *Eur J Immunol* **28**: 1773-1784.

- Di Girolamo N, Visvanathan K, Lloyd A, Wakefield D. (1997). Expression of TNF-alpha by human plasma cells in chronic inflammation. *J Leukoc Biol* **61**: 667-678.
- Dimitroulis G, Curtin J. (1998). Massive residual dental cyst: case report. *Aust Dent J* **43**: 234-237.
- Dohlsten M, Sjogren HO, Carlsson R. (1987). Histamine acts directly on human T cells to inhibit interleukin-2 and interferon-gamma production. *Cell Immunol* **109**: 65-74.
- Engel J. (1992). Laminins and other strange proteins. *Biochemistry* **31**: 10643-10651.
- Engvall E. (1993). Laminin variants: why, where and when? *Kidney Int* **43**: 2-6.
- Engvall E. (1994). Cell adhesion in muscle. *Braz J Med Biol Res* **27**: 2213-2227.
- Erber WN, Pinching AJ, Mason DY. (1984). Immunocytochemical detection of T and B cell populations in routine blood smears. *Lancet* **1**: 1042-1046.
- Evans DM, Ralston SH. (1996). Nitric oxide and bone. *J Bone Miner Res* **11**: 300-305.
- Foidart JM, Bere EW, Jr., Yaar M, Rennard SI, Gullino M, Martin GR et al. (1980). Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a noncollagenous basement membrane glycoprotein. *Lab Invest* **42**: 336-342.
- Fried K, Risling M, Edwall L, Olgart L. (1992). Immuno-electron-microscopic localization of laminin and collagen type IV in normal and denervated tooth pulp of the cat. *Cell Tissue Res* **270**: 157-164.
- Gao Z, Flaitz CM, Mackenzie IC. (1996). Expression of keratinocyte growth factor in periapical lesions. *J Dent Res* **75**: 1658-1663.
- Gao Z, Mackenzie IC, Rittman BR, Korszun AK, Williams DM, Cruchley AT. (1988a). Immunocytochemical examination of immune cells in periapical granulomata and odontogenic cysts. *J Oral Pathol* **17**: 84-90.
- Gao Z, Mackenzie IC, Williams DM, Cruchley AT, Leigh I, Lane EB. (1988b). Patterns of keratin-expression in rests of Malassez and periapical lesions. *J Oral Pathol* **17**: 178-185.
- Gardner DG. (1997). Residual cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **84**: 114-115.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* **133**: 1710-1715.
- Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* **277**: 225-228.
- Gillery P, Fertin C, Nicolas JF, Chastang F, Kalis B, Banchereau J et al. (1992). Interleukin-4 stimulates collagen gene expression in human fibroblast monolayer cultures. Potential role in fibrosis. *FEBS Lett* **302**: 231-234.
- Gutmann JL. (1992). Clinical, radiographic, and histologic perspectives on success and failure in endodontics. *Dent Clin North Am* **36**: 379-392.
- Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA et al. (1990). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* **162**: 285-294.

- Hamachi T, Anan H, Akamine A, Fujise O, Maeda K. (1995). Detection of interleukin-1 beta mRNA in rat periapical lesions. *J Endod* **21**: 118-121.
- Hamamoto Y, Suzuki I, Nakajima T, Ozawa H. (1991). Immunocytochemical localization of laminin in the epithelial rests of Malassez of immature rat molars. *Arch Oral Biol* **36**: 623-626.
- Harper RA, Flaxman BA. (1975). Effect of pharmacologic agents on human keratinocyte mitosis in vitro. III. Inhibition by histamine and methylated analogs. *J Invest Dermatol* **65**: 400-403.
- Hatamochi A, Ueki H, Mauch C, Krieg T. (1991). Effect of histamine on collagen and collagen mRNA production in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* **2**: 407-412.
- High AS, Hirschmann PN. (1986). Age changes in residual radicular cysts. *J Oral Pathol* **15**: 524-528.
- High AS, Hirschmann PN. (1988). Symptomatic residual radicular cysts. *J Oral Pathol* **17**: 70-72.
- High AS, Robinson PA. (1994). Differences in adhesion and collagen gel contraction between fibroblasts from various types of odontogenic cyst. *Arch Oral Biol* **39**: 387-393.
- Johannessen AC, Nilsen R, Skaug N. (1983). Deposits of immunoglobulins and complement factor C3 in human dental periapical inflammatory lesions. *Scand J Dent Res* **91**: 191-199.
- Kaufmann SH. (1993). Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* **11**:129-63.: 129-163.
- Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. (1996). Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J Endod* **22**: 311-316.
- Killey HC. Benign cystic lesions of the jaws, their diagnosis and treatment. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1977.
- Kleinman HK, Cannon FB, Laurie GW, Hassell JR, Aumailley M, Terranova VP et al. (1985). Biological activities of laminin. *J Cell Biochem* **27**: 317-325.
- Konttinen S, Ranta H, Lautenschlager I. (1986). Cells infiltrating human periapical inflammatory lesions. *J Oral Pathol* **15**: 544-546.
- Kopp W, Schwarting R. (1989). Differentiation of T lymphocyte subpopulations, macrophages, and HLA-DR-restricted cells of apical granulation tissue. *J Endod* **15**: 72-75.
- Kubota Y, Ninomiya T, Oka S, Takenoshita Y, Shirasuna K. (2000). Interleukin-1alpha-dependent regulation of matrix metalloproteinase-9(MMP-9) secretion and activation in the epithelial cells of odontogenic jaw cysts. *J Dent Res* **79**: 1423-1430.
- Kuntz DD, Genco RJ, Guttuso J, Natiella JR. (1977). Localization of immunoglobulins and the third component of complement in dental periapical lesions. *J Endod* **3**: 68-73.
- Langeland K, Block RM, Grossman LI. (1977). A histopathologic and histobacteriologic study of 35 periapical endodontic surgical specimens. *J Endod* **3**: 8-23.
- Laurie GW, Leblond CP, Martin GR. (1982). Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes. *J Cell Biol* **95**: 340-344.
- Ledesma-Montes C, Hernandez-Guerrero JC, Garces-Ortiz M. (2000). Clinico-pathologic study of odontogenic cysts in a Mexican sample population. *Arch Med Res* **31**: 373-376.

- Li T, Browne RM, Matthews JB. (1997). Immunocytochemical expression of growth factors by odontogenic jaw cysts. *Mol Pathol* **50**: 21-27.
- Li TJ, Browne RM, Matthews JB. (1993). Expression of epidermal growth factor receptors by odontogenic jaw cysts. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **423**: 137-144.
- Li TJ, Browne RM, Matthews JB. (1994). Quantification of PCNA+ cells within odontogenic jaw cyst epithelium. *J Oral Pathol Med* **23**: 184-189.
- Li TJ, Browne RM, Matthews JB. (1995). Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts: a comparative immunocytochemical study of Ki67 in simple, recurrent and basal cell naevus syndrome (BCNS)-associated lesions. *J Oral Pathol Med* **24**: 221-226.
- Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. (2003). Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J* **36**: 464-471.
- Lin LM, Wang SL, Wu-Wang C, Chang KM, Leung C. (1996). Detection of epidermal growth factor receptor in inflammatory periapical lesions. *Int Endod J* **29**: 179-184.
- Lin SK, Chiang CP, Hong CY, Lin CP, Lan WH, Hsieh CC et al. (1997). Immunolocalization of interstitial collagenase (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in radicular cysts. *J Oral Pathol Med* **26**: 458-463.
- Lukic A, Arsenijevic N, Vujanic G, Ramic Z. (1990). Quantitative analysis of the immunocompetent cells in periapical granuloma: correlation with the histological characteristics of the lesions. *J Endod* **16**: 119-122.
- Marton I, Nemes Z, Harmati S. (1990). Quantitative significance of IgE-producing plasma cells and tissue distribution of mast cells in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **5**: 46-48.
- Marton IJ, Kiss C. (1993). Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. *Int Endod J* **26**: 131-136.
- Marton IJ, Kiss C. (2000). Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **15**: 139-150.
- Matejka M, Ulrich W, Porteder H, Sinzinger H, Peskar BA. (1986). Immunohistochemical detection of 6-oxo-PGF1 alpha and PGE2 in radicular cysts. *J Maxillofac Surg* **14**: 108-112.
- Matsumoto Y. (1985). Monoclonal and oligoclonal immunoglobulins localized in human dental periapical lesion. *Microbiol Immunol* **29**: 751-757.
- Matsuo T, Ebisu S, Shimabukuro Y, Ohtake T, Okada H. (1992). Quantitative analysis of immunocompetent cells in human periapical lesions: correlations with clinical findings of the involved teeth. *J Endod* **18**: 497-500.
- Matsuo T, Nakanishi T, Ebisu S. (1995). Immunoglobulins in periapical exudates of infected root canals: correlations with the clinical findings of the involved teeth. *Endod Dent Traumatol* **11**: 95-99.
- Matsushima K, Procopio A, Abe H, Scala G, Ortaldo JR, Oppenheim JJ. (1985). Production of interleukin 1 activity by normal human peripheral blood B lymphocytes. *J Immunol* **135**: 1132-1136.
- Matthes T, Werner-Favre C, Zubler RH. (1995). Cytokine expression and regulation of human plasma cells: disappearance of interleukin-10 and persistence of transforming growth factor-beta 1. *Eur J Immunol* **25**: 508-512.

- Meghji S, Qureshi W, Henderson B, Harris M. (1996). The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. *Arch Oral Biol* **41**: 523-531.
- Mercurio AM, Shaw LM. (1988). Macrophage interactions with laminin: PMA selectively induces the adherence and spreading of mouse macrophages on a laminin substratum. *J Cell Biol* **107**: 1873-1880.
- Mosqueda-Taylor A, Irigoyen-Camacho ME, Diaz-Franco MA, Torres-Tejero MA. (2002). Odontogenic cysts. Analysis of 856 cases. *Med Oral* **7**: 89-96.
- Mullen LM, Richards DW, Quaranta V. (1999). Evidence that laminin-5 is a component of the tooth surface internal basal lamina, supporting epithelial cell adhesion. *J Periodontol Res* **34**: 16-24.
- Nair PN, Sjogren U, Schumacher E, Sundqvist G. (1993). Radicular cyst affecting a root-filled human tooth: a long-term post-treatment follow-up. *Int Endod J* **26**: 225-233.
- Nathan CF. (1987). Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* **79**: 319-326.
- Oehlers FA. (1970). Periapical lesions and residual dental cysts. *Br J Oral Surg* **8**: 103-113.
- Oliveira MD, Souza LB, Pinto LP, Freitas Rd RA. (2002). Immunohistochemical study of components of the basement membrane in odontogenic cysts. *Pesqui Odontol Bras* **16**: 157-162.
- Oliveira RC, Lara VS. (2001). Study of the expression of CD68+ macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **92**: 221-227.
- Paula AM, Carvalhais JN, Domingues MG, Barreto DC, Mesquita RA. (2000). Cell proliferation markers in the odontogenic keratocyst: effect of inflammation. *J Oral Pathol Med* **29**: 477-482.
- Piattelli A, Artese L, Rosini S, Quaranta M, Musiani P. (1991). Immune cells in periapical granuloma: morphological and immunohistochemical characterization. *J Endod* **17**: 26-29.
- Piattelli A, Fioroni M, Santinelli A, Rubini C. (2001). P53 protein expression in odontogenic cysts. *J Endod* **27**: 459-461.
- Pillai S, Bikle DD, Eessalu TE, Aggarwal BB, Elias PM. (1989). Binding and biological effects of tumor necrosis factor alpha on cultured human neonatal foreskin keratinocytes. *J Clin Invest* **83**: 816-821.
- Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghov R. (1992). Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest* **90**: 1479-1485.
- Pulver WH, Taubman MA, Smith DJ. (1978). Immune components in human dental periapical lesions. *Arch Oral Biol* **23**: 435-443.
- Ramachandran Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE. (1996). Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **81**: 93-102.
- Rocklin RE. (1976). Mediators of cellular immunity, their nature and assay. *J Invest Dermatol* **67**: 372-380.

- Rodu B, Tate AL, Martinez MG, Jr. (1987). The implications of inflammation in odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol* **16**: 518-521.
- Ruoss SJ, Hartmann T, Caughey GH. (1991). Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J Clin Invest* **88**: 493-499.
- Sanchis JM, Penarrocha M, Bagan JV, Guarinos J, Vera F. (1998). Incidence of radicular cysts in a series of 125 chronic periapical lesions. Histopathologic study. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* **98**: 354-358.
- Satorres NM, Faura SM, Bresco SM, Berini AL, Gay EC. (2001). Prevalence of biopsied oral lesions in a service of oral surgery. *Med Oral* **6**: 296-305.
- Schaffer AB. (1997). Residual cyst? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **83**: 640-641.
- Sciubba JJ, Fantasia JE, Kahn LB. Tumors and Cysts of the Jaw. 3rd ed. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology - AFIP, 2001.
- Seltzer S, Soltanoff W, Sinai I, Smith J. (1969). Biologic aspects of endodontics. IV. Periapical tissue reactions to root-filled teeth whose canals had been instrumented short of their apices. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **28**: 724-738.
- Seymour GJ, Crouch MS, Powell RN, Brooks D, Beckman I, Zola H et al. (1982). The identification of lymphoid cell subpopulations in sections of human lymphoid tissue and gingivitis in children using monoclonal antibodies. *J Periodontal Res* **17**: 247-256.
- Seymour GJ, Greenspan JS. (1979). The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. *J Periodontal Res* **14**: 39-46.
- Shinoda S, Murayama Y, Okada H. (1986). Immunopathological role of pulpal tissue components in periapical pathosis. II. Specificities of antigenic determinants on modified serum albumins. *J Endod* **12**: 528-533.
- Slootweg PJ. (1995). p53 protein and Ki-67 reactivity in epithelial odontogenic lesions. An immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* **24**: 393-397.
- Sol MA, Tkaczuk J, Voigt JJ, Durand M, Sixou M, Maurette A et al. (1998). Characterization of lymphocyte subpopulations in periapical lesions by flow cytometry. *Oral Microbiol Immunol* **13**: 253-258.
- Spatafore CM, Griffin JA, Jr., Keyes GG, Wearden S, Skidmore AE. (1990). Periapical biopsy report: an analysis of over a 10-year period. *J Endod* **16**: 239-241.
- Stashenko P. (1990). Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* **6**: 89-96.
- Stashenko P, Yu SM. (1989). T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. *J Dent Res* **68**: 830-834.
- Stashenko P, Yu SM, Wang CY. (1992). Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod* **18**: 422-426.
- Stern MH, Dreizen S, Mackler BF, Selbst AG, Levy BM. (1981). Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granuloma. *J Endod* **7**: 117-122.
- Sun M, Liao X, Wang L. (2001). Cell proliferation in odontogenic jaw cyst epithelium. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **19**: 144-5, 157.

- Szekeres G. (1993). Detection of the Ki-67 antigen in fixed proliferating cells. *Anal Cell Pathol* **5**: 249-250.
- Takahashi K. (1998). Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J* **31**: 311-325.
- Takahashi K, Macdonald DG, Kinane DF. (1996). Analysis of immunoglobulin-synthesizing cells in human dental periapical lesions by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Oral Pathol Med* **25**: 331-335.
- Tani N, Osada T, Watanabe Y, Umemoto T. (1992). Comparative immunohistochemical identification and relative distribution of immunocompetent cells in sections of frozen or formalin-fixed tissue from human periapical inflammatory lesions. *Endod Dent Traumatol* **8**: 163-169.
- Tew J, Engel D, Mangan D. (1989). Polyclonal B-cell activation in periodontitis. *J Periodontal Res* **24**: 225-241.
- Timpl R. (1989). Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem* **180**: 487-502.
- Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. (1979). Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* **254**: 9933-9937.
- Torabinejad M, Kettering JD. (1985). Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endod* **11**: 122-125.
- Torres JO, Torabinejad M, Matiz RA, Mantilla EG. (1994). Presence of secretory IgA in human periapical lesions. *J Endod* **20**: 87-89.
- Tosios KI, Kakarantza-Angelopoulou E, Kapranos N. (2000). Immunohistochemical study of bcl-2 protein, Ki-67 antigen and p53 protein in epithelium of glandular odontogenic cysts and dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med* **29**: 139-144.
- Tough DF, Sun S, Sprent J. (1997). T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *J Exp Med* **185**: 2089-2094.
- Tripi TR, Bonaccorso A, Rapisarda E, Bartoloni G. (2003). Proliferative activity in periapical lesions. *Aust Endod J* **29**: 31-33.
- Tryggvason K. (1993). The laminin family. *Curr Opin Cell Biol* **5**: 877-882.
- Vaes G. (1988). Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. *Clin Orthop*: 239-271.
- Vracko R. (1974). Basal lamina scaffold-anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. *Am J Pathol* **77**: 314-346.
- Wahlgren J, Vaananen A, Teronen O, Sorsa T, Pirila E, Hietanen J et al. (2003). Laminin-5 gamma 2 chain is colocalized with gelatinase-A (MMP-2) and collagenase-3 (MMP-13) in odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* **32**: 100-107.
- Walker KF, Lappin DF, Takahashi K, Hope J, Macdonald DG, Kinane DF. (2000). Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci* **108**: 195-201.

- Walton RE. (1996). The residual radicular cyst: does it exist? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **82**: 471.
- Walton RE. (1997). In reply. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **83**: 640-641.
- Wang CY, Tani-Ishii N, Stashenko P. (1997). Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. *Oral Microbiol Immunol* **12**: 65-71.
- WHO. Application of the International Classification of Diseases to Dentistry and Stomatology. 3rd ed. Geneva: WHO, 1995.
- Yanagisawa S. (1980). Pathologic study of periapical lesions 1. Periapical granulomas: clinical, histopathologic and immunohistopathologic studies. *J Oral Pathol* **9**: 288-300.
- Yu SM, Stashenko P. (1987). Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. *J Endod* **13**: 535-540.