LUCIANA GONÇALVES VALENTE FERREIRA

Análise imuno-histoquímica e por imunofluorescência da expressão da interleucina 17 em abscessos e granulomas periapicais

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Corrêa

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Ferreira, Luciana Gonçalves Valente.
Análise imuno-histoquímica e por imunofluorescência da expressão da interleucina 17 em abscessos e granulomas periapicais / Luciana Gonçalves Valente Ferreira; orientadora Luciana Corrêa. -- São Paulo, 2013.
84 p.: il. : tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão corrigida.

1. Abscesso periapical. 2. Granuloma periapical. 3.Interleucinas. 4.Citocinas. 5. Imunohistoquímica - Técnicas. I. Gallottini, Marina Helena Cury. II. Título.

Ferreira LGV. Análise imuno-histoquímica e por imunofluorescência da expressão da interleucina 17 em abscessos e granulomas periapicais. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: / /2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

À Deus, meu eterno amigo, pai, companheiro, mestre, o autor da minha história, que nunca desistiu de mim, abrindo-me portas as quais nunca imaginei adentrar...

... ao meu pequeno príncipe Davi, meu bem mais precioso. Foi por ser o seu amor incondicional que eu cheguei até aqui...

... aos meus eternos super-heróis: meu pai Darwin e minha mãe Nicéia, sem o amor, a compreensão, o carinho, o incentivo, a força de vocês nada disso seria possível...

... aos meus amados irmãos Adriana, Darwin Rafael, Tatiana, ao meu querido cunhado Rodrigo e meu amado sobrinho Gabriel, que em todo tempo estavam a postos, com coração e tempo disponíveis para me ajudar, me apoiar...

...dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, cuja fidelidade é infinita. A Sua graça me alcançou e o Senhor me fez caminhar todo esse trajeto, ora me acompanhando, ora me apoiando, ora me carregando em Seus braços. Obrigada Pai por cada dia que eu achei que não conseguiria e o Senhor me levou para mais longe ainda. Tudo o que eu sou, tudo o que eu tenho é e sempre será Teu.

Ao meu pequeno príncipe Davi. Mesmo sendo tão pequeno você me ensina a viver todos os dias. Obrigada por fazer a minha vida tão completa meu amor! Quando a gente acha que já conquistou muitas coisas nessa vida Deus nos dá filhos para nos fazer mais completos e nos dar vontade de realizar ainda mais, agora por eles.

Aos meus pais, meus super-heróis: Darwin e Nicéia! Devo a vocês toda a minha vida e a minha eterna gratidão! Obrigada pelo apoio, pelo amor, carinho, dedicação, paciência... Pai sua humildade, seu amor, seu profissionalismo, seu caráter são dignos de serem copiados. Mãe sua história, sua coragem, determinação, sua garra, seu amor, sua dedicação são inigualáveis. Quando eu crescer quero ser igual a vocês! Esse título é mais de vocês do que meu! Amo muito vocês!

Aos meus irmãos: Adriana, obrigada por toda ajuda, pelo incentivo, pela sua doação em minha causa. Rafa, mesmo do seu jeito quieto, obrigada pelo ombro amigo! Tatiana e Rodrigo, meu cunhado, obrigada pela torcida de vocês, pelo incentivo. Thanks for all sister! Ao meu sobrinho Gabriel, a vida é tão mais simples quando olhamos para você e para o Davi que me faz querer ir sempre mais além, obrigada por melhorar a minha vida nesse tempo! Família é a base de tudo... e eu bem sei! Amo vocês!

A um amigo que me deixou no começo dessa minha caminhada: Roger, nunca me perdoaria se não te agradecesse pelos 11 anos de companheirismo, de alegria. Você pode não estar mais aqui comigo, mas com certeza fez parte de toda essa conquista. Obrigada amigo!

Ao Mario, por nunca duvidar da minha capacidade e sempre, de uma maneira ou outra, me incentivar a prosseguir.

Em especial, agradeço a minha orientadora Luciana Corrêa que desde o nosso primeiro encontro confiou, apostou no meu potencial e abriu seu coração e as portas do seu laboratório para que eu me alfabetizasse na linguagem da imunohistoquímica e da pesquisa. Obrigada por fazer um pequeno sonho se tornar realidade! Obrigada por me fazer ver que nem tudo que parece ser importante, realmente é, existem prioridades que são muito mais importantes e divertidas nessa vida!

Ao Profº Moacyr Novelli que mesmo com suas rápidas e bem humoradas visitas ao laboratório tinha sempre uma frase para animar o dia.

Aos professores do Programa de Estomatologia e Patologia Básica Aplicada: Prof.ª Andrea Mantesso, Prof. Décio, Prof. Fábio Daumas, Prof.ª Karen Ortega, Prof.ª Marília Martins, Prof.ª Marina Magalhães, Prof. Norberto e Prof.ª Suzana Orsini, que direta ou indiretamente, cada um a seu modo, muito me ensinaram sobre Patologia Bucal, contribuindo grandemente na minha formação a minha gratidão.

Aos técnicos do Laboratório Elisa Santos, Juvani Lago e Adriana Paris obrigada pela paciência em me ensinar cada passo dentro do laboratório, em responder cada pergunta, mesmo que fosse a mesma pela milésima vez!

Às queridas secretárias Zilda, Néia e Nair que desde o início sempre me ajudaram com tanto carinho.

À queridíssima Cida, secretária da Radiologia, que desde o meu primeiro dia na FOUSP sempre foi muito gentil e muito me ajudou.

À minha querida amiga Flávia Rosin. Flá, sem você tudo teria sido muito mais difícil. Obrigada pela mega ajuda que você sempre me deu, obrigada pelo carinho, pelas conversas, pelos almoços. Quando a gente encontra um amigo, muitas vezes nasce um irmão! E assim as dificuldades do dia-a-dia acabam ficando menos complicadas, os dias se tornam menos pesados e mais engraçados! Mesmo tendo que repetir uma leva de imunos...

A todos os colegas da Pós que sempre contribuíram para que os dias não fossem tão cansativos e muito mais proveitosos: Alessandra, Bianca, Cibele, Gabi, Karla, Lara, Lourdes, Marina, Rita...

Ao estimado Dr Miguel Nagib que com toda sua experiência na Odontologia, foi o primeiro a acreditar na inexperiência de uma recém-formada, abrindo as portas da sua clínica para que eu pudesse dar os meus primeiros passos. Dr Miguel, tenho muito a agradecer por todos esses anos de confiança e de aprendizado!

As minhas queridas amigas e colegas de profissão Fernanda Hyodo, Laise, Lygia, Renata e Salowa que nos bons e maus momentos estavam a postos para rirem comigo. Muito obrigada pelo apoio, pela amizade... Meninas há vida muito além que nossos olhos conseguem ver!

Aos meus tios, primos, amigos, colegas que sempre oraram, torceram por mim e de uma maneira ou de outra fizeram parte da minha história: o meu muito obrigada!.

À agencia CAPES, pelo apoio financeiro deste trabalho, através da bolsa a mim concedida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King

RESUMO

Ferreira LGV. Análise imuno-histoquímica e por imunofluorescência da expressão da interleucina 17 em abscessos e granulomas periapicais [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Original.

Abscessos e granulomas periapicais são considerados lesões inflamatórias relacionadas a elementos dentários, com origem em infecções do tecido pulpar e periapical. É pouco conhecido o papel da interleucina 17 (IL-17) nessas lesões, uma citocina que participa ativamente de uma classe de resposta imunológica recentemente descrita, denominada Th17. A resposta Th17 tem sido caracterizada pela produção de IL-17 por linfócitos CD4+ e tem sido associada à instalação e perpetuação do processo inflamatório, bem como a intenso recrutamento de neutrófilos. Este estudo tem como foco investigar a expressão dessa citocina em lesões de abscesso e granuloma periapicais, com a intenção de verificar se há diferenças de expressão entre essas duas lesões, já que a presença de infiltrado neutrofílico difere bastante entre elas. Testes imuno-histoquímicos para IL-17, CD4 (para identificação de linfócitos T CD4+), CD8 (para identificação de linfócitos T CD8+) e elastase (para identificação de células inflamatórias polimorfonucleadas) foram realizados em casos de abscesso (n=25) e granuloma (n=25) periapicais, selecionados do acervo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP. Foi obtida a porcentagem da área de células com expressão positiva para os marcadores citados. Também foi realizada a quantificação de células CD4+/IL-17+ e CD8+/IL-17+ detectadas por imunofluorescência nessas mesmas biópsias. Foram realizados testes estatísticos de Friedman e Mann-Whitney, para se verificarem as diferenças entre as porcentagens de marcação imuno-histoquímica obtidas para o abscesso e o granuloma, bem como teste de correlação de Spearman, para se verificar se havia correlação entre a expressão de IL-17 e os demais marcadores. Nos casos de abscesso periapical, houve expressão intensa de elastase, seguida de IL-17 e CD8, cujas respectivas porcentagens de expressão não diferiram estatisticamente entre si, mas foram significativamente maiores do que a da expressão do CD4 ($p<0,0001$). No teste de correlação de Spearman, houve correlação positiva significante entre IL-17 e CD8 ($rs = 0,5944$,

p=0,0415), mas não entre IL-17 e elastase e IL-17 e CD4. Na quantificação de células duplamente positivas pela técnica da imunofluorescência houve significantemente mais células CD4+/IL-17+ do que CD8+/IL-17+ (p=0,0250). Nos casos de granuloma periapical, observou-se que a porcentagem de área de marcação do CD4 foi significativamente maior em relação a da elastase (p=0,0055), do CD8 (p=0,0200) e da IL-17 (p=0,0210). Houve correlação positiva significativa entre IL-17 e elastase (rs = 0,5604, p=0,0463), mas não entre IL-17 e os demais marcadores. Na quantificação de células duplamente positivas pela técnica da imunofluorescência houve significância maior para células CD4+/IL-17 do que de células CD8+/IL-17+ (p=0,0470). Na comparação da porcentagem de área de marcação entre abscesso e granuloma, a porcentagem de IL-17 foi significativamente maior nos abscessos (p=0,0114). Concluiu-se que há maior expressão da IL-17 em abscessos do que em granulomas e que, nesses últimos, essa citocina é mais expressa quando há maior expressão de células polimorfonucleadas. Isso parece evidenciar a participação da resposta Th17 em fases agudas do processo inflamatório. Apesar de haver diferenças significativas entre as lesões quanto ao predomínio das subpopulações de linfócitos T, em ambas as lesões há maior co-expressão da IL-17 em linfócitos CD4+, indicando que provavelmente essa população linfocitária seja a principal responsável pela secreção dessa citocina nas lesões estudadas.

Palavras-chave: Abscesso periapical. Granuloma periapical. Interleucina 17. Resposta imunológica inata. Resposta imunológica adaptativa.

ABSTRACT

Ferreira LGV. Immunohistochemistry and immunofluorescence analysis of interleukin 17 in periapical abscess and granuloma [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Original.

Periapical abscess and periapical granulomas are considered inflammatory lesions related to dental infections originated from pulpal and periodontal tissues. There is little information about the role of interleukin 17 (IL-17) on these lesions. IL-17 is a cytokine pertaining to a new class of immunological response termed Th17. Th17 response has been characterized by the IL-17 release by CD4+ lymphocytes and has been associated to stabilization and perpetuation of the inflammatory process, as well as to neutrophil recruitment. The present study focused on the investigation of the IL-17 expression in periapical abscess and periapical granuloma, in order to verify if there are differences between the lesions that could be related to level of neutrophil infiltrate. Immunohistochemical tests to IL-17, CD4 and CD8 (to identify different lymphocyte population) and elastase (to detect neutrophils) were performed in the periapical abscess (n=25) and granuloma (n=25) biopsies, selected from the collection of Surgical Pathology Service of the Department of Oral Pathology FOUSP. Percentage of the labeling area showing positive expression was obtained for the all cited markers. Counting of CD4+/IL17+ and CD8+/IL7+ cells detected by immunofluorescence was also performed. Friedman´s and Mann-Whitney non-parametric statistical tests were applied for the labeling area percentages in order to detect the significant differences between abscess and granuloma. Spearman´s correlation test was adopted to verify whether there was a correlation between IL-17 and the other markers. In the periapical abscess biopsies, elastase, IL-17, and CD8 were intensively labeled, with area percentage significantly higher than that observed for CD4 ($p<0.0001$). By the Spearman correlation test, there was significant positive correlation between IL-17 and CD8 ($rs = 0.5944$, $p=0.0415$), but not between IL-17 and elastase, and IL-17 and CD4. In the double staining by immunofluorescence there was significantly more CD4+/IL17+ cells than CD8+/IL17+ cells ($p=0.0250$). In the periapical granulomas, CD4 labeling area percentage was significantly higher

than those for elastase (p=0.0055), CD8 (p=0.0200), and IL-17 (p=0.0210). There was significant positive correlation between IL-17 and elastase (rs = 0.5604, p=0.0463), but not between IL-17 and the other markers. The most frequent double staining cells were CD4+/IL17+ cells in the comparison with CD8+/IL17+ cells (p=0.0114). In conclusion, IL-17 labeling area percentage is higher in the abscess than in the granuloma; in the granulomatous lesions the IL-17 expression is directly proportional to the neutrophil infiltration. These results may indicate that the Th17 response participates to the acute phase of the apical inflammatory process. Although there were significant differences regarding the predominant T lymphocytes types, the co-expression of IL-17 and CD4 in the both inflammatory processes may suggest that this CD4+ lymphocytes are the main responsible for IL-17 release in the analyzed periapical lesions.

Keywords: Periapical abscess. Periapical granuloma. Interleukin 17. Innate immune response. Adaptative immune response.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Células apresentadoras de antígeno
COX2	Ciclo-oxigenase2
CXCL	Ligante de quimiocina CXC
FoxP3	Fator de transcrição *forkheadbox P3*
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
HE	Hematoxilina e Eosina
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
MCP	Proteína quimiotática de monócitos
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MIP	Proteína macrofágica inflamatória
mRNA	RNA mensageiro
NK	Célula *natural killer*
NO	Óxido nítrico
PGE2	Prostaglandina E2
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
ROR-γt	Receptor órfão relacionado à retinóide
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	Célula T-helper / Células T auxiliaries
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Célula T regulatória

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....16
2.1 Tipos de imunidade e classes de resposta imunológica.....16
2.2 Classe de resposta imunológica Th17.....19
2.3 Neutrófilos e elastase.....23
2.4 Abscessos periapicais.....25
2.4.1 Respostas imunológicas nos abscessos periapicais.....28
2.5 Granulomas periapicais.....29
2.5.1 Respostas imunológicas nos granulomas periapicais.....31
2.6 Modelos experimentais de lesões periapicais e respostas Imunológicas.....36
3 PROPOSIÇÃO.....41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....42
4.1 Seleção de casos.....42
4.2 Análise histopatológica.....42
4.3 Análise imuno-histoquímica.....43
4.4 Dupla marcação de proteínas utilizando imunofluorescência.....45
4.5 Quantificação da expressão imuno-histoquímica.....46
4.6 Quantificação de células na imunofluorescência.....48
4.7 Análise estatística.....48
5 RESULTADOS.....50
5.1 Dados clínicos.....50
5.2 Características histopatológicas.....52
5.3 Quantificação da expressão imuno-histoquímica e por imunofluorescência.....54
5.3.1 Abscesso periapical.....54
5.3.2 Granuloma periapical.....58
5.3.3 Abscesso periapical versus Granuloma periapical.....62
6 DISCUSSÃO.....64
7 CONCLUSÕES.....70
REFERÊNCIAS.....71
ANEXOS.....78

1 INTRODUÇÃO

Os abscessos e granulomas periapicais há muito têm sido descritos como lesões inflamatórias adjacentes a elementos dentários (periodontites apicais), originárias de infecções no tecido pulpar e periapical. Acredita-se que essas lesões acometam a dentição humana desde os tempos mais remotos, haja visto os frequentes relatos de sinais de reabsorção óssea alusivos da presença de abscessos e granulomas periapicais em ossos maxilares e mandibulares de crânios encontrados em sítios arqueológicos (Ring, 1998). Constituem assim lesões amplamente descritas em várias disciplinas científicas, com farta abordagem de sua etiologia, evolução clínica e tratamento.

Apesar dessa extensa história descritiva, os abscessos e granulomas periapicais ainda continuam sendo investigados principalmente com relação aos microorganismos envolvidos e a resposta do hospedeiro às suas toxinas. São bastante recentes as descobertas de novas bactérias e da participação de vírus e fungos nesses processos, bem como da expressão de genes ligados às respostas inflamatórias que deflagram a sintomatologia dessas lesões. Apesar de ser relatada a participação de fungos e vírus na patogenia das lesões periapicais, a infecção bacteriana no canal radicular e sua disseminação para o ápice ainda continua sendo o fator etiológico principal dessas lesões. Há evidências na literatura indicando que a microbiota segue um padrão distinto de acordo com a fase clínica da lesão e que as variações interindividuais são bem marcantes ao se analisar a microbiota de indivíduos localizados em regiões geográficas distintas (Siqueira Jr; Rôças, 2009). Em função dessa variabilidade, e considerando haver diferenças entre a microbiota nas diferentes lesões periapicais, as respostas imunológicas do hospedeiro às toxinas bacterianas também podem ser diversas.

Dentro desse contexto, o presente trabalho focaliza a expressão de uma citocina específica, a interleucina (IL) 17, em lesões humanas biopsiadas de abscesso e granuloma periapicais, com o intuito de investigar nessas lesões, ainda que preliminarmente, a participação de uma classe de respostas imunológicas descrita recentemente: a classe Th17.

A resposta imunológica de classe Th17 foi caracterizada em 2005 como um subgrupo de células T CD4+ (*T-helper*- Th ou células T auxiliares) que secretam proteínas sinalizadoras da família IL-17 (Weaver et al., 2007). Essa secreção difere das até então descritas para as respostas de classes Th1 e Th2, caracterizadas principalmente pela produção de interferon gama (IFN-γ) e IL-2 (resposta Th1) e IL-4 (resposta Th2).

As respostas imunológicas da classe Th1 são conhecidas por atuarem contra patógenos intracelulares, enquanto as células da classe Th2 atuam contra bactérias extracelulares e helmintos e são associadas a doenças alérgicas. A resposta Th17 atua contra patógenos extracelulares, tendo ação proinflamatória caracterizada principalmente pelo recrutamento de neutrófilos para o local agredido, bem como pela indução da secreção de ampla gama de citocinas (IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF), quimiocinas (Wang et al., 2013) e metaloproteinases (Korn et al., 2009). Também contribui para a secreção de elastase e mieloperoxidase pelos neutrófilos (Dubin, Kolls, 2008) e pode ainda desencadear respostas autoimunes.

A resposta Th17 em lesões da cavidade oral ainda é praticamente desconhecida. Poucos trabalhos abordam a presença da IL-17 na mucosa oral, os quais estão restritos a lesões autoimunes, principalmente síndrome de Sjögren (Voulgarelis; Tzioufas, 2010), e líquen plano (Wang et al., 2013). São ligeiramente mais frequentes descrições da expressão da IL-17 e da IL-22 nas periodontites (Wang et al., 2013; Behfarnia et al., 2013). Em especial nas periodontites periapicais, a expressão da IL-17 foi investigada em granulomas e cistos inflamatórios, havendo associação entre expressão dessa citocina, maior recrutamento neutrofílico e presença de sintomatologia clínica (Colic et al., 2007; 2009a). A despeito do escasso número de trabalhos, a resposta Th17 assim tem sido confirmada nessas lesões periapicais crônicas e tem sido interpretada como participante de fenômenos de agudização nesses processos.

Não encontramos estudos que verificassem a mesma participação da IL-17 em abscessos periapicais. Diante do fato de que os abscessos podem ter um curso clínico mais agudo e microscopicamente exibirem infiltrado inflamatório polimorfonuclear exuberante, e considerando a intensa atividade de recrutamento neutrofílico presente na classe Th17, elaboramos a hipótese de que os abscessos

periapicais teriam maior expressão de IL-17 em comparação aos granulomas. Essa análise poderia confirmar o caráter proinflamatório da IL-17 no periápice. Além disso, pelo contraste dos níveis de expressão de IL-17 entre abscesso e granuloma, poder-se-ia contribuir para o entendimento do papel da resposta Th17 na evolução das respostas inflamatórias agudas e crônicas do periápice, o que permitiria ampliar as possibilidades diagnósticas e terapêuticas dessas lesões.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura foi organizada em itens que visam inicialmente descrever as classes de respostas imunológicas e as particularidades da IL-17 na resposta Th17. Em seguida, são relatados os trabalhos que investigam a presença dessas respostas em abscessos e granulomas periapicais.

2.1 Tipos de imunidade e classes de resposta imunológica

A resposta imunológica é tradicionalmente dividida em imunidade inata e imunidade adquirida ou adaptativa. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo, sendo realizada principalmente por neutrófilos, macrófagos e o sistema complemento. Os macrófagos residentes no tecido, acionados pelos agentes agressores, iniciam uma resposta de fagocitose que desencadeia a secreção de citocinas e quimiocinas, capazes de recrutar neutrófilos para o local. A barreira epitelial tem papel crucial nesse processo, já que também pode secretar quimiocinas, fatores de crescimento e citocinas, provocando a atração de fagócitos. O sistema complemento é acionado pelo agente agressor e facilita o reconhecimento dos antígenos pelos macrófagos. Nessa fase, não ocorre seleção clonal específica de linfócitos e o processo todo, em que predominam alterações vasculares e celulares, é denominado de inflamação. A imunidade inata consegue controlar as infecções comuns e corriqueiras. Contudo, em situações de permanência do agente agressor, ocorre ativação da imunidade adaptativa, em que há seleção clonal específica de linfócitos. Nesse processo, o reconhecimento específico de antígenos por células dendríticas imaturas e a apresentação destes aos linfócitos T em órgãos linfoides adjacentes ao tecido agredido são eventos-chaves (Moser; Leo, 2010).

A população linfocitária é basicamente formada por linfócitos com origem no timo (linfócitos T), linfócitos com origem na medula óssea (linfócitos B) e células *natural killer* (células NK). Os linfócitos T participam da imunidade adaptativa e sua maturação ocorre no timo antes de se implantarem nos órgãos linfoides periféricos

(linfonodos e baço), para uma posterior diferenciação mediada por antígenos (Luckheeram et al., 2012). Essa maturação envolve a expressão de receptores de membrana para esses antígenos, sendo capazes de reconhecer as moléculas de histocompatibilidade (MHC) de células infectadas, ou seja, contendo peptídeos intracelulares pertencentes ao agente agressor. Assim uma célula T madura é capaz de reconhecer seletivamente os peptídeos que funcionam como antígenos no interior de células, preservando a integridade celular (Moser; Leo, 2010). As células T que fazem o reconhecimento de antígenos apresentados por moléculas MHC classe I (em geral presentes em todas as células nucleadas do organismo) expressam uma molécula de superfície denominada CD8.

Quando os antígenos são endossomais, ou seja, de origem extracelular e internalizados em geral por meio de fagocitose por células ditas "apresentadoras de antígenos" (APC), o seu reconhecimento é feito por células T que expressam uma outra molécula de superfície, denominado CD4. As células apresentadoras de antígenos expressam outra gama de moléculas de histocompatibilidade (MHC classe II) que se conectam a esses peptídeos endossomais. Os linfócitos T CD4+ reconhecem, então as moléculas MHC classe II, presente somente nas células imunes (Moser; Leo, 2010).

Assim, em geral, os antígenos intracelulares conectados a moléculas MHC classe I são reconhecidos por linfócitos T CD8+, enquanto os antígenos extracelulares fagocitados por células apresentadoras de antígenos e conectados a moléculas MHC classe II são reconhecidos por linfócitos T CD4+. Contudo, essa especificidade de reconhecimento parece não ser tão rígida, já que tem-se observado, por exemplo, a ativação de linfócitos T CD8+ em situações nas quais antígenos de origem extracelular fagocitados conseguem sair dos fagossomos e ficar livres no citoplasma das células fagocíticas (Moser; Leo, 2010). Células T CD4+ juntamente com as células T CD8+ constituem a maioria dos linfócitos T efetores (Luckheeram et al., 2012).

As células T efetoras CD8+ possuem ação citotóxica, ou seja, após reconhecerem o complexo MHC classe I ligado a antígenos intracelulares em células com alterações funcionais (ex. células tumorais) ou células infectadas, secretam proteínas que originam poros (perforinas) nas membranas da célula-alvo. Isso

permite a passagem de granzimas, também secretadas pelas células T CD8+, que induzem a apoptose das células-alvo. Por esse mecanismo, ocorre inibição da replicação de microrganismos, principalmente de vírus, bem como a inibição do crescimento tumoral. As células T CD8+ também secretam fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interferons (IFN) (Moser; Leo, 2010).

As células T CD4+, residentes nos linfonodos periféricos, passam de um estado não-ativo (*naïve*) para um estado efetor (*helper*) quando entram em contato com citocinas e moléculas co-estimulatórias secretadas pelas APCs, estímulos oriundos principalmente de células dendríticas em processo de maturação, que migram do tecido periférico para os linfonodos após interiorizarem os antígenos (Moser; Leo, 2010). As células T *helper* (Th) passam, então, a secretar ampla gama de citocinas, cuja predominância permite a distinção de classes de resposta imune distintas, quais sejam:

a) classe Th1 - secreção principalmente de interferon-gama (IFN-γ), que intensifica a expressão de moléculas MHC e estimula a diferenciação de linfócitos CD8+, agindo principalmente contra antígenos intracelulares; está relacionada a processos de hipersensibilidade tardia na pele e mucosas (Kidd, 2003; Awasthi et al., 2008) e a formação de granulomas, como os que podem ser observados nos casos de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Kurebayashi et al., 2013);

b) classe Th2 - secreção de interleucina-4 (IL-4) e, por vezes, interleucina-5 (IL-5), além da interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13), agindo contra patógenos extracelulares, incluindo parasitas (helmintos); é importante também na produção de imunoglobulina E, sendo responsável por processos alergênicos e por doenças autoimunes sistêmicas. As células de fenótipo Th2 ainda podem inibir a resposta Th1, já que esta é considerada mais agressiva que a primeira, funcionando como uma resposta regulatória (Kidd, 2003; Awasthi et al., 2008; Fukada et al, 2009; Kimura; Kishimoto, 2010);

c) classe fTh (classe de células T foliculares) - formada por linfócitos T CD4+ localizados em folículos linfóides que estimulam, de forma intensa, a secreção de anticorpos por linfócitos B; produzem principalmente interleucina-21 (IL-21), e parecem regular a resposta humoral após a vacinação in vivo (Breitfeld et al., 2000).

d) classe Th17 - secreção de IL-17 e IL-22 e relacionada a defesa contra ampla gama de bactérias e fungos, bem como a processos de doenças autoimunes (Kurebayashi et al., 2013).

Essa última classe de resposta será descrita em detalhes a seguir.

2.2 Classe de resposta imunológica Th17

A classe de resposta imunológica Th17 parece explicar alguns mecanismos de suscetibilidade a determinados microrganismos extracelulares. Células Th17 secretam um grupo distinto de citocinas imunorregulatórias agrupadas na família IL-17 (vide adiante cada uma delas), bem como IL-22. Essas citocinas, coletivamente, têm papel na inflamação e autoimunidade e na eliminação de patógenos fúngicos e bacterianos extracelulares (Awashi et al., 2008; Kimura; Kishimoto, 2010).

Acredita-se que os fenótipos Th1 e Th17 são derivados da diferenciação das células T CD4+ a partir da oferta de IL-12 e IL-23, respectivamente. Dois modelos são descritos para essa diferenciação: um em que co-existem os dois fenótipos nas células T CD4+, as quais exibiriam receptores para ambas as citocinas, e outro em que os dois tipos de resposta representam subpopulações distintas de linfócitos T CD4+ (Weaver et al., 2007). Não é ainda consenso qual modelo se encaixa para a maioria das doenças humanas.

Admite-se também que a diferenciação de células T CD4+ em células Th17 ocorra a partir da combinação da IL-6 com TGF-β, consideradas citocinas-chaves para essa diferenciação. A IL-6 é considerada um forte indutor da resposta Th17; sua sinalização inicia o processo de diferenciação, pois induz a fosforilação da STAT3, que é essencial para uma adequada diferenciação de células T naïves em células Th17 (Zúñiga et al., 2013). Na ausência da IL-6, outra citocina, a IL-21, juntamente com o TGF-β, pode induzir a diferenciação dessas células. A citocina IL-21 também é produzida pelas células Th17 e, nesse caso, age de maneira autócrina na amplificação da diferenciação do fenótipo Th17 (Jäger; Kuchroo, 2010; Duan et al., 2012). É importante também para a diferenciação das células Th17 a presença

de fatores de transcrição, principalmente ROR-γt e a já citada STAT-3, bem como a IL-23 (Awashi et al., 2008; Conti et al., 2009; Kimura; Kishimoto, 2010). Essa última citocina é necessária para a maturação funcional das células de fenótipo Th17, sendo secretada por células dendríticas e macrófagos residentes teciduais em resposta a sinais de estresse exógeno ou endógeno (Zúñiga et al., 2013). É responsável também por manter o fenótipo Th17 nas células T de memória (Korn et al. 2009). Já a IL-2, responsável pela diferenciação de células T nos fenótipos Th1 e Th2, pode inibir a formação de células Th17, assim como IL-4, IFN-γ e IL-27, citocinas que atuam negativamente sobre a IL-23 (Korn et al., 2009; Jäger; Kuchroo, 2010).

Vale dizer que a diferenciação das células Th17 em humanos e camundongos difere em alguns pontos. Em camundongos, a diferenciação das células Th17 requer uma interação entre IL-6, IL-21 e o TGF-β; interações com a IL-23 estabilizam o fenótipo Th17 e promovem a sua expansão, conforme descrito anteriormente. Em humanos, a diferenciação requer a participação, além da IL-23, também da IL-1β. Nesse caso, a IL-1β e a IL-6 fazem a mediação do desenvolvimento e da estabilização do fenótipo das células Th17. Para ambas as células Th17, tanto as de camundongo como as de humano, a exposição ao TNF-α e a IL-4 leva a supressão da sua diferenciação (Wang et al., 2013).

Em conjunto, as células Th17 constituem importantes células inflamatórias: deflagram o processo inflamatório tecidual e são responsáveis pela infiltração de outras células inflamatórias, tais como neutrófilos (Korn et al., 2009, Dubin; Kolls, 2008). Particularmente esse efeito sobre os neutrófilos é fundamental para controlar a eficiência da defesa imunológica contra patógenos extracelulares nas mucosas. Experimentos *in vivo* demonstraram que a IL-17 pode expandir a diferenciação de granulócitos progenitores de neutrófilos na medula hematopoiética e no baço, bem como contribuir para a maturação de neutrófilos no sangue periférico. Esse efeito parece ser derivado de mediadores secundários induzidos pela IL-17, tais como IL-6 e fator estimulador de colônias – granulócitos (G-CSF) (Aujla et al., 2007).

A IL-17 é o membro que representa uma família de citocinas composta por IL-17A (também conhecida como simplesmente IL-17) e seus homólogos IL-17B, IL-17C, IL-17D e IL-17F, bem como pela IL-17E (também chamada de IL-25), a qual

parece não ter tanta homologia em relação a IL-17A. A IL-17A e a IL-17F são produzidas por uma variedade de células de defesa, tais como linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos gama-delta, células NK, macrófagos e neutrófilos, e são as citocinas que mais identificam a resposta Th17 (Korn et al., 2009). Podem ser encontradas em fluido crevicular gengival e em sobrenadantes de células inflamatórias isoladas de lesões periapicais (Fukada al., 2009; Colic et al., 2007). Possuem atividades pró-inflamatórias, induzindo a secreção de ampla gama de citocinas (IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF), bem como de quimiocinas (CXCL1, CXCL10, CXCL2, CXCL8) (Wang et al., 2013) e metaloproteinases (Korn et al., 2009).

As células ditas Th17 ainda podem secretar IL-22, citocina pertencente a família da IL-10. A IL-22 parece amplificar os efeitos da IL-17A e IL17F, promovendo a estimulação de secreção de peptídeos antimicrobianos nas mucosas, tais como β-defensina 2 (Dubin; Kolls, 2008). Pode-se dizer, assim, que a resposta Th17 é caracterizada prioritariamente pela secreção da IL-17A, IL-17F e IL-22.

Devido ao importante papel desenvolvido pela IL-17 na indução da inflamação tecidual, a resposta Th17 é associada à promoção da autoimunidade. Níveis elevados de IL-17 foram encontrados em algumas doenças autoimunes, como por exemplo, artrite reumatóide, psoríase e esclerose múltipla (Jäger; Kuchroo, 2010). Também há relatos de altos níveis de IL-17 na rejeição de transplantes, principalmente renais (Wang et al., 2013).

Acredita-se que a IL-17 também participa da regulação da osteoclastogênese, possivelmente através de indução de reguladores de atividade osteoclástica (RANKL) (Fukada et al., 2009). Segundo Kotake et al. (1999) e Sato et al. (2006), a IL-17 ativa osteoblastos e fibroblastos sinoviais para expressar a RANKL, necessária para a diferenciação osteoclástica. Kotake et al. (1999) fizeram uma co-cultura de células hematopoiéticas de ratos e osteoblastos primários tratados com IL-17 recombinante humana. Para haver a osteoclastogênese induzida pela IL-17, foi necessária interação entre osteoblastos e osteoclastos progenitores. Além disso, a IL-17 induziu a expressão de mRNA do fator da diferenciação osteoclástica em osteoblastos, sugerindo grande influência dessa citocina sobre as células do tecido ósseo. Em função disso, a IL-17 provavelmente participa diretamente da reabsorção óssea nas lesões periapicais.

Por fim, há relatos de que as células Th17 exercem papel protetor contra o câncer (Anunzziato et al., 2013). Em casos de melanoma, câncer de próstata e de ovário, prognóstico ruim parece estar associado a um desequilíbrio entre células Th17 e células T reguladoras, assim como um pior prognóstico de adenocarcinoma gástrico pode ter relação com baixos níveis de IL-17 (Chen et al., 2011).

Células Th17 têm um importante papel na defesa do hospedeiro contra patógenos que não foram adequadamente sinalizados pelas células Th1 e Th2, incluindo bactérias e fungos (Jäger; Kuchroo, 2010). Em infecções causadas pela bactéria *Klebsiella pneumoniae*, por exemplo, ela é um importante regulador da defesa contra essa bactéria, estimulando as células epiteliais e os fibroblastos a produzirem mediadores, como a IL-6, proteína macrofágica inflamatória 2 (MIP-2), G-CSF, prostaglandina E2 (PGE2) e várias quimiocinas CXC; promove também granulopoiese e recrutamento neutrofílico. A defesa do hospedeiro contra *Citrobacterrodentium* e *Staphylococcus aureus* também depende da resposta Th17 (Ishigame et al., 2009; Khader et al., 2009).

Em infecções fúngicas, dependendo da espécie e do sítio da infecção, as células Th17 são necessárias. Conti et al. (2009) compararam a função das respostas Th1 e a Th17 em modelos de candidíase orofaríngea. A candidíase foi induzida em grupos de camundongos Th17-deficientes, IL-17R-deficientes e Th1-deficientes. Nos grupos Th17 e IL-17R-deficientes, houve manifestação severa da candidíase e discreto recrutamento neutrofílico; já o grupo Th1-deficiente mostrou carga fúngica baixa, ausência de sinais clínicos e nenhuma alteração no recrutamento neutrofílico. Camundongos deficientes em IL-22 apresentaram susceptibilidade parcial para desenvolver a candidíase orofaríngea, o que indica o importante papel da IL-17, maior até que o papel da IL-22, na defesa contra candidíase bucal. Dessa forma, a linhagem Th17, atuando principalmente através da IL-17, confere uma resposta essencial contra a candidíase por intermédio dos neutrófilos e de fatores antimicrobianos.

2.3 Neutrófilos e elastase

Os neutrófilos são uma das células inflamatórias que participam da imunidade inata, sendo a primeira linha de defesa contra patógenos. São encontrados em grande quantidade nas lesões periapicais clinicamente sintomáticas e ou exibindo supuração, as quais são, em sua maioria, histologicamente classificadas como abscessos. Nos granulomas periapicais também estão presentes, porém em menor quantidade do que nos abscessos (Colic et al., 2009a).

São as células imunes mais numerosas, estando em constante proliferação e diferenciação na medula óssea hematopoiética. O egresso dos neutrófilos da medula hematopoiética para o sangue periférico é estimulado pela ligação da quimiocina CXCL2 ao receptor CXCR2 existente no neutrófilo, bem como pelo fator estimulador de colônia-granulócito (G-CSF). A CXCL2 é produzida principalmente pelas células endoteliais da medula hematopoiética, mas a secreção dessas quimiocinas no sítio inflamado também contribuem para a migração neutrofílica. Uma vez no sangue periférico, os neutrófilos são estimulados a transmigrar para o interstício a partir da presença de citocinas (IL-1β e TNF) liberados pelas células residentes no tecido. Estas secretam essas citocinas quando receptores de membrana específicos para antígenos bacterianos (padrão molecular associado a patógenos - PAMPs) e receptores especializados no acionamento da morte celular (padrão molecular associado a dano - DAMPs) são acionados pelos microrganismos (Sadik et al., 2011). Dentre as citocinas destaca-se também a IL-23, que provoca a estabilização da liberação da IL-17A, conforme comentado anteriormente, bem como estimula a proliferação e diferenciação de neutrófilos na medula hematopoiética (Aujla et al., 2007); ao mesmo tempo, a IL-23 estimula a secreção de TNF, completando o recrutamento neutrofílico. Quimioatratores para neutrófilos também são essenciais para a transmigração e migração para o local agredido, dentre eles proteínas do sistema complemento (C5a) e lípideos (LTB_4), os quais são mais rapidamente produzidos no local, mas são possuem meia-vida menor que as citocinas (Sadik et al., 2011).

Especialmente para os abscessos pulpares e periapicais, o recrutamento neutrofílico tem sido associado à ação quimiotática das toxinas bacterianas (Hahn;

Liewehr, 2007b), bem como a uma espécie de reação de hipersensibilidade do tipo III (reação de Arthus), em que antígenos solúveis provocam a formação de complexos imunes compostos principalmente por IgG e complemento, atraindo neutrófilos para o local infectado (Adamkiewicz; Pekovic, 1980).

Uma vez nos tecidos, os neutrófilos secretam citocinas e quimiocinas que promovem também sua auto-quimioatração. Em modelos de artrite reumatóide, por exemplo, os neutrófilos secretam LTB_4, quimiocinas (CCL3, MIP-2) e IL-1β, proteínas que conferem quimiotaxia neutrofílica (Sadik et al., 2011).

Os neutrófilos possuem alta eficiência em fagocitose, eliminando grande parte dos microrganismos e prevenindo a sua disseminação aos tecidos vizinhos. Apesar dessa proteção, provocam também grande destruição tecidual devido à secreção de várias enzimas proteolíticas localizadas em seus inúmeros grânulos intracitoplasmáticos.

Em revisão recente sobre as proteases neutrofílicas, Korkmaz et al. (2010) descrevem que os grânulos azurofílicos dos neutrófilos são compostos principalmente por três proteases de serina, denominadas elastase, catepsina G e proteinase 3, que agem na destruição de patógenos por vias não-oxidativas. Os microrganismos e seus peptídeos, ao serem ingeridos e localizados nos fagolisossomos, sofrem ação dessas enzimas e são destruídos. Extracelularmente, essas proteases participam das chamadas "armadilhas extracelulares de neutrófilos" ("neutrophil extracelular traps" - NET), nas quais compõem ligação estável com histonas e cromatina, originando uma barreira física que provoca a morte de patógenos extracelulares, bem como degrada as substâncias responsáveis por sua virulência.

Nessa revisão ainda os autores relatam que a elastase é uma protease produzida pelo gene ELANE, localizado na porção terminal do braço curto do cromossomo 19p13.3. É sintetizada durante a diferenciação e maturação dos neutrófilos, durante a qual são estocadas em sua forma inativa no complexo de Golgi. São ativadas por peptidases e pela catepsina C e são transportadas do complexo de Golgi para vesículas azurofílicas e para o envelope nuclear por mecanismo ainda não bem elucidado. A estimulação de neutrófilos no local agredido pela presença de TNF-α, substâncias quimiotáticas (fator ativador de plaquetas, IL-

8) e lipopolissacarídeos bacterianos promove a transferência da elastase para o fagolisossomo e deste para a membrana plasmática, sendo liberada para o meio extracelular. No meio intracelular, a elastase digere os peptídeos bacterianos fagocitados e, no interstício, promove a degradação da matriz extracelular e de patógenos por meio das NETs. Promove a clivagem da membrana externa de bactérias Gram negativas, bem como da flagelina, um fator de virulência bacteriano proinflamatório, e da leucotoxina, outro fator de virulência que acarreta a formação de poros nas membranas dos leucócitos (Korkmaz et al., 2010).

Parte da elastase secretada para o meio extracelular se fixa na parte externa das membranas dos neutrófilos, fato que promove regulação proteolítica de atividades de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento. Há indícios de que a elastase participa da clivagem de TNF-α e de progranulina (ou proepitelina), um fator de crescimento que impede a ativação neutrofílica. A elastase também promove a superativação do receptor Toll-like 4 (TLR4) em células epiteliais, o que acarreta na intensa secreção de IL-8 (Korkmaz et al., 2010).

2.4 Abscessos periapicais

Os abscessos periapicais constituem uma evolução da necrose pulpar derivada da contaminação microbiana no canal radicular, em que predominam respostas imunológicas inatas e adaptativas agudas (Hahn; Liewehr, 2007b). É caracterizado histologicamente como uma coleção neutrofílica localizada, com grande quantidade de edema intersticial e tecido conjuntivo denso ao redor do aglomerado celular. São frequentemente detectados macrófagos com citoplasma amplo e claro, bem como alguns linfócitos, plasmócitos e mastócitos (Colic et al., 2009a). Esse arranjo celular sugere um estado agudo das periodontites apicais, em que predomina exsudação purulenta e, por vezes, intensa sintomatologia dolorosa. Os granulócitos, em sua maioria neutrófilos, são predominantes nessa fase em detrimento das células mononucleares linfocíticas e constituem a primeira linha de defesa contra os microrganismos oriundos do tecido pulpar (Colic et al., 2009a).

Essas lesões em geral são tratadas de forma eficiente no consultório, porém podem suscitar complicações que culminam em hospitalização. Em um levantamento feito nos sistemas de urgência e emergência hospitalares dos Estados Unidos entre 2000 e 2008, foram contabilizadas 61.439 hospitalizações cujo motivo primário foi a presença de abscesso periapical, com ou sem envolvimento do seio maxilar. A média de dias de internação foi de 2,96 dias, gerando altos custos hospitalares (Shah et al., 2013).

A frequência de abscessos periapicais, quando examinados histologicamente, é diferente considerando-se lesões retiradas durante apicectomias e lesões analisadas após exodontias. Um trabalho demonstrou que, nas apicectomias, foram detectados somente 5% de abscessos, contra 23% de cistos e 70% de granulomas (Schulz et al., 2009). Já nas lesões associadas à exodontias, foi detectada frequência de 35% de abscessos, 50% de granulomas e 15% de cistos (Ramachandran et al., 1996).

Nos últimos anos, a microbiota dos abscessos periapicais tem sido extensivamente investigada. Há predomínio de bactérias anaeróbicas, em número que varia de 10^4 a 10^9 unidades formadoras de colônias (Lewis et al., 1986). Parece não haver diferenças entre os diferentes tipos de bactérias comparando-se lesões sintomáticas com assintomáticas, o que indica ser a virulência determinada por ampla gama de fatores que incluem sinergismo entre as bactérias, densidade da população bacteriana e resistência do hospedeiro (Siqueira Jr; Rôças, 2009).

Em um estudo envolvendo a coleta de exsudatos de necrose pulpar e de abscesso periapical, foram analisados os agrupamentos de bactérias presentes nessas lesões utilizando PCR em tempo real. As bactérias mais frequentemente detectadas foram *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella nigrescens*, *Filifactor alocis* e *Tannerela forsythia,* as quais originaram um padrão de colônia composto por pequenos agrupamentos nas duas lesões (Montagner et al., 2012).

Em outro trabalho foi isolado o DNA bacteriano a partir de 43 amostras de abscesso periapical agudo e crônico, tanto sintomática quanto assintomática. Nas lesões assintomáticas, foram mais prevalentes *Dialister invisus* (71%), *Fusobacterium nucleatum* (62%) e *Porphyromonas endodontalis* (62%). No abscesso crônico, destacaram-se *P. endodontalis* (100%), *D. invisus* (89%),

Parvimonas micra (78%) e *Solobacterium moorei* (78%). Por fim, nas lesões sintomáticas foram mais frequentes *D. invisus*, *P. endodontalis*, *S. moorei*, *Propionibacterium acnes* e espécies de *Streptococcus* (todas com 69%). Os autores concluíram que, indepentemente da presença de dor ou não, os grupos bacterianos foram bem semelhantes e que a associação entre eles é que possivelmente origina padrões mais virulentos, responsáveis pela sintomatologia clínica (Rôças et al., 2011).

A presença de biofilme no periápice de dentes exibindo periodontite apical foi investigada em 106 canais cujo ápice foi cirurgicamente removido. Biofilme foi detectado em todos os ápices, porém em maior quantidade em lesões cujo tamanho foi maior ao exame radiográfico. A presença de biofilme foi maior em cistos (95%), seguidos dos abscessos (83%) e dos granulomas (69,5%). Houve correlação positiva entre a presença de biofilme e a presença de epitelização nas lesões quando examinadas histologicamente. Os autores concluíram que as lesões periapicais devem ser também consideradas nos grupos das lesões que originam biofilme, e que a presença deste é mais evidente em lesões maiores e de longa duração (Ricucci; Siqueira, 2010).

A presença de vírus em lesões periapicais tem sido associada ao aumento da virulência das bactérias. Em um estudo com 31 amostras de exsudato de abscesso periapical e celulite, 29% exibiram presença DNA de citomegalovírus humano, frequência normalmente encontrada em polpas dentárias de indivíduos sem lesão. Outros vírus detectados foram Epstein-Barr vírus (6,5%) e Herpes simples vírus tipo I (3,22%). Em função da baixa frequencia desses vírus, aliada à ausência de associação com dados clínicos como sintomatologia e tamanho da lesão, os autores concluíram que os vírus detectados não participam da patogenia dos abscessos periapicais e celulites (Chen et al., 2009).

Associação entre vírus e bactérias foi detectada em amostras de exsudato de 33 pacientes com abscesso periapical. Os autores verificaram que um terço das lesões exibia DNA da família dos herpesvírus tipos 6 e 8, papilomavírus humano, varicela zoster humano, Epstein-barr vírus. As bactérias mais frequentes foram *Treponema denticola* (70%), *Tannerella forsythia* (67%), *Porphyromonas endodontalis* (67%), *Dialister invisus* (61%) e *Dialister pneumosintes* (57.5%). Houve

associação fraca entre 7 tipos bacterianos com o herpesvírus tipo 8 e 4 tipos bacterianos com o papilomavírus humano, mas as associações foram fracas. Os autores também concluíram que não necessariamente os vírus participam da patogenia do abscesso periapical, podendo estar presentes secundariamente à infecção bacteriana (Ferreira et al., 2011).

2.4.1 Respostas imunológicas nos abscessos periapicais

Informações sobre as reações imunológicas nos abscessos periapicais são escassas na literatura. Os relatos envolvem a análise de citocinas e proteases presentes no exsudato das lesões, bem como a relação desses níveis com a sintomatologia e a presença de supuração.

Um estudo analisou os níveis de elastase no exsudato de 42 dentes com periodontite apical e os relacionou com a sintomatologia clínica. As lesões sintomáticas exibiram níveis de elastase significativamente maiores do que as lesões assintomáticas, indicando que essa protease deve participar do quadro clínico agudo das periodontites apicais (Alptekin et al., 2005). Em outro estudo, o mesmo grupo de autores investigou os níveis de elastase e PGE2 nos exsudatos de lesões periapicais supurativas após uma sessão de terapia endodôntica. As lesões maiores e com maior sintomatologia (inchaço e supuração) exibiram maiores níveis das proteínas, bem como houve associação positiva entre elastase e PGE2 (Alptekin et al., 2005).

Os níveis das citocinas TNF-α e IL-1β foram investigados em exsudatos de 35 canais exibindo periodontite apical, os quais foram relacionados a presença de sintomatologia (inchaço, dor e presença de supuração) e ao tamanho da lesão detectado radiograficamente. Os níveis de IL-1 β foram significativamente maiores do que os de TNF- α, mas não houve relação entre a presença dessas citocinas e a sintomatologia. Os autores concluíram que a expressão das citocinas analisadas não reflete o estado clínico das lesões periapicais (Ataouglu et al., 2002).

Em outro estudo os níveis de IL-6 e GM-CSF foram quantificados nos lisados teciduais de lesões periradiculares, os quais foram relacionados com sintomatologia, presença de polimorfonucleares e células epiteliais, e tamanho da lesão. Os níveis mais elevados de IL-6 e GM-CSF foram encontrados nas lesões sintomáticas ricas em polimorfonucleares e células epiteliais. Os autores concluíram que as lesões assintomáticas menores e pobres em polimorfonucleares possuem menores níveis das citocinas analisadas e podem representar estágios de remissão levando ao reparo tecidual (Radics et al., 2003).

O trabalho de De Sá et al. (2007) evidenciou as variações individuais na expressão de citocinas pró e antiinflamatórias por meio da análise do polimorfismo genético presente em abscessos periapicais sintomáticos (grupo teste) e em lesões periapicais crônicas assintomáticas (grupo controle), sem manifestação de dor, supuração ou inchaço. Os genes funcionais analisados foram CD14, IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α. Um genótipo que indica alta produção de IL-6, intermediária a baixa produção de IL-1β e baixa produção de TNF-α foi observado para os pacientes com abscessos sintomáticos. Esses achados vão contra a hipótese de que abscessos sintomáticos suscitariam alta produçao de CD14, e de IL-1β e TNF-α que são citocinas proinflamatórias típicas. Os autores concluíram que o desenvolvimento de abscessos periapicais sintomáticos pode estar condicionado a variações genéticas individuais.

Não encontramos trabalhos que avaliassem a expressão de citocinas relacionadas à resposta Th17 em periodontites apicais agudas em humanos ou em lesões histologicamente classificadas como abscessos periapicais. Porém em modelos animais, descritos adiante, essa resposta foi avaliada em alguns trabalhos, cuja descrição histopatológica é sugestiva da formação de abscessos.

2.5 Granulomas periapicais

Os granulomas periapicais constituem uma resposta inflamatória crônica a microrganismos que invadem e destroem a polpa dentária, sendo caracterizados

histologicamente pela presença de tecido conjuntivo denso e tecido de granulação, bem como por infiltrado inflamatório misto, composto por células mono e polimorfonucleares, principalmente neutrófilos; podem também exibir infiltrado inflamatório com predomínio somente de células mononucleares e fibroblastos (Piattelli et al., 1991; Colic et al., 2006, 2009a).

A frequência de granulomas periapicais parece ser superior a dos abscessos, conforme descrito anteriormente a partir dos estudos de Ramachandran et al. (1996) e Schulz et al. (2009). Porém, um estudo na Nigéria com 75 biópsias de lesões periapicais sem tratamento endodôntico prévio demonstrou haver 22% de abscessos contra 17% de granulomas, os quais exibiram diferentes estágios de desenvolvimento. Os autores comentaram que provavelmente essa redução do número de granulomas tenha sido em função da retirada de casos previamente tratados endodonticamente (Omoregie et al., 2011).

Recentemente, a microbiota dos granulomas periapicais e de lesões refratárias ao tratamento endodôntico tem sido extensivamente estudada. As lesões primárias crônicas exibem ampla gama de bactérias Gram-negativas (*Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema*, *Campylobacter* e *Veillonella*) e Gram-positivas (*Parvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* e *Eubacterium*); já as lesões refratárias, nas quais ocorrem frequentemente infecções secundárias, exibem maior quantidade de bactérias Gram-positivas, tais como espécies de *Streptococcus*, *P. micra,* espécies *de Actinomyces*, espécies de *Propionibacterium*, *P. alactolyticus,* espécies *de Lactobacillus, Enterococcus faecalis* e *O. uli*. Dentre elas, *E. faecalis* parece ser a mais virulenta e persistente nas lesões refratárias (Siqueira Jr; Rôças, 2009).

Vários trabalhos têm apontado a presença de vírus nessas lesões, principalmente da família dos herpesvírus. As lesões sintomáticas exibiram maior quantidade de mRNA de citomegalovírus humano e Epstein-Barr vírus do que as assintomáticas, bem como maior expressão de IFN, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF. Os autores concluíram que esses vírus provavelmente participam da patogenia dos granulomas periapicais (Sabeti et al., 2012).

Apesar de alguns trabalhos detectarem a presença de *Candida spp* em amostras de lesões periapicais refratárias (Siqueira Jr; Rôças, 2009), há estudos que não associam a presença desse fungo nos granulomas periapicais persistentes. A presença de espécies de fungos do gênero *Candida* (*C. albicans, C. tropicalis, C. krusei, C. guilliermondii, C. glabrata*) em lisado de lesões refratárias de granuloma periapical foi investigada em 103 casos utilizando análise do DNA por PCR. Em 50% dos casos não foi encontrada nenhuma evidência de *Candida* e em 18% dos casos evidências da presença do fungo foram detectadas, porém não confirmadas por análises histoquímicas e imuno-histoquímicas das lesões. Os autores concluíram que a *Candida* parece não participar da microbiota dos granulomas periapicais.

2.5.1 Respostas imunológicas nos granulomas periapicais

A presença de linfócitos CD4+, CD8+ e CD30+ é descrita em granulomas periapicais, acompanhados de macrófagos, células plasmáticas, mastócitos e polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos (Piatelli et al., 1991). São detectadas também nessas lesões diferentes tipos de citocinas e fatores de crescimento (IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12,TNF-α, TGF-β e G-CSF) (Teixeira-Salum et al., 2010).

Trabalhos têm demonstrado existir evidências das respostas Th1 e Th2 em granulomas ou periodontites periapicais induzidas em camundongos (de Rossi et al., 2008), bem como em lesões humanas biopsiadas (Colic et al., 2006). Parece que citocinas equivalentes a resposta Th1 são expressas em maior quantidade na fase destrutiva do processo (De Rossi et al., 2008), havendo relação dessa expressão com reabsorção óssea, enquanto a resposta Th2 participa da fase final do processo, quando predomina a fase reparativa (Colic et al, 2006, 2009a, 2009b). Porém, as variações dessas respostas são grandes de estudo para estudo.

Walker et al. (2000) identificaram as proporções das diferentes células inflamatórias mononucleares presentes nos granulomas periapicais (n=12) e nos cistos radiculares (n=12) humanos. Verificaram existir significativamente mais linfócitos T CD4+ nos granulomas do que nos cistos radiculares, e que não havia

diferenças entre a proporção de linfócitos T CD4+ e CD8+ nos granulomas. A citocina mais abundante nessas lesões foi a IL-10, seguida por IL-6, IL-4, IFN-γ e por último IL-2, porém não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre granulomas e cistos. Pelo painel analisado, a resposta Th2 foi considerada a mais predominante nas lesões estudadas, com considerável tendência a haver um controle do processo inflamatório pela massiva presença da IL-10.

Conclusões diferentes foram obtidas no trabalho de Colic et al. (2006). Os autores avaliaram a heterogeneidade das células presentes em 25 granulomas periapicais humanos. Verificaram haver predomínio de agranulócitos (linfócitos T CD4+ e CD8+ e linfoblastos), seguidos de granulócitos (na grande maioria neutrófilos), células monocíticas (já diferenciadas em macrófagos e células apresentadoras de antígenos) e por fim mastócitos. Detectaram também associação entre lesões sintomáticas e maior quantidade de granulócitos e células T CD8+. Na avaliação da produção de citocinas, os autores verificaram que em boa parte dos granulomas estava presente IFN-γ e IL-4, e que o IFN-γ era produzido mais por células TCD4+. A quantidade de IFN-γ foi bem maior do que a de IL-4, porém devido às variações entre os espécimes, não houve diferenças significativas. Os autores concluíram que provavelmente a resposta que predomina nos granulomas periapicais é do tipo Th1 devido à grande produção de IFN-γ, porém essa resposta é caracterizada por múltiplas nuances que precisam ser melhor estudadas para esclarecer a patogenia dos granulomas periapicais.

Nessa mesma linha de pesquisa, a expressão imuno-histoquímica da IL-12, IL-4 e IFN-γ foi analisada em biópsias de cistos radiculares e granulomas periapicais. A IL-12 não foi detectada em nenhuma biópsia; já a IL-4 foi teve expressão mais intensa em granulomas do que em cistos; estes exibiram expressão mais intensa de IFN- γ, o que pode sugerir maior que o fenótipo Th1 é mais predominante nessas císticas, enquanto o fenótipo Th2 é mais evidente nos granulomas (de Carvalho Fraga et al., 2013).

Em outro estudo, autores (Colic et al., 2009a) demonstraram a predominância de linfócitos T e plasmócitos em 96 granulomas periapicais, porém quando as lesões eram sintomáticas, o predomínio de neutrófilos e de macrófagos era significativamente maior. Os autores detectaram também que ora as lesões tinham

predomínio de linfócitos T, ora de plasmócitos, sem haver correlação com a sintomatologia da lesão, indicando que respostas tanto celular quanto humoral estavam presentes. Esses autores ainda demonstraram que a menor população de células inflamatórias era de mastócitos, e que estes estavam significativamente em maior número nos granulomas em que predominavam plasmócitos. Os autores também analisaram a presença de células dendríticas apresentadoras de antígenos, e verificaram que essa população celular correspondia a 4,8% das células. Essas células dendríticas eram CD83 positivas e negativas e células de Langerhans CD1a+, essas últimas em menor quantidade. Nesse trabalho ainda os autores quantificaram citocinas secretadas por essas células, e viram que nos granulomas em que predominavam plasmócitos e que eram assintomáticos havia maior quantidade de IL-10 e TGF-β, indicando serem essas lesões provavelmente com mais imunorregulação e com tendências a reparo.

Fukada et al. (2009), por meio de reação em tempo-real da cadeia da polimerase (PCR) em amostras de gengiva saudável (n=8), granuloma periapical (n=20) e cistos (n=10), estudaram os diferentes reguladores de respostas Th1 e Th2, marcadores de células Treguladoras (Treg) e fatores envolvidos na quimiotaxia e ativação de osteoclastos. Como resultado obtiveram uma predominância de atividade osteoclástica em granulomas e correlação dessa atividade com a resposta Th1. Houve também maior expressão de marcadores de células Treg nos granulomas, sugerindo uma possível supressão da resposta Th1 nessas lesões. Nos cistos, a resposta Th2 foi mais intensa.

Teixeira-Salum et al. (2010) selecionaram biópsias de cistos radiculares (n=17) e de granulomas periapicais (n=30), com a finalidade de avaliar os níveis de óxido nítrico (NO), IL-4, TGF-β, TNF-α e IFN-γ nessas lesões, além de avaliar uma possível associação com parâmetros clínicos e radiográficos. TNF-α e IFN-γ foram observados em 10% das amostras de granulomas e em 41,2% e 70% das amostras nos cistos, respectivamente. TGF-β estava presente em todas as amostras, enquanto a IL-4 só foi positiva para as amostras de cistos. Lesões que apresentavam reabsorção estavam associadas a altos níveis de IFN-γ e de NO. Pacientes com sensibilidade mostraram níveis significantes de IFN-γe IL-4, já os que apresentaram aumento de volume foram associados a altos níveis de TNF-α, IFN-γe

IL-4. A partir desses resultados, os autores concluíram que os granulomas possuem uma característica regulatória, caracterizada pelos altos níveis de TGF-β e baixos níveis de citocinas inflamatórias. Já os cistos radiculares apresentam uma reação inflamatória com um misto de resposta Th1 e Th2 sem alterar a presença de IFN-γ, TNF-α e IL-4.

Outros autores verificaram a expressão da IL-9 e da IL-22, no intuito de detectar a presença dos fenótipos Th9 e Th22 em lisados de granulomas periapicais obtidos de humanos e em lesões periapicais induzidas em animais. Detectaram, por PCR em tempo real, que o mRNA das IL-9 e IL-22 estava em maior quantidade nos granulomas ativos do que nos inativos, bem como nas lesões induzidas em animais (Aranha et al., 2013). Detectaram também que, nessas lesões induzidas, a presença das citocinas era menor quanto maior a lesão, o que sugeriu ser essas citocinas responsáveis pela estabilização do processo inflamatório, tendo um papel protetor contra a progressão da lesão (Aranha et al., 2013).

Apesar de ficar evidente a presença de citocinas que identificam as respostas Th1 e Th2 nos granulomas periapicais, as inúmeras variações do processo inflamatório presentes nessas lesões têm levado os pesquisadores a investigar a presença de citocinas relacionadas a resposta Th17, no intuito de entender melhor a dinâmica dessas respostas em um contexto de reação inespecífica a patógenos.

Colic et al. (2007) verificaram a expressão de IL-17 e da IL-8 em 23 lesões periapicais. Os autores isolaram as células inflamatórias dessas lesões e avaliaram em cultura a produção dessas citocinas. Verificaram que havia significativamente mais IL-17 em cultura de células de lesões sintomáticas em comparação a lesões assintomáticas, bem como em lesões que continham mais linfócitos T do que B. Verificaram também que havia aumento da expressão de IL-8 quando em contato com a IL-17, confirmando a ação estimulante da IL-17 na secreção de IL-8.

As citocinas IL-2 e IFN-γ (representativas da resposta Th1), IL-4 e IL-5 (representativas da resposta Th2) e a IL-17A (representativa da resposta Th17) foram quantificadas em 96 granulomas periapicais (Colic et al., 2009a). Em 100% dos espécimes foram detectadas IL-2, IFN-γ e IL-17A; já a IL-4 e a IL-5 foram detectadas em 54% e 78% das amostras, respectivamente. IL-17A exibiu graus

significativamente maiores em lesões sintomáticas do que em assintomáticas, bem como em lesões em que predominavam linfócitos T ao invés de B, principalmente linfócitos T CD4+. Também foi observada correlação positiva entre os níveis de IL-17A e o número de neutrófilos, sugerindo que a ação proinflamatória dessa citocina, além de residir no fato de estimular outras citocinas proinflamatórias, como IL-6 e TNF-α, seja também em função da ativação dos neutrófilos. Os autores também verificaram correlação negativa entre IL-23 e IL-17A, o que contradiz a literatura uma vez que a IL-23 é considerada essencial para a diferenciação de células Th17. Os autores, porém, encontraram grande quantidade de IL-1β nos granulomas periapicais, a qual também é um indutor efetivo de células Th17. Atribuíram, assim, a formação da IL-17A muito mais pela presença de IL-1β do que lL-23 nos granulomas periapicais. Também detectaram que várias células co-expressam IFN-γ e IL-17A, indicando ausência de polarização entre as resposta Th1 e Th17. Essa ausência de polarização de respostas foi parcialmente explicada pelos autores pela pouca expressão de IL-23, bem como pela ausência de células dendríticas apresentadoras de antígenos maduras nos granulomas periapicais. Os autores concluíram que a IL-17A, nos granulomas periapicais, participa diretamente de eventos proinflamatórios, estando mais presente em granulomas contendo grande quantidade de linfócitos T CD4+.

Esses resultados foram parcialmente confirmados no trabalho de Henriques et al. (2011), que quantificaram mRNA de IL-17A em lesões periapicais refratárias ao tratamento endodôntico, juntamente com IFN-γ, TNF-α, lL-1β e lL-10. A expressão de mRNA dessas citocinas foi quantificada a partir do fluido periapical de dentes saudáveis com indicação endodôntica para finalidade protética (n=20) e de dentes exibindo lesões periapicais refratárias (n=20). A quantidade de mRNA de IFN-γ, TNF-α e lL-17A foi significativamente maior nas lesões refratárias do que no controle. Os dois grupos exibiram quantidades semelhantes de IL-1β e lL-10, confirmando a ação proinflamatória das citocinas ligadas à resposta Th1 (IFN-γ e TNF-α) e Th17 (lL-17A) e a manutenção dessas lesões no periápice.

Marçal et al. (2010) quantificaram as células positivas para as citocinas IL-17 e TGF-β, para as quimiocinas MCP-1 e MIP-1β, para FoxP3 e o número de mastócitos em granulomas periapicais (n=25), em cistos radiculares (n=25) e em

tecidos normais (polpa dentária de terceiros molares sem inflamação) (n=5). Verificaram haver número significativamente maior de mastócitos nos granulomas do que nos cistos, porém não verificaram haver diferenças de expressão das citocinas e quimiocinas entre as duas lesões. Houve associação entre maior quantidade de expressão de IL-17 e TGF-β em lesões com infiltrado inflamatório misto composto por células mono e polimorfonucleares. Os autores concluíram que a resposta Th17 pode estar presente em momentos de agudização de processos crônicos, representada pela infiltração neutrofílica.

2.6 Modelos experimentais de lesões periapicais e respostas imunológicas

Os estudos sobre as respostas imunológicas deflagradas nas lesões periapicais em sua maioria consistem de modelos experimentais nos quais são induzidas lesões no ápice dentário a partir da exposição da câmara pulpar. Nesses estudos a análise histopatológica revela a presença de infiltrado mono e polimorfonuclear, bem como reabsorção localizada do osso alveolar. Em geral, os trabalhos procuram investigar citocinas pró e antinflamatórias, relacionando-as cronologicamente com a progressão da lesão e com o processo de reabsorção alveolar. Vale dizer que alguns trabalhos relatam não encontrar nesses modelos as mesmas bactérias encontradas nas lesões periapicais agudas e crônicas de humanos (Silva et al., 2012), fato que constitui uma importante limitação para a extrapolação e generalização dos resultados desses modelos para humanos.

Um exemplo dessa tendência é o trabalho de Huang et al. (2001). Os autores induziram a formação de lesão periapical em dentes molares de camundongos modificados geneticamente, com e sem deficiência na produção de IL-6. Semanalmente grupos de animais foram sacrificados e as lesões foram medidas histologicamente, até o período de 8 semanas. Observaram que as lesões nos camundongos deficientes de IL-6 tiveram tamanho significativamente maior do que as observadas nos camundongos normais, bem como exibiram infiltrado neutrofílico mais exuberante. Em ambos os grupos foi observada reabsorção óssea, com

numerosos osteoclastos na periferia do aglomerado inflamatório. Esses achados sugeriram que a IL-6 parece ter um efeito anti-inflamatório, principalmente nos períodos mais tardios de formação da lesão (a partir de 14 dias após a exposição pulpar), já que as lesões foram menores no grupo de camundongos normais. Apesar de a IL-6 estar associada diretamente a ativação de osteoclastos e a reabsorção óssea, a ausência de IL-6 não impediu que esse fenômeno fosse visto nas lesões periapicais.

A presença da elastase de macrófagos e de elastase de neutrófilos foi investigada em lesões periapicais induzidas em molares de ratos. As lesões se desenvolveram histologicamente nos períodos entre 7 e 28 dias. O pico de elastase macrofágica e neutrofilica foi no período entre 14 e 28 dias, havendo maior quantidade de elastase macrofágica em relação a neutrofílica nos períodos de 7 e 21 dias. Os autores concluíram que a elastase macrofágica participa da instalação das lesões, enquanto a elastase neutrofílica participa da expansão da área de destruição, incluindo a reabsorção óssea (Morimoto et al., 2008).

Um estudo demonstrou que linfócitos T CD3+ estão presentes em grande quantidade em lesões periapicais induzidas em camundongos a partir do terceiro dia após a indução. A maioria desses linfócitos é RANKL positivo, o que indica que essas células são fonte de secreção dessa proteína, a qual participa ativamente da osteoclastogênese. Os autores ainda verificaram que as bactérias presentes na lesão foram capazes de ativar as células T CD3+ em modelo ex vivo, as quais passaram então a expressar RANKL, o que sugere ser a reabsorção óssea em grande medida estimulada pelas toxinas bacterianas (Silva et al., 2012).

No tocante a resposta Th17, foram encontrados poucos trabalhos experimentais em ratos que verificaram o participação da IL-17 nas reabsorções ósseas durante a evolução das lesões periapicais. A Figura 2.1 ilustra as principais hipóteses derivadas desses trabalhos quanto ao papel das respostas Th1, Th2 e Th17 nas lesões periapicais de caráter mais crônico, compatíveis com os granulomas periapicais. A pirâmide ilustra maior quantidade de linfócitos T CD4+ e CD8+, seguidos de linfócitos B e granulócitos. Macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos têm quantidade intermediária. São escassos mastócitos, elementos de tecido granulação e células indiferenciadas na

comparação com a proporção de células mononucleadas. Os gráficos representam três estágios de evolução dos granulomas: no início da formação da lesão, em que não há reabsorção óssea evidente, pode-se dizer que as três respostas (Th1, Th2 e Th17) coexistem, em função da quantidade de citocinas presentes. Na progressão da lesão, com reabsorção óssea, predomina a resposta Th1, com intensa secreção de IFN-γ, bem como ativação osteoclástica pela IL-6, TNF-α e IL-17. Por fim, na restriçao do processo inflamatório e início do reparo a resposta Th2 predomina, com redução de IL-17 e aumento de TGF-β.

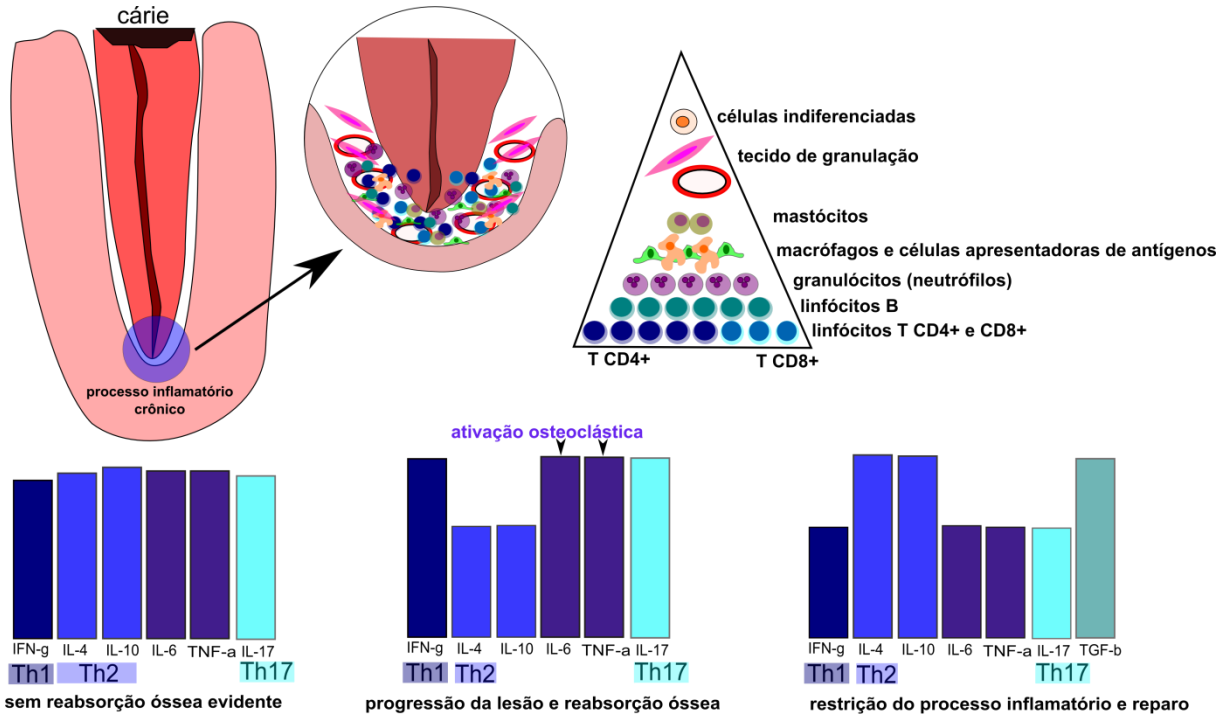


Figura 2.1 - Ilustração do papel das respostas Th1, Th2 e Th17 em lesões periapicais crônicas induzidas em animais. A proporção de citocinas presentes nos gráficos foi adaptada de Colic et al. (2009a). As demais ilustrações foram inspiradas nos trabalhos descritos na revista de literatura

Essas hipóteses ainda são bastante discutidas, e resultados contrastantes e mesmo contraditórios por vezes anulam parte do raciocínio ilustrado, conforme demonstram os trabalhos a seguir.

Xiong et al. (2009) provocaram a formação de lesões periapicais em ratos por intermédio da exposição pulpar e verificaram a expressão da IL-17 e a presença de osteoclastos em diferentes períodos experimentais. Os autores verificaram que a IL-17 esteve presente em todos os períodos analisados (7, 14, 21 e 28 dias), com aumento progressivo e pico em 28 dias, sendo expressa mais por linfócitos. Os osteoclastos foram observados em maior número após 14 dias, com redução significativa em 28 dias. Os autores concluíram que a IL-17 participa tanto da instalação quanto da progressão da lesão periapical, e que pode exercer tanto um papel protetor contribuindo para a defesa contra microrganismos, quanto destrutivo por participar da osteoclastogênese e, consequentemente, da reabsorção do osso alveolar.

Ainda nessa mesma linha de pesquisa, Oseko et al. (2009) induziram lesões periapicais em camundongos deficientes de IL-17, IFN-γ e TNF-α, por intermédio da exposição pulpar de molares e posterior infecção com uma mistura de *P. gingivalis* e *P. intermedia*. Os animais deficientes em IFN-γ e TNF-α tiveram tamanho de lesões periapicais semelhantes aos animais normais infectados, o que indicou não ser essas citocinas essenciais para a progressão das lesões periapicais. Já os animais deficientes de IL-17 exibiram lesões menores, com pouca reabsorção óssea. Os autores concluíram que a IL-17 participa da progressão das lesões periapicais, contribuindo para a reabsorção óssea.

O AlShiwaimi et al. (2013) revelou resultados que, em certa medida contradizem os anteriores. Os autores induziram reabsorções ósseas alveolares por exposição pulpar cirúrgica e contaminação microbiana em molares de camundongos wild-type (WT) e de camundongos deficientes em receptores para IL-17 (IL-17RA KO). A IL17 foi fortemente induzida nos ratos WT durante 7 e 14 dias depois da contaminação, porém não houve expressão dessa citocina em animais não contaminados. Os ratos IL17RA KO exibiram extensas áreas de reabsorção alveolar; o mesmo efeito foi observado quando os receptores para IL-17 foram bloqueados nos animais WT. Os dois resultados demonstraram que a IL-17 parece ter efeito protetor contra a reabsorção óssea nas lesões periapicais. Nos animais IL17RA KO as lesões exibiam infiltrado neutrofílico e macrofágico predominante em períodos tardios da indução, indicando que a ausência de receptores para IL-17 contribuiu para permanência do quadro inflamatório nas lesões. Uma das explicações para

essa permanência de neutrófilos no local foi o aumento de quimioatratores para neutrófilos (MIP2) nos animais deficientes de receptores para IL-17. Ao mesmo tempo, a permanência de macrófagos nesses animais em períodos tardios provavelmente contribuiu para a secreção desses quimioatratores, adicionados aos níveis elevados de citocinas proinflamatórias (IL-1α e IL-1β) também observados nesse período. Os autores concluíram que a IL-17 provavelmente participa dos mecanismos de resolução das lesões periapicais, e que a deficiência de seus receptores acarreta a permanência do estímulo inflamatório e o aumento da reabsorção alveolar.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Investigar se a expressão da IL-17 é mais proeminente nos abscessos do que nos granulomas periapicais e relacionar essa expressão à população de neutrófilos e linfócitos presentes nessas lesões.

3.2 Objetivos específicos

a) Caracterizar a expressão imuno-histoquímica da IL-17 em relação a expressão de CD4, CD8 e elastase em biópsias cujo diagnóstico histopatológico foi de abscesso periapical ou granuloma periapical.
b) Quantificar as células CD4+/IL-17+ e CD8+/IL-17+ detectadas por imunofluorescência nessas mesmas biópsias.
c) Verificar se há correlação entre os diferentes marcadores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia a seguir foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP (Parecer n. 206.324) (Anexo A).

4.1 Seleção de casos

Casos cujas biópsias tiveram diagnóstico ou de granuloma periapical ou de abscesso periapical foram selecionados do acervo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP a partir dos seguintes critérios: ter informações clínicas acerca de gênero, idade, cor da pele, dente acometido, sintomatologia e história de comorbidades (principalmente as relacionadas com imunossupressão, tais como HIV/AIDS); exibir quantidade suficiente de material no bloco parafinado; não ter artefatos de fixação ou de outra natureza. Não foram selecionados casos cujo diagnóstico histopatológico foi de abscesso periapical crônico, nem de processo inflamatório crônico com agudização.

4.2 Análise histopatológica

Os casos selecionados foram reexaminados microscopicamente, para confirmar o diagnóstico histopatológico e para caracterizar as lesões em termos de presença de áreas necróticas, infiltrado inflamatório, tecido de granulação, fibrose e angiogênese. Essa análise foi realizada em pelo menos dois cortes de cada caso corados em HE. Foram considerados abscessos lesões em que predominava infiltrado inflamatório polimorfonuclear difuso, com grande quantidade de neutrófilos, e extensas áreas necróticas permeadas por células inflamatórias, exibindo arranjo circular, com os elementos inflamatórios contidos na porção central e na periferia

tecido conjuntivo fibroso. Já os granulomas foram assim classificados quando infiltrado inflamatório mononuclear difuso era entremeado por tecido de granulação, com presença de vasos sanguíneos neoformados e fibroblastos.

4.3 Análise imuno-histoquímica

Testes imuno-histoquímicos para evidenciação das proteínas elastase, IL-17, CD4 e CD8 foram realizados para cada caso selecionado. A elastase foi utilizada para evidenciação de neutrófilos, já que está presente nos grânulos citoplasmáticos dessas células (Korkmaz et al., 2010). A IL-17 é considerada uma das citocinas mais predominantes para caracterizar a resposta Th17 (Korn et al., 2009). Já as proteínas CD4 e CD8 são geralmente utilizadas para distinguir as populações de linfócitos T *helper* (CD4+) de linfócitos T citotóxicos (CD8+) (Moser; Leo, 2010).

Foram obtidos cortes de 3µm de espessura utilizando-se micrótomo Leica RM 2045 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha), os quais foram dispostos em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxisilano (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). A primeira etapa da técnica consistiu na desparafinização do corte, que foi realizada em dois banhos sucessivos em solução de xilol em temperatura ambiente. Em seguida, fez-se a reidratação das amostras por meio de banhos de 5 minutos em sequência decrescente de concentração de etanóis (do etanol absoluto à solução de etanol a 85%). Na sequência foi realizada remoção do pigmento formólico pela imersão dos cortes em solução de hidróxido de amônio a 10% em temperatura ambiente durante 5 min. A recuperação antigênica foi realizada em calor úmido (Quimis, São Paulo, Brasil) com imersão em tampão de ácido cítrico (0,01M) pH 6,0, durante 40 min a 97ºC. Esse procedimento foi realizado para todos os marcadores, com exceção do anticorpo anti-elastase (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA), o qual não necessitou de recuperação antigênica. Após a recuperação antigênica, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com duas imersões (de 15 minutos cada) em solução de peróxido de hidrogênio/metanol a 6% v/v. O tampão da reação foi TRIS (2-amino-2-hidroximetilpropano 1,3 diol) em

solução salina (TRIS 50 mM e cloreto de sódio – NaCl 150mM, pH 7,6), utilizado em toda a reação. Foram realizadas três imersões sucessivas de 5 minutos nesse tampão e, em seguida foi realizado o bloqueio de sítio inespecífico com albumina bovina sérica (BSA 1%) por 30 minutos em temperatura ambiente. Imediatamente após procedeu-se a incubação dos anticorpos primários em câmara úmida com proteção contra luz, durante 60 minutos em temperatura ambiente (Quadro 4.1). Em seguida, foi realizada incubação com anticorpo de ligação biotinilado durante 30 min e com o complexo terciário (estreptavidina-biotina) (LSAB kit peroxidase K0690, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) também durante 30 min, intercaladas com três imersões (5min cada) em solução de TRIS. A revelação foi realizada com diaminobenzidina (DAB) (Dako Liquid DAB Plus, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) e a contracoloração, com hematoxilina de Mayer. Procedeu-se então à desidratação, feita com banhos sucessivos de 5 minutos em cadeia crescente de etanóis (de 70% até absoluto), e à diafanização com xilol. Para a montagem das lâminas utilizou-se montagem automatizada (Tissue-Tek® SCA, Sakura, EUA) com fita de polietileno (Coverslipping Film Finitek, Sakura, EUA). Para o controle positivo, foi aplicado o mesmo protocolo descrito a seguir em cortes histológicos de tonsila palatina humana. Para o controle negativo não foi feita a incubação do anticorpo primário nos cortes histológicos das lesões avaliadas.

Quadro 4.1 – Informações sobre os anticorpos utilizados e sua metodologia de incubação

Anticorpo	**Clone**	**Reatividade**	**Titulação**	**Incubação**
Anti-CD4 (Abcam)	Monoclonal (10B5)	Anti-humano produzido em camundongo	1:50	1 hora, câmara úmida, temperatura ambiente
Anti-CD8 (Dako)	Monoclonal (C8/144B)	Anti-humano produzido em camundongo	1:50	1 hora, câmara úmida, temperatura ambiente
Anti-IL-17 (Abcam)	Policlonal	Anti-humano produzido em coelho	1:100	1 hora, câmara úmida, temperatura ambiente
Anti-elastase (Dako)	Monoclonal (NP57)	Anti-humano produzido em camundongo	1:50	1 hora, câmara úmida, temperatura ambiente

4.4 Dupla marcação de proteínas utilizando imunofluorescência

Foi realizada dupla marcação da proteína IL-17 com o CD4 e da IL-17 com o CD8, para identificar qual subpopulação de linfócitos T expressava IL-17 de forma predominante nas lesões.

Para a realização dos testes de imunofluorescência, seguiram-se as etapas descritas para a imuno-histoquímica, até o bloqueio de sítio inespecífico. Este foi realizado com soro de cavalo 10% diluído em tampão fosfato salino (PBS) durante 30 min. Imediatamente após, procedeu-se a incubação do primeiro anticorpo primário, o qual foi padronizado como sendo ou o CD4 ou o CD8, durante 1:30h em temperatura ambiente. A procedência dos anticorpos utilizados e sua titulação foram os mesmos descritos no Quadro 4.1. Terminada a incubação, foram feitos três banhos de TRIS (10 minutos cada), seguida da incubação em câmara escura do primeiro anticorpo secundário (anti-mouse, feito em cavalo, titulação 1:100, diluído em soro de rato adicionado a PBS na concentração de 2%), o qual continha Texas Red (TI-2000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). As lâminas foram então novamente lavadas em três banhos de TRIS (10 minutos cada), sucedidas por segundo bloqueio de sítio inespecífico, feito com o mesmo protocolo utilizado para o primeiro. Realizou-se em seguida a incubação do segundo anticorpo primário (IL-17) (Quadro 4.1) durante 1:30h em câmara escura. Após três banhos de TRIS (10 min), foi realizada a incubação do segundo anticorpo secundário (mesma procedência e titulação que o primeiro anticorpo secundário), agora contendo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (FI-2000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Terminada a incubação e feitos três banhos de TRIS (10 min cada), as lâminas foram recobertas com lamínulas utilizando meio de montagem contendo 4´,6 diamidinofenilindol (DAPI) (Vectashield®, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA).

Para a observação das lâminas e contagem das células duplamente positivas para as proteínas analisadas, utilizou-se microscópio de fluorescência AxioImager A1, contendo câmera AxioCam HRC e software de aquisição e processamento da

imagem AxioVisio versão 4.8 (todo o sistema da marca Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

4.5 Quantificação da expressão imuno-histoquímica

Para se analisar quantitativamente a expressão imuno-histoquímica nas lesões selecionadas, foi obtida a porcentagem de área de marcação evidenciada pelo DAB. Inicialmente, procedeu-se à digitalização de 6 campos histológicos, escolhidos aleatoriamente nas regiões de marcação mais intensa, com aumento original de 400X. Esses campos foram selecionados em dois a três cortes de cada caso de abscesso e de granuloma periapical. O procedimento de digitalização foi realizado utilizando-se microscópio Leica DM2500 (LeicaBiosystems, Wetzlar, Alemanha) e câmera Leica DFC 295 acoplada (LeicaBiosystems, Wetzlar, Alemanha), bem como software de aquisição de imagem LAS® (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). A intensidade de luz foi padronizada em todas as digitalizações. As imagens obtidas foram mantidas com formato RGB, resolução 2048 x 1536 pixels e extensão jpg.

Para a obtenção da porcentagem da área de marcação em relação à área de células inflamatórias, as imagens digitalizadas foram abertas no software ImageJ, transformadas em 8-bits e, em seguida, selecionaram-se os tons de cinza definidores dos núcleos das células inflamatórias, tanto das células positivas pela marcação imuno-histoquímica quanto das negativas. A área (em μm^2) ocupada por esses tons foi então calculada (Figuras 4.1, A e B).

Para o cálculo somente da área de marcação, aplicou-se filtro de deconvolução RGB (*plugin* Colour Deconvolution) (Landini, 2010) conforme descrição feita em Ruifrok & Johnston (2008). Por esse método, é possível separar a cor do DAB da cor da hematoxilina, permitindo a quantificação da área de marcação com maior fidelidade (Figura 4.1 C). Separado o DAB das demais cores, a imagem foi convertida para 8-bits, os tons de cinza definidores da marcação pelo DAB foram selecionados e a área ocupada por esses tons foi calculada (Figura 4.1 D).

Para se obter a porcentagem de área de células positivas normalizada pelo total de células no campo, dividiu-se a área do DAB pela área total de células e multiplicou-se por 100.

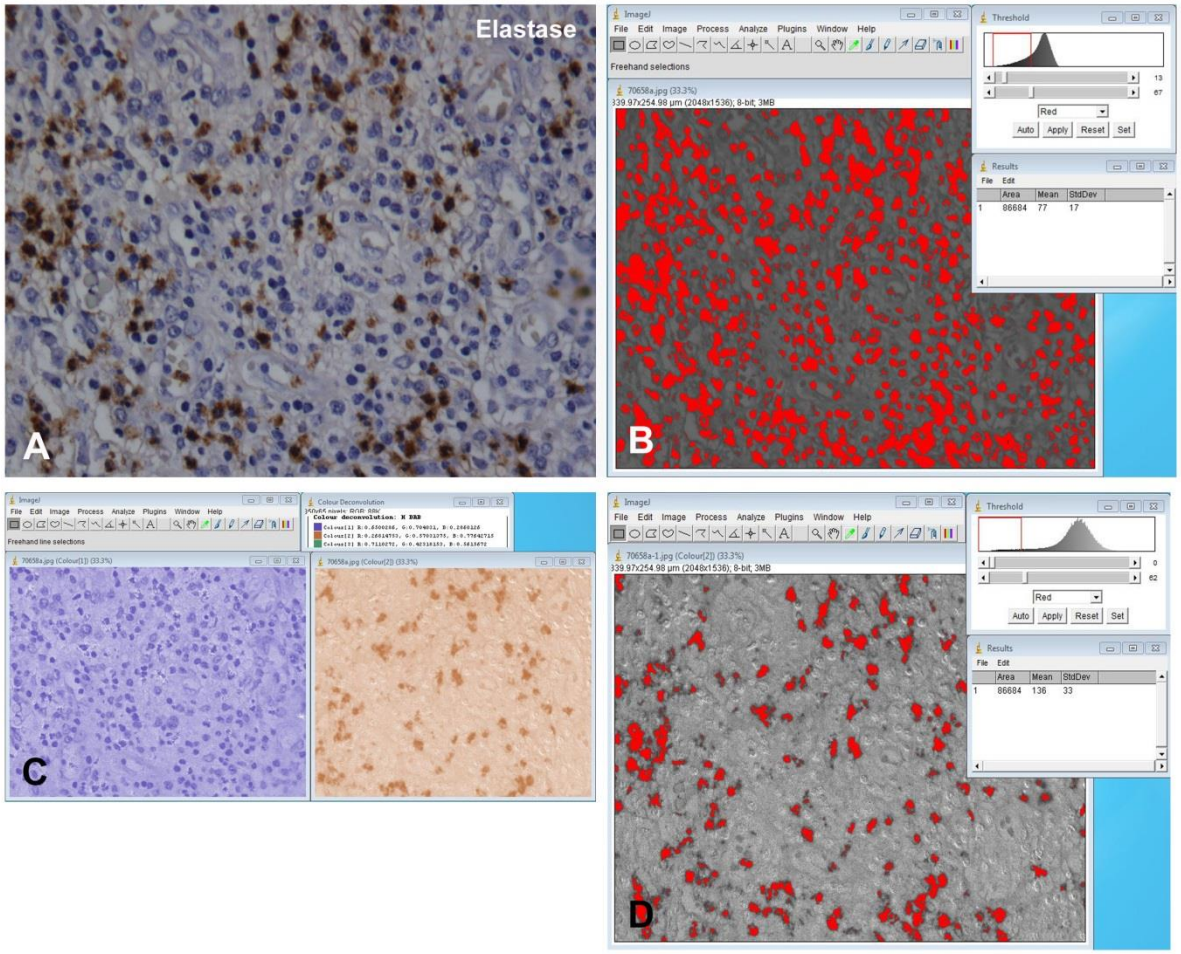


Figura 4.1 – Exemplo de cálculo da área de marcação pelo DAB. A: Corte histológico de granuloma periapical com positividade para elastase (Estreptavidina-biotina, aumento original de 400X). B: Seleção dos núcleos das células inflamatórias positivas e negativas e cálculo da área ocupada por esses núcleos. C: Deconvolução da imagem mostrada em A, obtendo-se duas imagens, uma referente a coloração de hematoxilina (azul) e outra da coloração pelo DAB (marrom). D: Seleção da área de marcação utilizando a imagem marrom transformada em 8-bits e cálculo da área de marcação

4.6 Quantificação de células na imunofluorescência

As células duplamente positivas evidenciadas pela técnica de imunofluorescência foram quantificadas utilizando-se a ferramenta de contagem manual de células, zoom de 300%, disponível no software Image J. Foram quantificados 6 campos histológicos de cada caso, digitalizados com aumento original de 400X. As células consideradas positivas para CD4 ou CD8 foram as que exibiram marcação pelo anticorpo contendo Texas Red, cuja emissão de fluorescência é no espectro vermelho (Figura 5.2 B). As células consideradas positivas para IL-17 foram as que exibiram marcação pelo anticorpo contendo FITC, cuja emissão de fluorescência é no espectro verde (Figura 5.2 C). O padrão considerado como dupla marcação positiva para os anticorpos CD4/IL-17 e CD8/IL-17 foi a sobreposição dessas emissões, originando cor amarela (Figura 5.2 D). Os núcleos celulares foram evidenciados pelo DAPI, cuja emissão de fluorescência é no espectro azul. As células que só apresentavam fluorescência nuclear azul foram consideradas células negativas. Todo o procedimento foi realizado por um único operador, sem conhecimento do tipo de lesão que estava sendo analisado.

Para se obter a porcentagem de células duplamente positivas, o total de células positivas para CD4 ou CD8 foi somado ao total de células negativas e ao total de células duplamente positivas, obtendo-se o total de células por campo. Em seguida, o total de células duplamente positivas foi dividido pelo total de células por campo e multiplicado por 100.

4.7 Análise estatística

Os dados clínicos foram apresentados em frequência absoluta e relativa, com exceção da variável “idade”, apresentada como mediana e valores mínimo e máximo. A comparação dos dados clínicos de abscesso com os de granuloma foi efetuada por meio do teste Exato de Fisher para dados categóricos e pelo teste de

Mann-Whitney para dados numéricos.

Foi realizado teste de normalidade para os valores numéricos obtidos nas porcentagens de área de marcação e de contagem das células, no qual se verificou tendência à curva não-normal. Adotaram-se então testes estatísticos não-paramétricos.

Os dados numéricos referentes à porcentagem de área de marcação do DAB e à porcentagem de células duplamente positivas visualizadas pela imunofluorescência foram apresentados como média e desvio-padrão. Para a comparação múltipla desses dados, utilizou-se o teste não-paramétrico de Friedman e, para a comparação dois-a-dois, o teste de Mann-Whitney.

Foi realizado também teste de correlação de Spearman para as porcentagens de área de marcação evidenciadas pelo DAB. O teste foi aplicado em todos os casos concomitantemente ou somente nos casos em que a porcentagem de área de marcação foi igual ou maior do que a média obtida em toda a amostra.

Para todos os testes estatísticos, o nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Dados clínicos

A Tabela 5.1 contém os dados clínicos dos pacientes cujas biópsias excisionais das lesões periapicais foram incluídos no presente estudo. Foram selecionados 25 casos de abscesso e 28 casos de granuloma. Em ambos os grupos, o gênero feminino foi mais frequente, porém sem diferenças estatísticas significativas para com o gênero masculino na análise dos grupos individualmente. Tanto no abscesso quanto no granuloma, foram significativamente mais frequentes pacientes leucodermas em relação amelanodermas (abscesso, p=0,0209; granuloma, p= 0,0001) e feodermas (abscesso, p= 0,0010; granuloma, p<0,0010). Também em ambos os grupos foram mais frequentes casos cujos dentes acometidos foram superiores posteriores. Essa frequência foi significativamente diferente em relação à frequência de dentes inferiores anteriores em ambos os grupos, a qual foi bem reduzida (abscesso, p=0,0047; granuloma, p=0,0092). Na análise da presença de sintomatologia, tanto no grupo de abscessos quando no de granulomas, casos assintomáticos foram significativamente mais frequentes (abscesso, p=0,0027; granuloma, p=0,0286). Em nenhum dos dois grupos houve descrição da presença de comorbidades. Na comparação entre os dois grupos testando-se cada variável clínica descrita não houve diferenças estatísticas significativas (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Dados dos pacientes cujas lesões periapicais de abscesso e granuloma foram selecionadas para o presente estudo.

Dados clínicos		**Abscesso (n = 25)**	**Granuloma (n = 28)**	**Valor de p**
Gênero	Masculino	10 (40,0%)	12 (42,9)	0,548
(n de casos, %)	Feminino	13 (52,0%)	16 (57,1)	0,511
	Sem informação	2 (8,0%)	0 (0,0)	0,236
Cor da pele	Leucoderma	14 (56,0%)	18 (64,3%)	0,468
(n de casos, %)	Melanoderma	6 (24,0%)	4 (14,3%)	0,345
	Feoderma	2 (8,0%)	1 (3,6%)	0,427
	Sem informação	3 (12,0%)	5 (17,9%)	0,451
Idade*		32,5 (24-58)	23 (20-43)	0,358
(mediana e valores mínimo e máximo)				
Dente acometido	Superior anterior	6 (24,0%)	7 (25,0%)	0,597
(n de casos, %)	Superior posterior	9 (36,0%)	10 (35,7%)	0,598
	Inferior anterior	1 (4,0%)	2 (7,1%)	0,554
	Inferior posterior	7 (28,0%)	6 (21,4%)	0,450
	Sem informação	2 (8,0%)	3 (10,7%)	0,566
Sintomatologia	Sintomático	9 (36,0%)	7 (25,0%)	0,362
(n de casos, %)	Assintomático	11 (44,0%)	15 (53,6%)	0,434
	Sem informação	5 (20,0%)	6 (21,4%)	0,591

Valor de p pelo teste de Mann-Whitney para a variável “idade” e pelo teste Exato de Fischer para as demais variáveis na comparação entre abscesso e granuloma. Significante quando p<0,050.

* Três (3) casos de abscesso (12,0%) e dois (2) casos de granuloma não continham informação da idade (7,0%).

5.2 Características histopatológicas

A Figura 5.1 contém exemplos das características microscópicas dos abscessos e granulomas periapicais em cortes histológicos corados em HE. A maioria dos casos de abscesso exibiu intenso infiltrado inflamatório em que predominavam polimorfonucleares sugestivos de neutrófilos, bem como grande número de macrófagos. Áreas extensas de necrose por entre o infiltrado inflamatório eram frequentes, com padrão amorfo e coloração eosinofílica. Grande quantidade de vasos sanguíneos e áreas focais de fibrose também estavam presentes. Já os granulomas periapicais exibiam área focal de tecido granulação exibindo intenso infiltrado inflamatório mononuclear difuso, composto por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, compondo processo crônico inespecífico. Grande quantidade de fibroblastos, vasos sanguíneos neoformados e áreas de deposição colagênica intensa eram também frequentes.

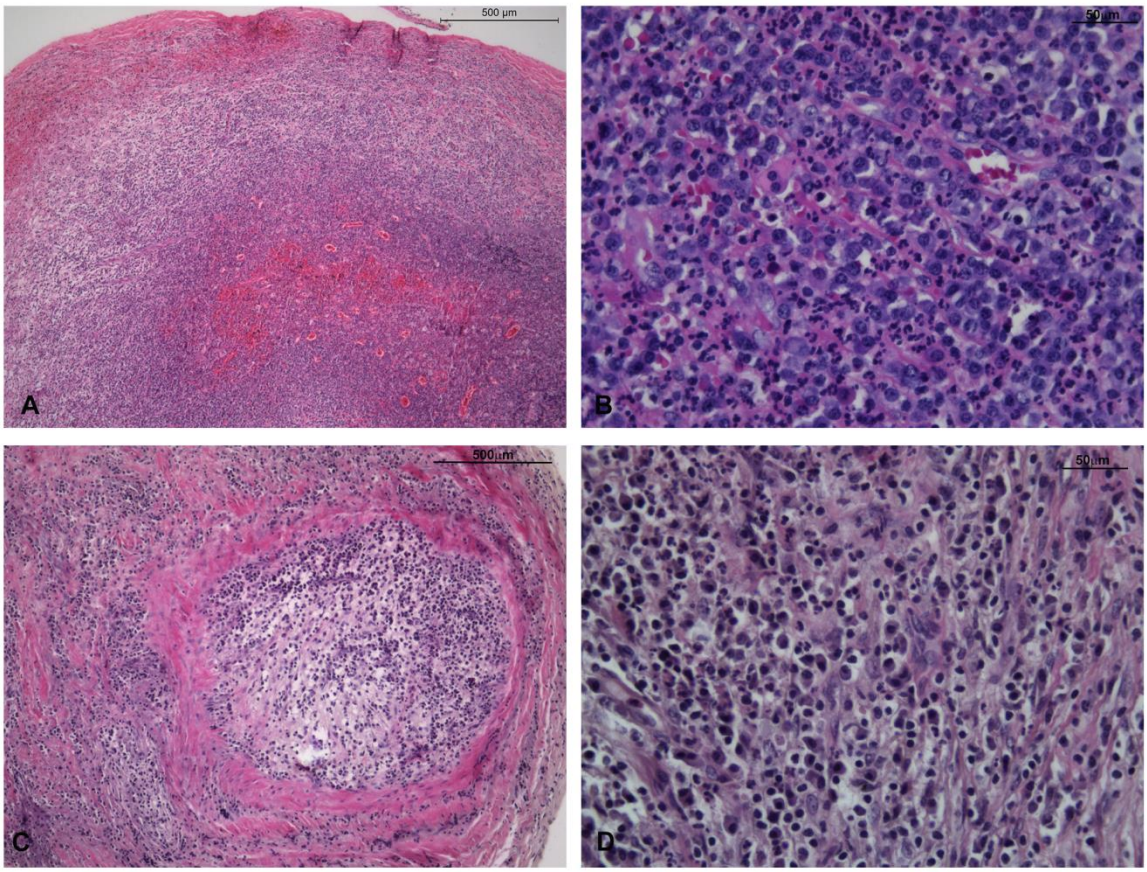


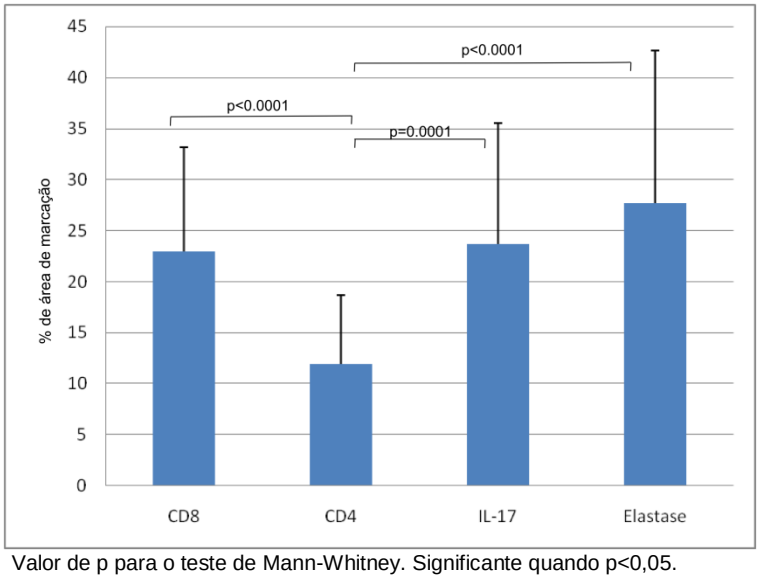
Figura 5.1 - Corte histológico de abscesso periapical (A e B) e granuloma periapical (C e D). A: Menor aumento de abscesso, em que se evidencia área focal de infiltrado inflamatório, com intensa deposição colagênica periférica e área necrótica central (HE, aumento original de 50X). B: Maior aumento em que se notam grande quantidade de polimorfonucleares sugestivos de neutrófilos, macrófagos e células mononucleares, difusamente distribuídas. Matriz extracelular necrótica e vasos sanguíneos frequentes também estão presentes (HE, aumento original de 400X). C: Menor aumento de granuloma periapical, em que se observa área focal de tecido de granulação com grande celularidade (HE, aumento original de 5X). D: Em maior aumento, observa-se infiltrado inflamatório composto predominantemente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, bem grande quantidade de fibroblastos, em uma matriz extracelular exibindo deposição colagênica em padrão fibrilar (HE, aumento original de 400X)

5.3 Quantificação da expressão imuno-histoquímica e por imunofluorescência

5.3.1 Abscesso periapical

O Gráfico 5.1 mostra a média (±desvio-padrão) da porcentagem de área de células positivas para cada um dos anticorpos utilizados nos casos de abscesso periapical. Em todos os casos houve positividade para a IL-17. Houve diferenças significantes entre os grupos quando analisados concomitantemente (p<0,0001). A maior porcentagem foi observada para a elastase, a qual foi estatisticamente significante na comparação com a obtida para o CD4 (p<0,0001). Entre os tipos de células T, houve predomínio de área para células T CD8+ em relação às CD4+ (p<0,0001). Entre CD8 e elastase não houve diferenças significantes.

A segunda maior porcentagem de área de células positivas nos abscessos foi para a IL-17, sendo significativamente maior do que a detectada para o CD4 (p=0,0001). Não houve diferenças significativas na comparação entre IL-17 e CD8 e IL17 e elastase. Evidencia-se assim que nos casos de abscesso destacam-se a intensa positividade para elastase e IL-17, com predomínio de células T CD8+ em detrimento às células T CD4+.



Valor de p para o teste de Mann-Whitney. Significante quando p<0,05.

Gráfico 5.1 - Média (±desvio-padrão) da porcentagem de marcação imuno-histoquímica para cada um dos anticorpos utilizados nos casos de abscesso periapical.

A Figura 5.2 evidencia o padrão de marcação imuno-histoquímica para elastase, CD8, CD4 e IL-17 nos casos de abscesso periapical. Observou-se marcação intensa da elastase em toda extensão citoplasmática das células polimorfonucleares, sendo negativas as células mononucleares e fibroblásticas. Já a marcação pelo CD8 evidenciou a membrana plasmática de células mononucleares, bem como parte de seu citoplasma, identificando-se os linfócitos T CD8+ das demais subpopulações de linfócitos. Já as células CD4+ exibiram padrão de marcação citoplasmática, variando de moderado a intenso. A IL-17 teve marcação intensa na maioria dos casos de abscesso, concentrando-se na região do infiltrado inflamatório e também nas áreas de necrose, quando visíveis. Foram positivas células mono e polimorfonucleares, bem como alguns endoteliócitos e fibroblastos ao redor do centro necrótico. Nenhum caso foi negativo para as proteínas analisados.

No teste de correlação de Spearman, não houve correlação significativa entre as porcentagens de área de marcação das proteínas analisadas analisando-se todos os casos de abscesso em conjunto (Anexo B). Para verificar se havia correlação dentre os abscessos com alta porcentagem de marcação, foram separadas as biópsias cuja porcentagem foi igual ou maior que a média. Considerando então os casos com maior porcentagem de área de marcação de células CD8 positivas (≥22%, 12 casos), houve correlação positiva entre CD8 e IL-17 (r_s = 0,5944, p=0,0415). Já para os casos com maior porcentagem de positividade para CD4 (≥12%, 11 casos) ou para elastase (≥27%, 13 casos), essa correlação não foi significativa. Isso pode indicar que, à medida que se observa maior área de marcação para CD8+, maior área de marcação para a IL-17 também é observada. Essa mesma relação não se repetiu entre a IL-17 e elastase e a IL-17 e o CD4.

Para verificar qual subpopulação de linfócitos expressava IL-17 nos abscessos, foram quantificadas as células duplamente positivas pela técnica de imunofluorescência. Apesar de os abscessos terem maior área de marcação para CD8 do que para CD4 (Gráfico 5.1) e de ter havido correlação positiva entre CD8 e IL-17, houve significativamente mais células CD4+/IL-17+ (média de 16,81±8,81%) do que CD8+/IL-17+ (média de 6,45±4,04%) (p=0,0250) (Tabela 5.2). A Figura 5.3 ilustra a dupla marcação das proteínas CD4 e IL-17 para os casos de abscesso. E a Figura 5.4 ilustra a dupla marcação das proteínas CD8 e IL-17 para os casos de abscesso.

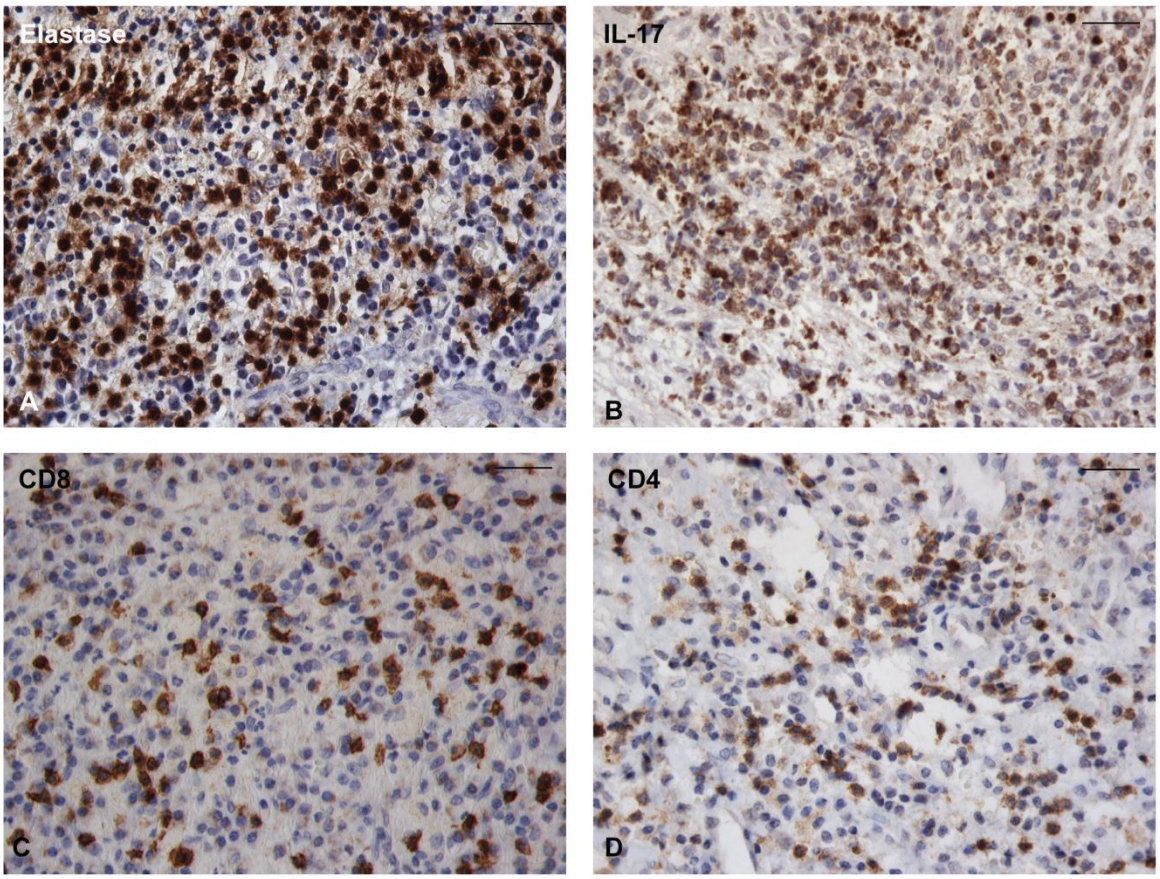


Figura 5.2 – Padrão de marcação imuno-histoquímica para elastase, IL-17, CD8 e CD4 (Estreptavidina-biotina, aumento original de 400X, escala 50µm) para os casos de abscesso periapical. A: Intensa marcação pela elastase nas células polimorfonucleares, sendo negativa em células inflamatórias mononucleares e fibroblastos. B: Intensa marcação pela IL-17 na maioria das células inflamatórias e também em áreas focais de necrose. C: Marcação pelo CD8, identificando a subpopulação de linfócitos T CD8+. D: Marcação pelo CD4, exibindo padrão menos intenso do que o CD8 e mais difuso no citoplasma de algumas células mononucleares

Tabela 5.2 - Porcentagem (média ± desvio-padrão) de células duplamente positivas para CD8/IL-17 e CD4/IL-17 nos casos de abscesso e granuloma periapicais

Lesões	**CD8+/IL-17+**	**CD4+/IL-17+**	**Valor de p na comparação entre colunas**
Abscesso periapical	6,45±4,04	16,97±8,95	0,0250
Granuloma periapical	6,70±1,90	10,62±3,99	0,0472
Valor de p na comparação entre as linhas	0,2506	0,4624	

Valores de p pelo teste de Mann-Whitney. Significante quando p<0,0500.

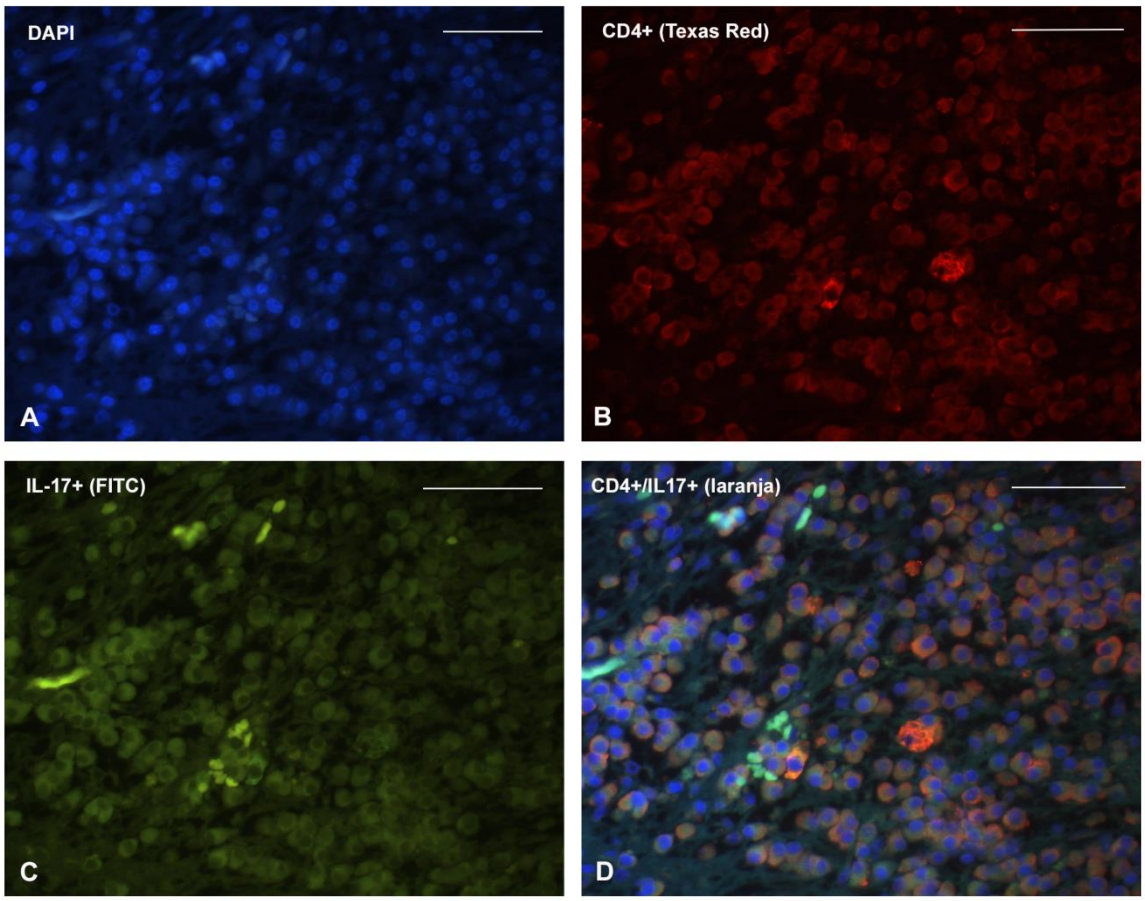


Figura 5.3 - Exemplo de dupla marcação por imunofluorescência das proteínas CD4 e IL-17 nos casos de abscesso periapical (aumento original de 400X, escala 50µm). A, B, C: Visualização da marcação pelo DAPI (núcleos celulares em azul), da proteína CD4 (vermelho) e da proteína IL-17 (verde) isoladamente. D: Dupla marcação de células CD4+/IL-17+ (laranja)

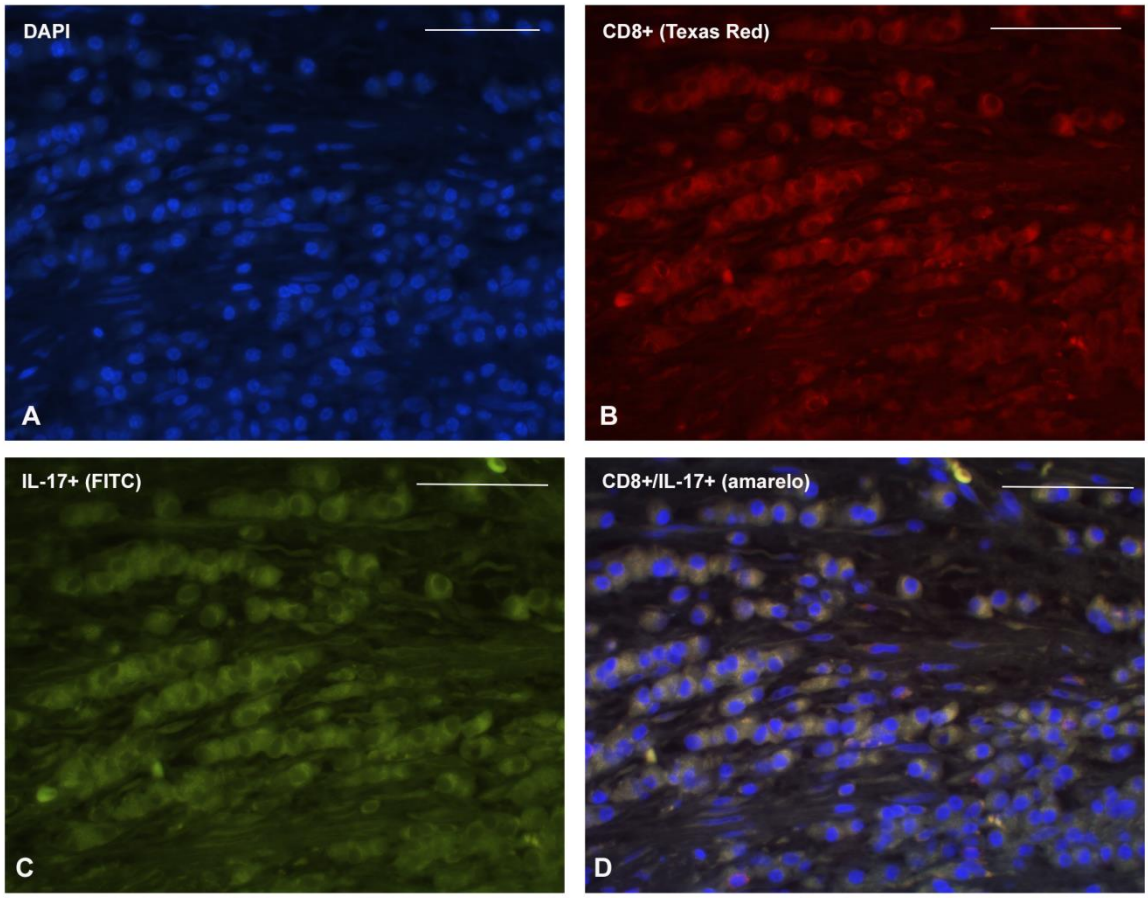
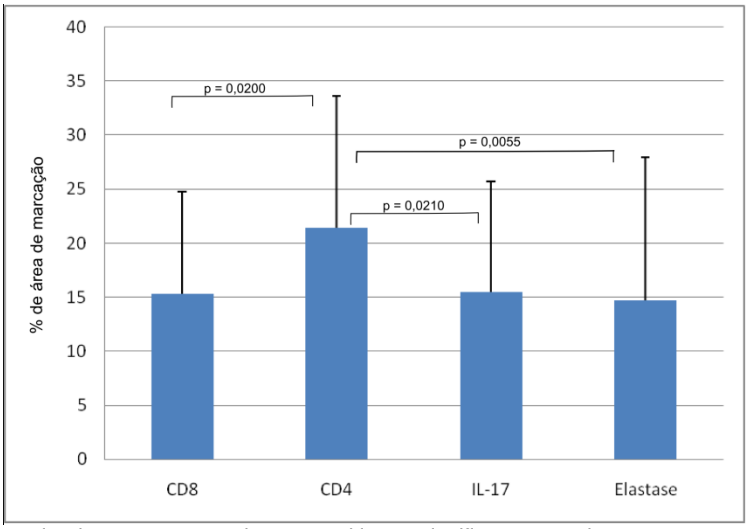


Figura 5.4 - Exemplo de dupla marcação por imunofluorescência das proteínas CD8 e IL-17 nos casos de abscesso periapical (aumento original de 400X, escala 50µm). A, B, C: Visualização da marcação pelo DAPI (núcleos celulares em azul), da proteína CD8 (vermelho) e da proteína IL-17 (verde) isoladamente. D: Dupla marcação de células CD8+/IL-17+ (amarelo)

5.3.2 Granuloma periapical

O Gráfico 5.2 exibe a média (±desvio-padrão) da porcentagem de área de marcação nos casos de granuloma periapical. Observa-se que a porcentagem de área de marcação do CD4 foi significativamente maior em relação a da elastase (p=0,0055), do CD8 (p=0,0200) e da IL-17 (p=0,0210). Entre CD8, elastase e IL-17 não houve diferenças significativas.



Valor de p para o teste de Mann-Whitney. Significante quando p<0,050.

Gráfico 5.2 - Média (±desvio-padrão) da porcentagem de área de marcação imuno-histoquímica para cada um dos anticorpos utilizados nos casos de granuloma periapical

Na Figura 5.5 tem-se o padrão de marcação imuno-histoquímica para os casos de granuloma, considerando-se os marcadores elastase, CD8, CD4 e IL-17. A elastase exibiu intensa marcação citoplasmática nas células polimorfonucleadas, sendo negativa nas células mononucleadas e nos fibroblastos. A marcação também foi intensa para o CD8 e para o CD4, ambos exibindo padrão de expressão no citoplasma e na membrana plasmática. A marcação para a IL-17 foi moderada em algumas células e intensa em outras, estas em geral mononucleadas, exibindo um padrão ora citoplamástico ora perinuclear. Várias células mononucleadas foram negativas para a IL-17. Evidencia-se assim que nos casos de granuloma destacam-se a baixa positividade para IL-17 e elastase, com predomínio de células T CD4+ em detrimento às células T CD8+. Nenhum caso de granuloma foi negativo para as proteínas analisadas.

Pela análise de correlação de Spearman, não houve correlação significativa entre a porcentagem de marcação das proteínas analisadas analisando-se todos os casos de granuloma em conjunto (Anexo C). Tal qual nos abscessos, para os granulomas também foram separados os casos cuja porcentagem de área de marcação foi igual ou maior que a média de todos os granulomas. Quando se consideraram somente os granulomas com maior porcentagem da área de marcação de células elastase positivas (≥10%, 13 casos), houve correlação positiva

entre elastase e IL-17 (rs = 0,5604, p=0,0463). Já para os casos com maior porcentagem de área para CD4 (≥22%, 10 casos) ou para CD8 (≥14%, 14 casos), essa correlação não foi significativa.

Nos granulomas também se verificou qual subpopulação de linfócitos T expressava IL-17. A porcentagem de células CD4+/IL-17+ (média de 10,55±3,96%) foi significativamente maior do que de células CD8+/IL-17+ (média de 6,70±1,90%) (p=0,0470), resultado que se assemelhou ao encontrado para os abscessos (Tabela 5.2). A Figura 5.6 ilustra a dupla marcação por imunofluorescência das proteínas CD4 e IL-17 nos granulomas. E a Figura 5.7 ilustra a dupla marcação por imuofluorescência das proteínas CD8 e IL-17 nos granulomas.

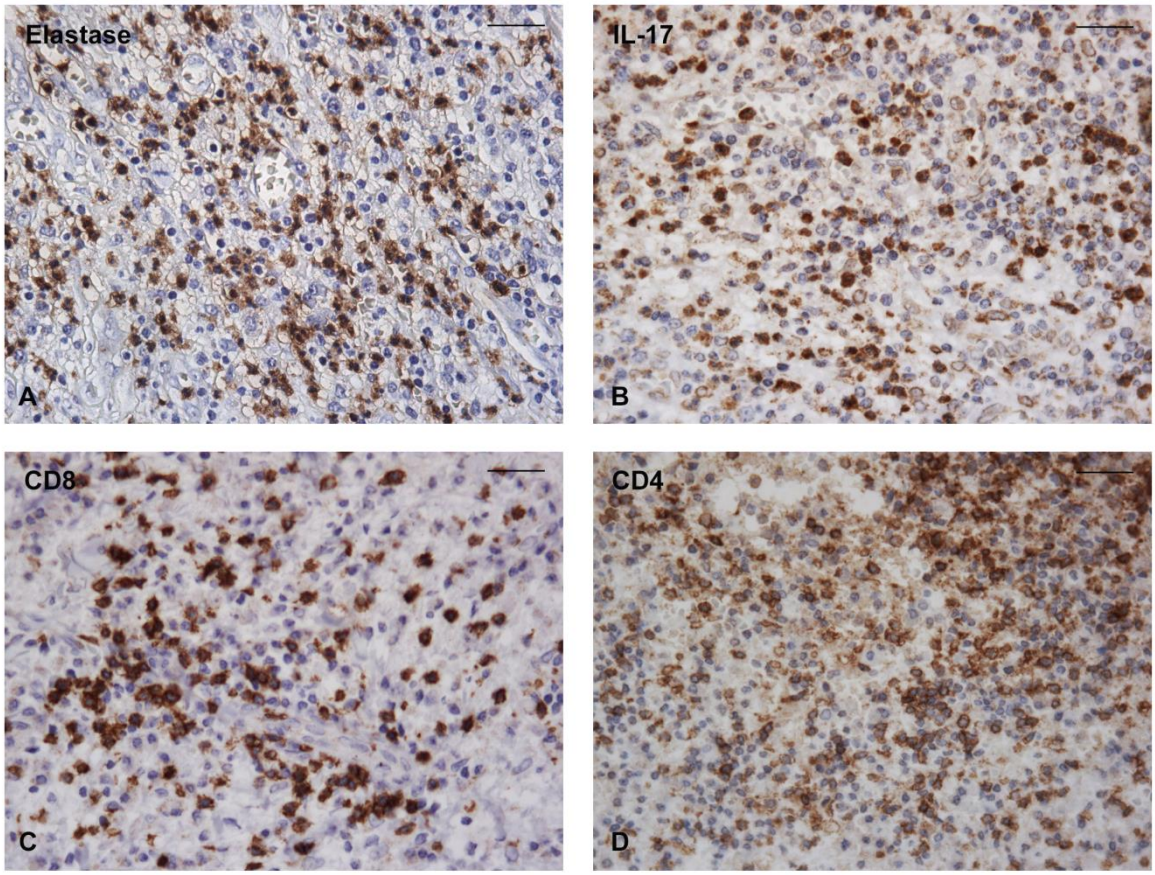


Figura 5.5 - Padrão de marcação imuno-histoquímica para elastase, IL-17, CD8 e CD4 para os casos de granuloma periapical (Estreptavidina-biotina, aumento original de 400X, escala 50µm). A: Intensa marcação pela elastase nas células polimorfonucleares, sendo negativa em células inflamatórias mononucleares, dentre elas células sugestivas de macrófagos. B: Intensa marcação pela IL-17 em algumas células inflamatórias, principalmente mononucleadas. C: Marcação pelo CD8, identificando a subpopulação de linfócitos T CD8+. D: Marcação pelo CD4, exibindo padrão citoplasmático discreto em algumas células e intenso na membrana plasmática de células linfocíticas

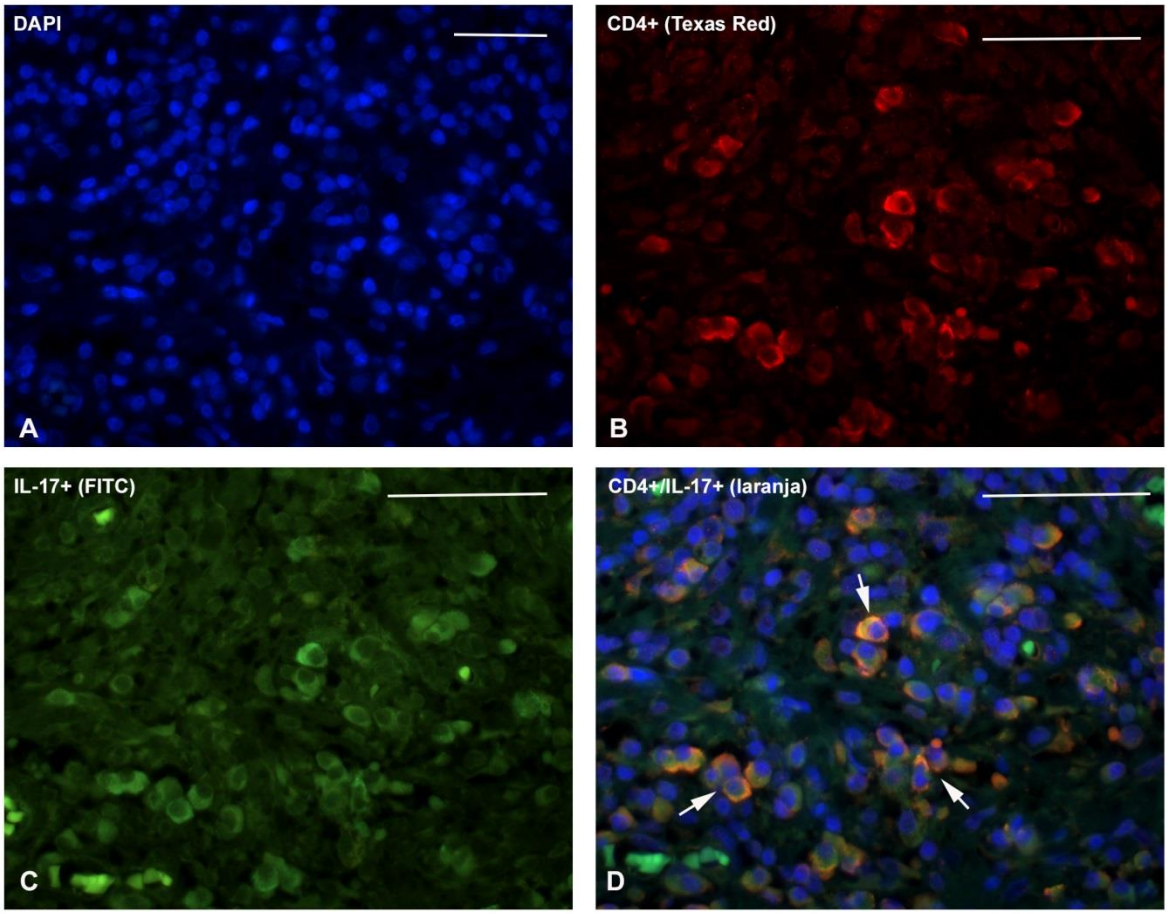


Figura 5.6 - Exemplo de dupla marcação por imunofluorescência das proteínas CD4 e IL-17 nos casos de granuloma periapical (aumento original de 400X, escala 50µm). A, B, C: Visualização da marcação pelo DAPI (núcleos celulares em azul), da proteína CD4 (vermelho) e da proteína IL-17 (verde) isoladamente. E: Dupla marcação de células CD4+/IL-17+ (laranja) (setas)

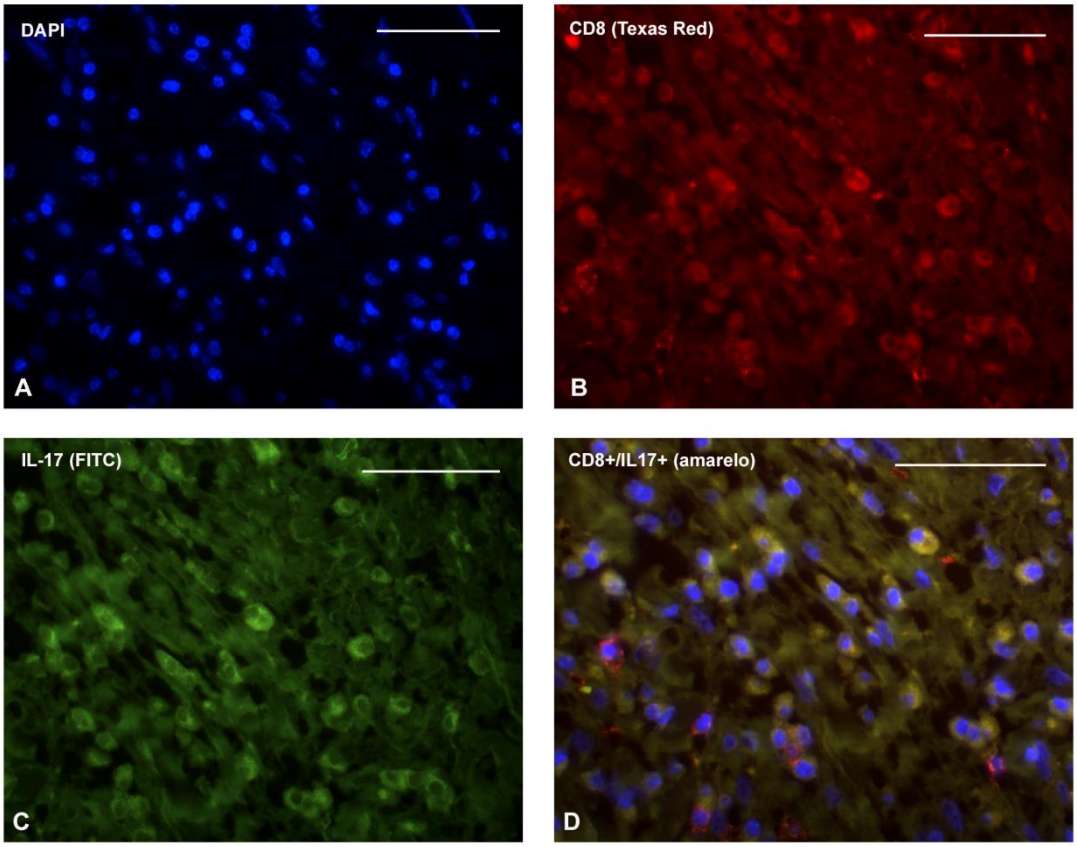
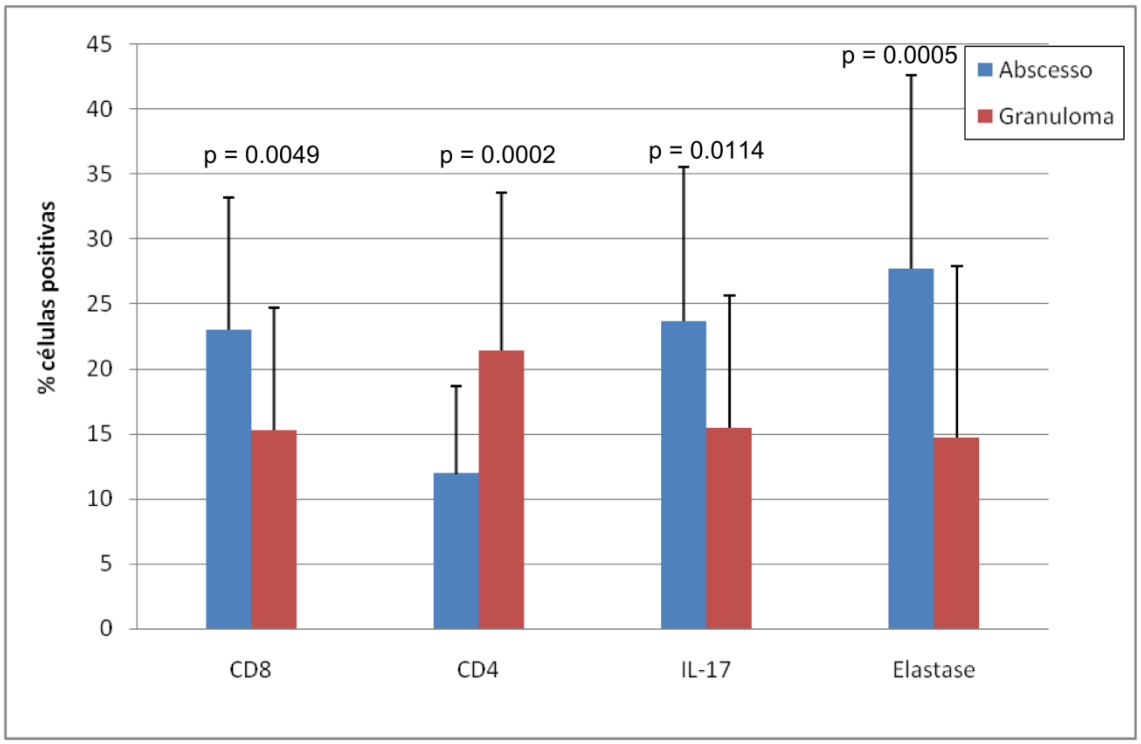


Figura 5.7 - Exemplo de dupla marcação por imunofluorescência das proteínas CD8 e IL-17 nos casos de granuloma periapical (aumento original de 400X, escala 50µm). A, B, C: Visualização da marcação pelo DAPI (núcleos celulares em azul), da proteína CD8 (vermelho) e da proteína IL-17 (verde) isoladamente. E: Dupla marcação de células CD8+/IL-17+ visualizadas em amarelo; as células positivas somente para CD8 são vistas em vermelho

5.3.3 Abscesso periapical *versus* granuloma periapical

O Gráfico 5.3 mostra a média (±desvio-padrão) da porcentagem de área de marcação para cada um das proteínas comparando-se os casos de abscesso com granuloma. Com exceção do CD4, cuja porcentagem de marcação foi significativamente maior no granuloma do que no abscesso (p = 0,0002), todas as demais proteínas tiveram porcentagem média significativamente maior de área de marcação no abscesso.



Valor de p pelo teste de Mann-Whitney. Significante quando p<0,050.

Gráfico 5.3 - Porcentagem média (± desvio-padrão) da área de marcação imuno-histoquímica para cada um dos marcadores tanto no abscesso quanto no granuloma

Na comparação entre abscesso e granuloma quanto à porcentagem de células CD8+/IL-17+ e CD4/IL-17+, não houve diferenças estatisticamente significantes, indicando que a frequência de células CD4+/IL-17+ e CD8+/IL-17+ foi semelhante entre os dois tipos de lesão periapical (Tabela 5.2).

6 DISCUSSÃO

A proposta deste trabalho foi investigar o padrão de expressão da IL-17 nos abscessos e nos granulomas periapicais, com o intuito de verificar se o fenótipo Th17 está presente nessas lesões e se há diferenças de expressão entre elas. A hipótese inicial foi a de que os abscessos, ricos em infiltrado neutrofílico, teriam maior expressão de IL-17 do que os granulomas, sabidamente lesões mais crônicas. Essa hipótese baseou-se em evidências presentes na literatura que demonstram intensa atividade de recrutamento neutrofilico feito pela IL-17, principalmente em lesões de artrite reumatóide (Aujla et al., 2007; Sadik et al., 2011). Também serviu de base para essa hipótese o trabalho de Colic et al. (2009a), em que lesões periapicais sintomáticas e com grande quantidade de neutrófilos exibiram maior expressão da IL-17. Essa hipótese se confirmou na medida em que detectamos, de forma significativa, maior porcentagem de área de marcação de IL-17 em abscessos do que em granulomas e, que nesses últimos, houve correlação positiva significativa entre elastase e IL-17.

Foram selecionados casos de abscesso e granuloma periapical sem considerar informações clínicas referentes a tratamento endodôntico pregresso, duração e tamanho da lesão, dados que têm sido considerados em vários trabalhos e correlacionados com a expressão de citocinas (Ataoglu et al., 2002; Colic et al., 2009a, 2009b, Teixeira-Salum et al., 2010; Aranha et al., 2013; Radics et al., 2003) e informações da microbiota (De Sá et al., 2007; Siqueira Jr; Rôças, 2009; Sabeti et al., 2012). A limitação de acesso a essas informações foi o motivo de as mesmas não terem sido adicionadas no presente trabalho. Mesmo as informações sobre sintomatologia foram bastante vagas e, muitas vezes, ausentes, o que inviabilizou sua utilização em testes de correlação. Por outro lado, as informações clínicas disponíveis para abscesso não diferiram em relação às dos granulomas, o que tornou a comparação entre os dois grupos isenta da intervenção de variáveis como idade, gênero, dente acometido e sintomatologia.

O painel imuno-histoquímico dos abscessos confirmou o caráter agudo desse processo inflamatório, com predomínio da elastase, a qual foi expressa principalmente no citoplasma de polimorfonucleares neutrófilos. A elastase compõe

os grânulos azurofílicos intracitoplasmáticos de neutrófilos e é responsável pela degradação de antígenos microbianos fagocitados ou presentes no meio extracelular (Korkmaz et al. 2010). Tem sido associada em modelos animais de indução de lesões periapicais à progressão das lesões, bem como à reabsorção óssea (Morimoto et al., 2008). A elastase foi investigada em exsudatos purulentos de abscessos periapicais, estando presente em níveis altos principalmente em lesões sintomáticas (Alptekin et al., 2005). Como o número de casos sintomáticos foi reduzido na presente amostra, e em função de parte significativa dos casos não apresentar informações sobre a sintomatologia, não foi possível verificar a associação da elastase com a sintomatologia das lesões.

Este trabalho também confirmou a presença da IL-17 nos abscessos, fato ainda não descrito na literatura, com porcentagem de área de marcação semelhante a da elastase. Esse cenário realça a presença intensa da IL-17 em um ambiente em que provavelmente prevalece a imunidade inata conferida pelos neutrófilos. Os modelos de lesões periapicais induzidas em animais demonstram a presença de IL-17 associada a períodos iniciais de formação da lesão (Colic et al, 2009; Xiong et al., 2009; Oseko et al., 2009).

Um ponto interessante foi também a alta porcentagem de área ocupada pelo CD8 em contraste com a pouca densidade de CD4 nos abscessos. Os linfócitos T CD8+ são considerados citotóxicos, especializados no reconhecimento de antígenos intracelulares conectados a moléculas MHC classe I (Moser; Leo, 2010). Em infecções pulpares por *S. mutans*, ocorre recrutamento mais intenso de linfócitos T CD8+ em relação a linfócitos T CD4+, o que indica que o tipo de antígeno determina as subpopulações linfocitárias no tecido pulpar (Hahn et al., 2009b). Boa parte dos estudos sobre a microbiota dos abscessos apontam a presença de várias espécies do *Streptococcus* (Rôças et al., 2011), principalmente nas lesões sintomáticas, fato que pode estar associado à grande densidade dessas células encontrada no presente estudo. Além disso, os linfócitos T CD8+ fazem o reconhecimento, por exemplo, de antígenos virais. Como alguns trabalhos detectaram a presença, ainda que pouco expressiva, de antígenos virais em exsudatos de abscessos periapicais (Chen et al., 2009; Ferreira et al., 2011), a participação de linfócitos CD8+ no reconhecimento e eliminação desses antígenos também não está descartada.

Intrigante foi a correlação positiva significante entre a porcentagem de área de marcação de CD8 e a de IL-17 nos casos em que houve alta expressão de CD8. Isso significou que, em casos nos quais havia muita expressão de CD8 havia também muita expressão de IL-17. Há indícios de que a IL-17 estimule a diferenciação de linfócitos CD8+ por intermédio da IL-21, citocina produzida mediante a presença da IL-17, bem como aumente a citotoxicidade dessas células (Jäger, Kuchroo, 2010; Duan et al., 2012). Essa relação deve ser melhor investigada nos abscessos periapicais, principalmente no tocante ao papel dos linfócitos CD8+ citotóxicos, já que boa parte das investigações sobre a eliminação dos antígenos nessas lesões reside nos mecanismos inerentes à fagocitose por neutrófilos e macrófagos e suas proteases (Alptekin et al., 2005).

Apesar da grande densidade de linfócitos CD8+, houve significativamente maior quantidade de linfócitos CD4+ co-expressando IL-17 nos abscessos periapicais. Esse resultado confirma a maioria dos trabalhos que investigam a expressão da IL-17 em lesões inflamatórias, nos quais é consenso ocorrer a diferenciação de células T CD4+ em fenótipo Th17 a partir da presença de IL-23, IL-6, TGF-β e fatores de transcrição (Weaver et al., 2007; Korn et al., 2009; Zúñiga et al., 2013). Porém, a quantidade de linfócitos T CD8+ co-expressando IL-17 não foi desprezível nas amostras de abscesso (em média 6,4% das células presentes por campo), fato que pode sugerir uma participação dessa subpopulação de linfócitos na resposta Th17. Linfócitos T CD8+ exibem plasticidade funcional tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e também podem assumir um fenótipo Th17, o qual é mediado por fatores reguladores de interferon (Ysebrant de Lendonck et al., 2013). De acordo com Jacobo et al. (2011), a maior expressão de células CD4+/IL-17+ em lesões inflamatórias sugere que o processo inflamatório está em fase inicial aguda, enquanto o aumento de células CD8+/IL-17+ sugere uma fase mais crônica. Mais estudos são necessários para esclarecer o papel dessa co-expressão nos abscessos periapicais.

Assim, a partir dos resultados dos testes imunohistoquímicos e de imunofluorescência, pode-se afirmar que há participação da IL-17 nos abscessos periapicais, e que sua expressão está relacionada aos linfócitos CD4+.

A porcentagem de área de marcação imuno-histoquímica nos granulomas periapicais revelou diferenças importantes em relação aos abscessos. Na comparação entre essas duas lesões, os granulomas exibiram significativamente maior porcentagem de CD4, a qual foi predominante também em relação a elastase, CD8 e IL-17 nessa lesão. A maior porcentagem de CD4 nos granulomas reflete seu caráter crônico, com predomínio de respostas adaptativas em detrimento da imunidade inata. O grande número de linfócitos T CD4+ tem sido relatado em alguns trabalhos, porém os autores não têm encontrado diferenças significativas em relação às células CD8+ (Walker et al., 2000; Colic et al., 2006; Colic et al. 2009a). No presente estudo houve maior porcentagem de área de marcação para CD4 em relação a CD8 nos granulomas estudados. Colic et al. (2009a) comentam que a maior infiltração de linfócitos CD4+ tem sido associada à formação do padrão granulomatoso em diversos processos crônicos, bem como à fase inicial de formação do granuloma periapical. Comentam, contudo, que ocorre grande variação na frequência de subpopulações de linfócitos T segundo a fase de formação do granuloma e o tipo de microbiota predominante, fato que pode explicar os resultados do presente trabalho.

A elastase foi expressa em todos os granulomas estudados, revelando haver certo infiltrado neutrofílico também nesses processos crônicos. Apesar de não serem selecionados casos que revelassem agudização nos granulomas, as porcentagens desse marcador nas lesões avaliadas por vezes foram superiores à média encontrada para os linfócitos CD4+, fato que aponta participação importante dos neutrófilos também nesses processos. Outros estudos anteriores já tinha assinalado a presença de polimorfonucleares nas lesões de granuloma, a qual foi relacionada à presença de sintomatologia nas lesões (Piattelli et al., 1991; Colic et al., 2007; Colic et al., 2009a, 2009b).

Em todos os granulomas foi detectada também a presença da IL-17, tal qual vários trabalhos já indicavam (Colic et al., 2007; Colic et al., 2009a; Marçal et al., 2010; Henriques et al., 2011). A porcentagem média de marcação dessa citocina não diferiu da encontrada para a elastase e o CD8, indicando não haver predomínio dessa proteína sobre as demais. Contudo, pela análise de correlação de Spearman, ao se selecionarem casos com alta porcentagem de elastase, houve correlação significativa para com a IL-17, significando que os casos que exibiam alta

porcentagem de elastase também exibiam alta porcentagem de IL-17. Essa correlação já fora observada em lesões periapicais sintomáticas, em que a expressão de IL-17 foi associada ao alto número de neutrófilos (Colic et al., 2009a), e em granulomas periapicais compostos por infiltrado inflamatório misto (Marçal et al., 2010). Assim, também para as lesões do presente estudo pode-se sugerir que a expressão da IL-17 está associada à presença de neutrófilos, afirmando seu caráter proinflamatório.

Tal qual nos abscessos, também nos granulomas houve maior porcentagem de células CD4+/IL-17+ do que células CD8+/IL-17+, o que demonstra a tendência anteriormente discutida de se associar a produção de IL-17 pelas células CD4+ (Colic et al. 2007). Vale comentar que os linfócitos CD4+ também co-expressam IFN-γ, o que pode indicar a presença concomitante das respostas Th1 e Th17 na mesma subpopulação linfocitária (Colic et al. 2009a). Nos granulomas também se destacou a frequência de células CD8+/IL-17+, o que pode indicar um novo fenótipo desse subtipo de células linfocitárias, considerando-se que pode haver baixa citotoxicidade dessas células diante da presença de IL-17 (Ysebrant de Lendonck et al., 2013). Assim, tal qual nos abscessos, também nos granulomas a população de linfócitos CD8+ precisa ser mais bem investigada, bem como sua tendência a adquirir um fenótipo efetor diferente daquele citotóxico até então conhecido.

A comparação da porcentagem de área de marcação entre os dois grupos de lesões foi possível graças à normalização da área de marcação pela área total de células inflamatórias. Essa normalização permitiu que se comparassem áreas com diferentes densidades de células inflamatórias, bem como foram desconsiderados os elementos teciduais cuja frequência variaram bastante de caso para caso, tais como células fibroblásticas, células da parede vascular, células epiteliais e células musculares. Em função disso, a porcentagem de área de marcação da IL-17 e dos demais marcadores obtida para o abscesso pode ser comparada com a do granuloma. Detectou-se porcentagem significativamente maior de IL-17 para os abscessos em comparação aos granulomas, o que pode indicar que a IL-17 provavelmente tem maior participação nos abscessos enquanto citocina proinflamatória.

Em resumo, a maior porcentagem de IL-17 nos abscessos sugere maior participação dessa citocina nessas lesões do que nos granulomas periapicais.

Nestes, a IL-17 foi correlacionada à presença da elastase, indicando que a presença dessa citocina é diretamente proporcional à presença de neutrófilos. Em ambas as lesões a IL-17 foi co-expressa em linfócitos CD4+, evidenciando que provavelmente a fonte principal dessa citocina seja essa subpopulação de linfócitos. Estudos mais abrangentes, envolvendo citocinas que representem as diversas formas de resposta imunológica e associando-as à microbiota predominante, devem ser instituídos para as lesões periapicais, no intuito de fornecer subsídios para o diagnóstico diferencial para posterior tratamento endodôntico dessas lesões.

7 CONCLUSÕES

1. A IL-17 foi detectada em todos os casos de abscesso e de granuloma, exibindo porcentagem significativamente maior nos abscessos.

2. A população linfocitária predominante nos abscessos foi de linfócitos CD8+, ao passo que nos granulomas foi de linfócitos CD4+.

3. Nos abscessos, houve correlação positiva significativa entre IL-17 e CD8 nos casos de maior porcentagem de CD8.

4. Nos granulomas, houve correlação positiva significativa entre IL-17 e elastase nos casos de maior porcentagem de elastase.

5. Em ambas as lesões os linfócitos T CD4+ foram os que mais exibiram co-expressão com a IL-17.

REFERÊNCIAS[1]

Adamkiewicz VW, Pekovic DD. Experimental pulpal Arthus allergy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1980;50(5):450–6.

Alptekin NO, Ari H, Haliloglu S, Alptekin T, Serpek B, Ataoglu T. The effect of endodontic therapy on periapical exudate neutrophil elastase and prostaglandin-E2 levels. J Endod. 2005 Nov;31(11):791-5.

AlShwaimi E, Berggreen E, Furusho H, Rossall JC, Dobeck J, Yoganathan S, et al. IL-17 receptor A signaling is protective in infection-stimulated periapical bone destruction. Immunol. 2013 Aug.

Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. Main features of human T helper cells. Ann N Y Acad Sci. 2013;1284:66-70.

Aranha AM, Repeke CE, Garlet TP, Vieira AE, Campanelli AP, Trombone AP et al. Evidence supporting a protective role for th9 and th22 cytokines in human and experimental periapical lesions. J Endod. 2013 Jan;39(1):83-7.

Ataoglu T, Ungor M, Serpek B, Haliloglu S, Ari H. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha levels in periapical exudates. Int Endod J. 2002 Feb; 35(2):181-5.

Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cells and mucosal host defense. Semin Immunol. 2007 Dec;19(6):377-82.

Awasthi A, Murugaiyan, G, Kuchroo, VK. Interplay between effector Th17 and regulatory T cells. J Clin Immunol 2008;28: 660-70.

Behfarnia P, Birang R, Pishva SS, Hakemi MG, Khorasani MM. Expression levels of Th-2 and Th-17 characteristic genes in healthy tissue versus periodontitis. (Tehran). 2013 Jan;10(1):23-31. Epub 2013 Jan 31.

Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localized to B cell follicles, and support immunoglobulin production. J Exp Med. 2000 Dec;192(11):1545-51.

[1] De acordo com estilo Vancouver

Chen JG, Xia JC, Liang XT, Pan K, Wang W, Lv L, et al Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients. Int J Biol Sci 2011; 7(1):53-56.

Colić M, Gazivoda D, Vucević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. Mol Immunol. 2009a Nov;47(1):101-13.

Colić M, Gazivoda D, Vucević D, Majstorović I, Vasilijić S, Rudolf R et al. Regulatory T-cells in periapical lesions. J Dent Res. 2009b;88(11):997-1002.

Colić M, Lukić A, Vucević D, Milosavljević P, Majstorović I, Marjanović M et al. Correlation between phenotypic characteristics of mononuclearcells isolated from human periapical lesions and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines. Arch Oral Biol. 2006 Dec;51(12):1120-30.

Colić M, Vasilijić S, Gazivoda D, Vucević D, Marjanović M, Lukić A. Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. Eur J Oral Sci. 2007 Aug;115(4):315-20.

Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are assential for mucosal host defense against oral candidiasis. Exp. Med. 2009 Feb;206(2):299-311.

de Carvalho Fraga CA, Alves LR, de Sousa AA, de Jesus SF, Vilela DN, Pereira CS, et al. Th1 and Th2-like protein balance in human inflammatory readicular cysts and periapical granulomas. J Endod. 2013 Apr;39(4):453-55.

De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Interferon-gamma, interleukin-10, Intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. J Endod. 2008 Jan;34(1):31-8.

De Sá, AR, Moreira PR, Xavier GM, Sampaio I, Kalapothakis E, Dutra WO et al. Association of CD4, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. Int Endod Journal. 2007 Jul;40:563-72.

Duan MC, Huang Y, Zhong XN, Tang HJ. Th17 cell enhances CD8 T-cell cytotoxicity via IL-21 production in emphysema mice. Mediators Inflamm. 2012;2012:898053.

Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. Immunol Rev. 2008 Dec;226:160-71.

Ferreira DC, Rôças IN, Paiva SSM, Carmo FL, Cavalcante FS, Rosado AS et al. Viral-bacterial associations in acute periapical abscesses. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011;112:264-71.

Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. Oral Microbiol Immunol. 2009;24:25-31.

Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. J Endod. 2007a Jun;33(6):643-451.

Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. J Endod. 2007b Jul;33(7):773-81.

Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. J Endod. 2011 Dec; 37(12):1659-62.

Huang GT, Do M, Wingard M, Park JS, Chugal N. Effect of interleukin-6 deficiency on the formation of periapical lesions after pulp exposure in mice. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001 Jul;92(1):83-8.

Ishigame H, Kakuta., Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y et al. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoephitelial bacterial infection and allergic responses. Immunity. 2009 Jan; 30:108-19.

Jäger A., Kuchroo VK. Effector and regulatory T-cells in autoimmunity and tissue inflammation. Scandinavian J Immunol 2010;72:173-84.

Jacobo P, Pérez CV, Theas MS, Guazzone VA, Lustig L. CD4+ and CD8+ T cells producing Th1 and Th17 cytokines are involved in the pathogenesis of autoimmune orchitis. Reproduction. 2011 Feb:141(2):249-58.

Khader SA, Gaffen SL, Kolls JK. Th17 cells at the cross roads of innate and adaptative immunity against infectious diseases at the mucosa. Mucosal Immunol. 2009 Sep;2(5):403-11.

Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. Altern Med Rev. 2003 Aug;8(3):223-46.

Kimura, A, Kishimoto, T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. Eur. J. Immunol.2010;40:1830-1835.

Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G as therapeutic Targets in human diseases. Pharmacological Reviews. 2010;62(4):726-59.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol. 2009;27:485-517.

Kotake S, Udagawa N, Takahash N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S et al. IL-17 in synovial fluis from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. J Clin Invest. 1999;103:1345-52.

Kurebayashi Y, Nagai S, Ikejiri A, Koyasu S. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. Genes Cells. 2013;18:247-65. DOI:10.111/gtc.12039.Epub 2013 Feb 5. Review.

Landini G. Color deconvolution using ImageJ. 2010. [Cited 2013 Abr 1]. Available from http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html

Lewis MA, Mac Farlane TW, McGowan DA. Quantitative bacteriology of acute dento-alveolar abscesses. J Med Microbiol. 1986;21:101-4.

Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4+T Cells: differentiation and functions. Clinical and Developmental Immunology. 2012; 2012:955135. DOI:10.1155/2012/925135. Epub 2012 Mar 14.

Marçal JR, Samuel RO, Fernandes D, de Araujo MS, Napimoga MH, Pereira AS, et al. T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. J Endod. 2010 Jun;36(6):995-9.

Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Sanches PF, Gomes BP. Clustering behavior on microbial communities from acute endodontic infections. J Endod. 2012 Feb;38(2):158-62.

Morimoto T, Yamasaki M, Nakata K, Tsuji M, Nakamura H. The expression of macrophage and neutrophil elastases in rat periradicular lesions. J Endod. 2008 Sept;34(9):1072-76.

Moser M, Leo O. Key concepts in immunology. Vaccine. 2010 Aug 31;28 Suppl 3:C2-13. Doi:10.1016/j.vaccine.2010.07.022.

Omoregie FO, Ojo MA, Saheeb B, Odukoya O. Periapical granuloma associated with extracted teeth. Niger J Clin Pract. 2011 Jul-Sep;14(3):293-306.

Oseko F, Yamamoto T, Akamatsu Y, Kanamura N, Iwakura Y, Imanishi J et al. IL-17 is involved in bone resorption in mouse periapical lesions. Microbiol Immunol 2009;53:287-94.

Piattelli A, Artese L, Rosini S, Quaranta M, Musiani P. Immune cells in periapical granuloma: morphological and immunohistochemical characterization. J Endod. 1991 Jan;17(1):26-9.

Radics T, Kiss C, Tar I, Márton IJ. Interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in apical periodontitis: correlation with clinical and histologic findings of the involved teeth. Oral Microbiol Immunol. 2003 Feb; 10(1):9-13.

Ramachandran Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996 Jan;81(1):93-102.

Ricucci D, Siqueira Jr JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalen ce and association with clinical and histopathologic findings. J Endod. 2010 Aug; 36(8):1277-88.

Ring M. História ilustrada da Odontologia. São Paulo:Manole, 1998. 1.ed. 318p.

Rôças, IN, Siqueira JF jr, Debelian GJ. Analysis os symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. J End. 2011 Sep;37(9):1206-12.

Sabeti M, Kermani V, Sabeti S, Simon JH. Significance of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in inducing cytokine expression. In periapical lesions. J Endod. 2012 Jan;38(1):47-50.

Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. Trends Immunol. 2011 Oct;32(10):452-60.

Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation an bone destruction. J Exp Med. 2006;203:2673-2682.

Schulz M, von Arx T, Altermatt HJ, Bosshardt D. Histology of periapical lesions obtained during apical surgery. J Endod. 2009 May;35(5):634-42.

Shah AC, Leong KK, Lee MK, Allareddy V. Outcomes of hospitalizations attributed to periapical abscess from 2000 to 2008: a longitudinal trend analysis. J Endod. 2013 Sep;39(9):1104-10.

Silva MJ, Kajiya M, AlShwaimi E, Sasaki H, Hong J, Ok P, et al. Bacteria-reactive immune response may induce RANKL-expressing T cells in the mouse periapical bone loss lesion. J Endod. 2012 Mar;38(3):346-50.

Siqueira Jr J. F., Roças I. N. Distinctive features of the microbiota associated with diferente forms of apical periodontitis. Journal of Oral Microbiol. 2009 Aug 10;1. DOI: 10.3402/jom.v1i0.2009

Teixeira-Salum TB, Rodrigues DBR, Gervásio AM, Souza CJA, Rodrigues V Jr, Loyola AM. Distintic Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. J Oral Pathol Med. 2010;39:250-56.

Voulgarelis M, Tzioufas A. Currents aspects of pathogenesis in Sjögren´s syndrome. Therapeutic Advances in Muscoskeletal Disease. 2010;2(6):325-34. DOI: 10.1177/1759720/10381431.

Walker KF, Lappin DF, Takahashi K, Hope J, Macdonald DG, Kinane DF. Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry. Eur J Oral Sci. 2000 Jun;108(3):195-201.

Wang H, Luo Z, Lei L, Sun Z, Zhou M, Dan H, et al. Interaction between oral lichen planus and chronic periodontitis with Th17-associated cytokines in serum. Inflammation. 2013 Jun;36(3):696-704. DOI: 10.1007/s10753-013-9594-2.

Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 Family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. Annu Rev Immunol 2007;25:821–52.

Xiong H, Wei L, Peng B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. J Endod. 2009 Feb;35(2):216-20.

Ysebrant de Lendonck L, Tonon S, Nguyen M, Vandevenne P, Welsby I, Martinet V, et al. Interferon regulatory factor 3 controls interleukin-17 expression in CD8 T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Aug; 110(34):E3189-97.

Zúñiga LA, Jain R, Haines C, Cua DJ. Th17 cell development: from the cradle to the grave. Immunol Rev. 2013;252:78-88.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão imuno-histoquímica da interleucina 17 em lesões periapicais
Pesquisador: Luciana Corrêa
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 12379913.3.0000.0075
Instituição Proponente: FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENT E TEC ODONTOLOGIA
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 206.324
Data da Relatoria: 22/02/2013

Apresentação do Projeto:
A partir de biópsias de granulomas periapicais, esta pesquisa pretende estudar uma nova classe de citocinas da famíla da interceulina 17 (IL-17)encontrada nesses processos infeciosos. Serão feitos testes imuno-histoquímicos para CD4 e CD8, para quantificar a população de linfócitos T, bem como de IL-17, para quantificar as células que expressam essa citocina, em biópsias de lesões de abscesso periapical (n=40) e granuloma periapical (n=40). Teste histoquímico (coloração de Leder) será feito para evidenciação de polimorfonucleares e posterior quantificação.

Objetivo da Pesquisa:
O objetivo deste trabalho é verificar a expressão da IL-17 em processo inflamatório causado por patógenos inespecíficos (abscesso e granuloma periapical), e verificar associação entre a quantidade de linfócitos CD4 e IL-17, bem como entre a quantidade de polimorfonucleares e IL-17.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Os riscos e benefícios foram bem avaliados. Serão utilizados materiais já coletados que estão em posse do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP. Existe o termo de seção desse material para a pesquisa. Os benefícios da pesquisa serão indiretos, constitui na possibiladade de conhecer essa nova classe de reação imunológica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
A pesquisa está bem estruturada, não há nada que possa ferir a ética em pesquisa.Serão utilizados

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

material de cujas biópsias tiveram diagnóstico de granuloma periapical (n=40) e abscesso (crônico) periapical (n=40) serão selecionados do acervo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP a partir dos seguintes critérios: presença de informações clínicas acerca de idade, tempo de duração e tamanho da lesão, local da lesão e presença de outras doenças associadas.
Lembro os pesquiadores que segundo Carta Circular nº. 039/2011/CONEP/CNS/GB/MS, de 30 de setembro de 2011,que cabe determinar o cumprimento do sigilo dos dados dos sujeitos de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Os termos de apresentação obrigatório: folha de rosto, autorização para o uso do material do acervo estão de acordo com as exigencias do Cep e cópia completa do projeto.
O projeto de pesquisa na integra e o preenchimento desta submissão estão de acordo.

Recomendações:
Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Recomendo a aprovação da pesquisa, pois não apresenta inadequações ou pendencias.
Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Considerações Finais a critério do CEP:
Projeto de pesquisa adequado para aprovação do CEP-FOUSP.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

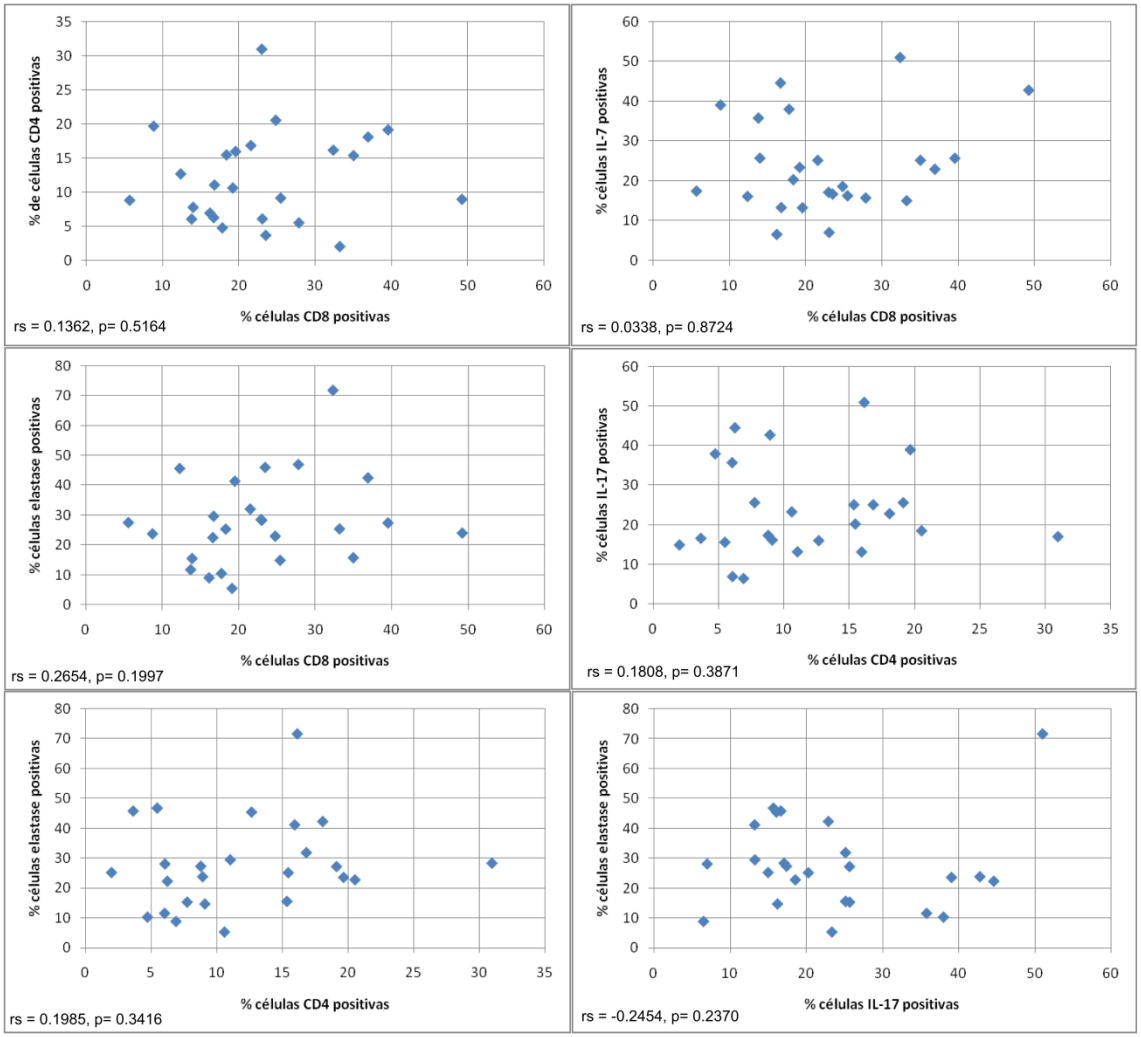
SAO PAULO, 26 de Fevereiro de 2013

Assinador por:
Marcia Turolla Wanderley
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

ANEXO B – Dispersão da porcentagem da área de marcação quando dos cruzamentos entre os anticorpos avaliados para os casos de abscesso periapical

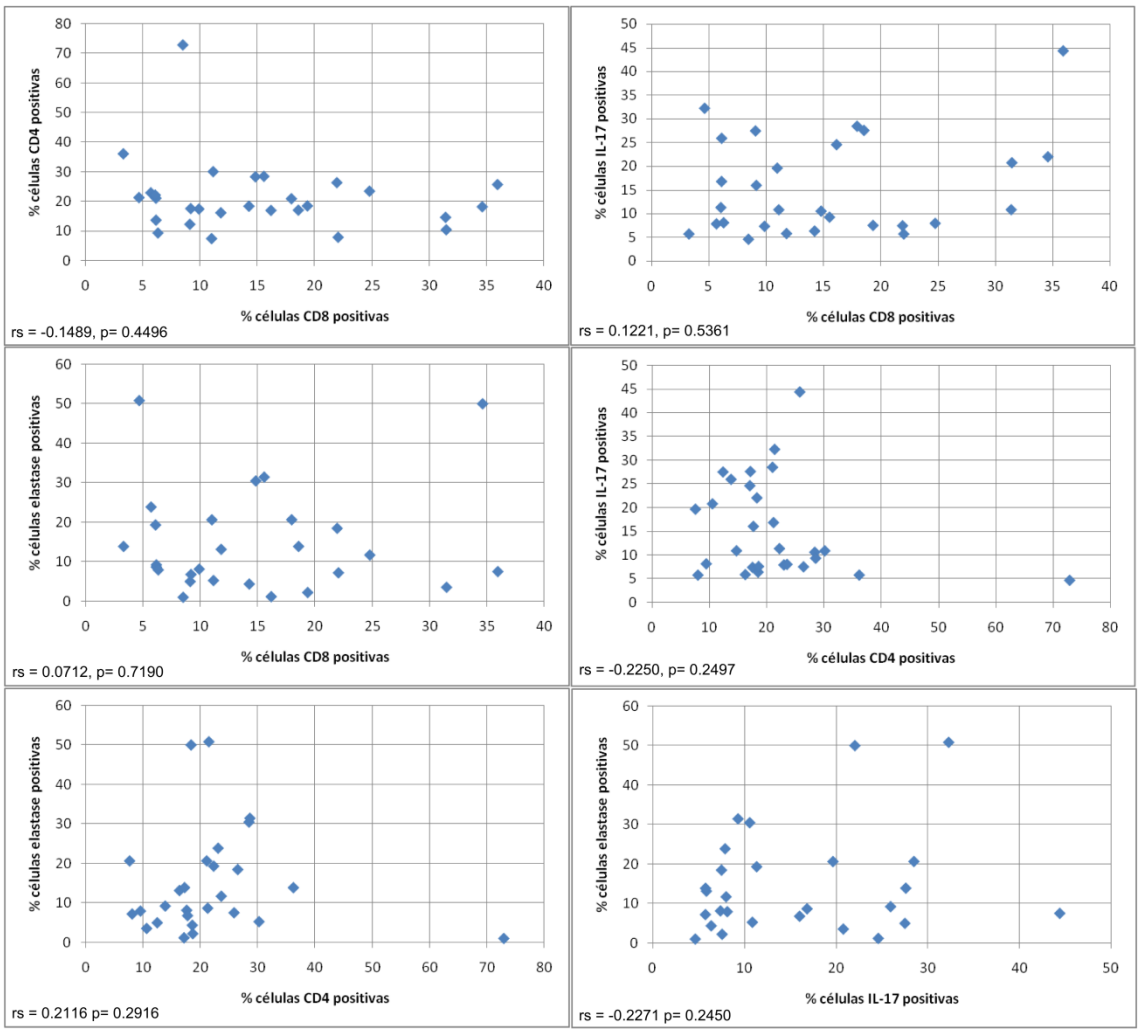
No anexo B, tem-se a dispersão dos dados ao se cruzarem entre si as porcentagens da área de marcação segundo os anticorpos avaliados para os casos de abscesso periapical. Em nenhum dos cruzamentos foi possível detectar correlação significativa pelo teste de correlação de Spearmann.



rs = coeficiente de Spearmann. Significante quando p<0,050.

ANEXO C – Dispersão da porcentagem da área de marcação quando dos cruzamentos entre os anticorpos avaliados para os casos de granuloma periapical

No anexo C, tem-se a dispersão dos dados ao se cruzarem entre si as porcentagens da área de marcação segundo os anticorpos avaliados para os casos de granuloma periapical. Em nenhum dos cruzamentos foi possível detectar correlação significativa pelo teste de correlação de Spearmann.



rs = coeficiente de Spearmann. Significante quando p<0,050.