UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

RONAN JACQUES REZENDE DELGADO

*Envolvimento de sinais coestimulatórios na
periodontite apical crônica em humanos*

BAURU
2011

RONAN JACQUES REZENDE DELGADO

*Envolvimento de sinais coestimulatórios na
periodontite apical crônica em humanos*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Bauru da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Odontológicas Aplicadas.

Área de Concentração: Endodontia
Orientador(a): Profa Dra Ana Paula Campanelli

Versão corrigida

BAURU
2011

D378a Delgado, Ronan Jacques Rezende
Envolvimento de sinais coestimulatórios na
periodontite apical crônica em humanos /
Ronan Jacques Rezende Delgado – Bauru, 2011.
122 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Campanelli

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data: 02/08/2011

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 111/2008
Data: 05/09/2008

Ronan Jacques Rezende Delgado

Dados Curriculares

Nascimento	02 de julho de 1978 Belo Horizonte - MG
Filiação	Romeu Jacques Delgado Maria do Rosário Rezende Delgado
1997 - 2001	Graduação em Odontologia pela Universidade Federal de Minas Gerais
2002 - 2002	Aperfeiçoamento em Endodontia pelo Centro de Odontologia Avançada de Belo Horizonte – MG
2003 - 2004	Especialização em Endodontia pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo
2005 - 2007	Mestrado em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo na área de Endodontia.
2007 - 2011	Doutorado em Ciências Odontológicas Aplicadas pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo na área de Endodontia.

DEDICATÓRIA

ADS MEUS QUERIDOS PAIS...

MARIA DO ROSÁRIO REZENDE DELGADO (IN MEMORIAM)

ROMEU JACQUES DELGADO (IN MEMORIAM)

Já procurei de várias maneiras tentar preencher o vazio que a ausência de vocês me provoca. É simplesmente inútil. Dizem que ninguém é insubstituível, mas o amor de pai e mãe certamente é. A maior lição que tiro disso tudo é que o maior bem que o ser humano pode ter são as lembranças. Em minha memória e em meu coração vocês vivem plenamente. Quando fecho os olhos e mergulho na lembrança de nosso passado em família, toda tristeza vai embora, toda dor se dissipa diante dos momentos felizes que vivemos juntos. É nas lembranças que me encontro, que busco minhas maiores referências e que recordo de onde vim e quem eu sou. Hoje, diante de mais uma conquista em minha vida, meu maior presente seria poder me voltar a vocês para agradecer por tudo de bom que fizeram por mim, pela educação, pelo carinho e pela confiança. Fisicamente isso não é possível, entretanto, eu fecho os olhos e me encontro com vocês em minhas lembranças. Nesse momento, viajo ao passado e lá, no calor de nossos momentos mais felizes, abraço vocês e digo:

Pai e Mãe, amo vocês e muito obrigado!

“Enquanto houver você do outro lado
Aqui do outro eu consigo me orientar
A cena repete a cena se inverte
enchendo a minha alma d'aquilo que outrora
eu deixei de acreditar

tua palavra, tua história
tua verdade fazendo escola
e tua ausência fazendo silêncio em todo lugar

metade de mim
agora é assim
de um lado a poesia o verbo a saudade
do outro a luta, a força e a coragem pra chegar no fim
e o fim é belo incerto... depende de como você vê
o novo, o credo, a fé que você deposita em você e só

Só enquanto eu respirar
Vou me lembrar de você”

O Anjo mais velho
O Teatro Mágico

“A SAUDADE É A NOSSA ALMA DIZENDO PARA ONDE ELA QUER VOLTAR”

“O QUE A MEMÓRIA AMA FICA ETERNO”

RUBEM ALVES

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À DEUS, agradeço pela saúde concedida ao longo desses anos, pré-requisito necessário para vencer qualquer desafio. Obrigado pela maravilhosa oportunidade de aprender a cada dia e pelas pessoas incríveis que estiveram comigo ao longo dessa longa jornada de pós-graduando. Agradeço, também, por me mostrar todos os dias o quanto toda esta caminhada fez enorme diferença em minha vida.

À KARINA, minha querida noiva, por estar incondicionalmente ao meu lado, por sua paciência, por respeitar e apoiar minhas decisões. Agradeço pelos momentos de alegria, carinho e refúgio. Conte sempre com meu amor, consideração e companhia. Retribuirei todo seu apoio e dedicação para a conclusão do seu Doutorado. Enfim, tudo estará no jeito certo de nós dois.

AO RONEI, meu querido irmão, pelo incentivo, por compreender meu sonho e minha ausência e por respeitar minhas decisões. Obrigado por sempre me receber de forma alegre e carinhosa. Conte sempre comigo, meu amigo!

Aos meus padrinhos, **JOSÉ REIS e DAGNA**, pelo carinho, atenção e pela disposição em ajudar sempre que preciso.

A minha orientadora, **Profª. Dra. ANA PAULA CAMPANELLI**, obrigado pela oportunidade de aprendizado, pela orientação objetiva, atenta e confiante na execução deste trabalho. Agradeço, também, por não ter sido apenas a orientadora, mas por ter sido a amiga disponível, que compreendia meus problemas, minhas limitações, minhas necessidades e prioridades. Saiba que seu apoio foi muito importante e decisivo em minha vida e agradeço imensamente pela acolhida carinhosa e atenciosa nos momentos mais difíceis. Sua dedicação, simplicidade, competência e doação pelos alunos certamente serão referências em minha vida. Muito obrigado por tudo e que Deus esteja sempre com você e sua família.

Ao **Prof. Dr. NORBERTI BERNARDINELLI**, agradeço pela oportunidade, de concretizar mais uma etapa profissional tão importante em minha vida. Obrigado pela confiança, amizade, cordialidade

AGRADECIMENTOS

com que sempre me tratou e pelo desprendimento por ter cedido a orientação à Profa. Ana. Agradeço também pelo interesse e preocupação com o andamento do estudo, pela disponibilidade em colaborar sempre que solicitado e pelo olhar atento desde os tempos de especialização e mestrado.

Ao **Prof. Dr. CLÓVIS MONTEIRO BRAMANTE** pelo exemplo de dedicação diária e extremada à carreira docente. Sua competência e credibilidade certamente são referências para seus alunos. Agradeço, em especial, pela oportunidade de coleta das lesões periapicais nas clínicas do curso de cirurgia paraendodôntica e de especialização da FOB/USP. Sua participação foi essencial para a conclusão deste estudo.

À **THAÍS HELENA GASPAROTO** por estar sempre disposta a ajudar incondicionalmente. Por estar sempre por perto, atenta e solicita a qualquer chamado. Sua dedicação extremada e competência diferenciada são admiráveis e são exemplos para seus alunos. Agradeço pela orientação e companhia durante a execução dos protocolos, por ter sempre ficado até o fim, por ter explicado a mesma coisa inúmeras vezes sem se queixar. Muitos fazem por esforço ou necessidade, mas poucos fazem por amor verdadeiro. Considero você uma pessoa privilegiada por ter encontrado sua vocação e por fazer o que realmente ama. Agradeço imensamente tudo que fez por mim, sem o seu apoio e dedicação absolutamente nada seria possível.

À **CLÁUDIA PINHEIRO**, pelo exemplo de organização, empenho e determinação para superar todas as dificuldades e desafios. Agradeço imensamente pela companhia nos momentos de dificuldade do estudo, por estar sempre disposta a me auxiliar nos experimentos, abrindo mão da convivência em família para estar presente no laboratório até altas horas da noite. Sem sua ajuda na preparação, execução e organização dos experimentos nada seria concluído. Obrigado por sempre cuidar dos meus experimentos como se fossem seus, agindo sempre com muita responsabilidade e respeito sem perder o bom humor.

Aos **PACIENTES** voluntários desta pesquisa por tornar este projeto real e viável. A contribuição de vocês foi valiosíssima. Obrigado pela doação, por contribuírem humildemente e sem esperar nada em troca.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos demais professores da disciplina de Endodontia pela oportunidade de trabalho e aprendizado concedidos ao longo destes anos. Certamente a convivência com vocês foi decisiva para meu aprimoramento profissional e pessoal. Agradeço ao **Prof. Dr. IVALDO GOMES DE MORAES** pela acolhida sempre amistosa, pela atenção, disponibilidade e pelo exemplo de humildade, correção e de amor à docência. Ao **Prof. Dr. ROBERTO BRANDÃO GARCIA** por sua imensa disponibilidade, interesse e preocupação com o bem estar de seus alunos. Sua simplicidade, cordialidade e polidez serão exemplos a serem seguidos em minha vida profissional. Ao **Prof. Dr. MARCO ANTÔNIO HÚNGARO DUARTE** pela disponibilidade em ajudar sempre que preciso, pela competência, objetividade e cordialidade. Agradeço, também, a **Prof. Dra. FLAVIANA BOMBARDA DE ANDRADE**.

Ao **Prof. Dr. GUSTAVO POMPERMAIER GARLET** pelo suporte na realização deste estudo, pela disponibilidade incondicional e pela ajuda na disciplina de fatores de crescimento e citocinas.

Ao **Prof. Dr. JOÃO SANTANA DA SILVA** pela colaboração permanente na execução deste estudo e de tantos outros do Departamento de Imunologia e Microbiologia da FOB.

Agradeço à **NEIDE LEANDRO, EDMAURO DE ANDRADE, SUELY BETTIO, PATRÍCIA LOPES e CLEIDE**, funcionários da disciplina de Endodontia, pela forma carinhosa e cordial com que sempre me trataram. Obrigado por se colocarem disponíveis para nos ajudar sempre que preciso.

Agradeço aos funcionários da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, **DALVA RIBEIRO DE OLIVEIRA, ANDRÉ LUIS DA SILVA, LÍVIA e EDILENE** pela maravilhosa acolhida recebida durante minha passagem pelo departamento. Agradeço pela atenção, disponibilidade e cordialidade que sempre tiveram comigo. Muito Obrigado!

À **CARLA RENATA SIPERT**, pela amizade e auxílio incondicional. Agradeço, especialmente, pela atenção e carinho nos momentos mais difíceis. Estarei sempre torcendo muito pelo seu sucesso e

AGRADECIMENTOS

felicidade. Obrigado pela atenção especial que teve comigo no início do Doutorado, quando tudo estava muito complicado.

Aos colegas da turma de Doutorado em Endodontia, **FERNANDO ACCORSI OROSCO, LÍVIA MARIA VIEIRA RODRIGUES** e **BETHÂNIA PINHEIRO** pela boa convivência que tivemos durante a maravilhosa oportunidade de aprendizado que dividimos juntos. Agradeço pelo desprendimento com que sempre me ajudaram nos momentos mais difíceis.

Aos colegas do departamento de Microbiologia e Imunologia **MICHELLE SABRINA, HAYANA, CARINE, EDUARDO BELAI, LUCAS** e **JULIANA** por sempre me tratarem com imenso carinho e atenção. Pelo respeito às minhas limitações e por sempre me ajudarem com muito empenho em tudo que fosse necessário. Acredito que todos somos privilegiados por participarmos de um ambiente de trabalho recheado de pessoas especiais.

Aos amigos do curso de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, **MARCELA CLAUDINO, LUCIANA REZENDE** e **ERICSON JANÓLIO** pela companhia, pelos momentos de diversão e por todo auxílio ao longo dessa jornada. Agradeço em especial à Marcela por toda ajuda na disciplina de fatores de crescimento e citocinas.

Ao **EDUARDO ALEIXO FIQUEIRA** e **VALÉRIA GELANI**, pessoas inteligentíssimas, extremamente capazes, alunos exemplares. Os trabalhos desenvolvidos por eles serviram de alicerce para este estudo.

Aos amigos da **PREFEITURA MUNICIPAL DE LOUVEIRA/SP** pela maravilhosa e engrandecedora convivência que temos em nossa rotina de trabalho. Agradeço por me receberem tão bem, pela paciência, carinho e cuidado. A alegria e leveza dessa turma fazem com que nossa rotina clínica tão puxada, seja agradável e divertida. Obrigado por tornar possível a realização de sonhos pessoais muito especiais.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos da **PREFEITURA MUNICIPAL DE JUNDIAÍ/SP** pelo carinho, atenção e respeito com que me receberam. Obrigado pela disponibilidade em ajudar sempre que preciso.

Aos amigos da **PREFEITURA MUNICIPAL DE NOVA LIMA/MG**, principalmente, pela ajuda no início do Doutorado, permitindo que eu fizesse um horário especial para conciliar com as Disciplinas e tolerando mudanças repentinas sem qualquer aviso prévio. Muito Obrigado!

Ao **Prof. LUIZ CARLOS FETOSA HENRIQUES** docente do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Agradeço por todo apoio, pela confiança e estima com que sempre me tratou. Agradeço pelos convites para participar do seu curso de Especialização, mas principalmente por sua amizade, por sempre ter acreditado em meu potencial e por despertar em mim o interesse pela docência.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU** da Universidade de São Paulo na pessoa do seu diretor, **Prof. Dr. JOSÉ CARLOS PEREIRA**.

À **COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO** da Faculdade de Odontologia de Bauru na pessoa de seu presidente, **Prof. Dr. PAULO CÉSAR RODRIGUES CONTI**.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio e concessão de recursos de reserva técnica e benefícios complementares tão importantes para a concretização deste projeto (Proc. 08/09973-3).

Aos **FUNCIÓNÁRIOS** da secretaria de Pós-Graduação que sempre ofereceram um suporte eficiente, paciente e fundamental aos alunos. A todos os demais funcionários da FOB, essenciais para a boa rotina do campus.

À **BIBLIOTECA** da Faculdade de Odontologia de Bauru pelo papel essencial que desempenha junto aos alunos, oferecendo todo suporte científico e um ambiente agradável para os estudos.

De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!

O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
Mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
Coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis

FERNANDO SABINO

RESUMO

As lesões periapicais são induzidas por uma infecção crônica da polpa dental. Antígenos microbianos estimulam a resposta imune específica e inespecífica nos tecidos apicais. Como consequência desse processo, diante da incapacidade das defesas do hospedeiro para erradicar a infecção, uma lesão periapical é formada, com o objetivo de restringir a invasão microbiana. O desenvolvimento da periodontite apical crônica depende de uma fina regulação da ativação dos linfócitos. A ativação das células T requer dois sinais, um mediado pelo complexo TCR, após o reconhecimento do antígeno, e o outro mediado pela interação dos receptores coestimulatórios. CD28 é um receptor coestimulatório, enquanto CTLA-4 e PD-1 induzem um sinal inibitório para a ativação de células T. Para compreender o envolvimento de células T na periodontite apical crônica, avaliamos a presença destas células na lesão periapical e os fatores coestimulatórios, citocinas e espécies reativas do oxigênio que estas células estariam produzindo. As amostras analisadas foram de tecido gengival para o grupo controle ($n = 20$) e lesões periapicais para o grupo com periodontite apical crônica ($n = 20$). Quanto ao perfil celular das lesões periapicais, os resultados mostraram que linfócitos T ($59,3 \pm 3,7\%$) foram as células predominantes, sendo a subpopulação $CD4^+$ ($72,7 \pm 3,4\%$) a mais encontrada. A seguir, verificou-se a expressão de moléculas de superfície em células T. Observou-se que a expressão de CD28 ($0,5 \pm 0,5\%$) foi significativamente mais baixa em amostras de lesões periapicais que no grupo controle principalmente para linfócito T $CD8^+$. Já CTLA-4 foi identificado em altos níveis para pacientes com periodontite apical tanto para $CD3^+CD4^+$ ($86,1 \pm 2,6\%$) quanto para $CD3^+CD8^+$ ($59,8 \pm 8,6\%$). PD-1 ($73,5 \pm 5,6\%$) e PD-L1 ($59,8 \pm 8,6\%$) apresentaram alta positividade para $CD3^+CD4^+$. Esses resultados indicaram um possível envolvimento da via de sinalização de PD-1 e PD-L1 na modulação da resposta de células T de pacientes com periodontite apical crônica. A dosagem de citocinas revelou alta positividade para todas as citocinas investigadas (TGF- β ; TNF- α ; IFN- γ e IL-10). Óxido Nítrico e mieloperoxidase produzidas por neutrófilos e responsáveis pela degradação tecidual também foram detectadas em altas doses nas amostras de pacientes com periodontite apical. O conhecimento sobre o papel das moléculas coestimulatórias na imunopatogênese da periodontite apical crônica servirá de base para o direcionamento de novas estratégias de prevenção, assim como o desenvolvimento de novos procedimentos terapêuticos.

Palavras Chaves: Periodontite apical crônica, imunidade celular, citocinas, linfócitos T.

ABSTRACT

Periapical lesions are induced by the chronic infection of dental pulp. Microbial antigens stimulate both non-specific and specific immune response in periapical tissue. As a consequence of these processes and the inability of host defense mechanisms to eradicate infection, chronic periapical lesions are formed, with the aim of restricting microbial invasion. Negative co-stimulatory signals mediated via cell surface molecules such as cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and programmed death-1 (PD-1) play a critical role in down-modulation immune responses and maintaining peripheral tolerance. Both CTLA-4 and PD-1 are induced on activated T cell, and these are involved in the immunopathogenesis of periapical lesions. Inhibitory signals mediated via molecules such as programmed-death-1 (PD-1) play a critical role in down-modulating immune responses and maintaining peripheral tolerance. We investigated the involvement of cytokines and PD-1 engagement in mediating the T cell activation in chronic periapical diseases. Gingival samples from healthy individuals ($n=20$) and patients with chronic periapical periodontitis ($n=20$) were collected and used for the subsequent assays. The leukocytes in the lesion site were evaluated using flow cytometry. The production of cytokines interferon-gamma (IFN- γ), interleukin (IL)-10, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and transforming growth factor-beta (TGF- β) was evaluated by ELISA. We observed a significant increase in the total number of leukocytes from periapical lesions as compared with healthy group. Our results for the composition of infiltrating cell in periapical lesion showed that the predominant cells were lymphocytes T ($59,3 \pm 3,7\%$) and contained a higher proportion of CD4 $^{+}$ cells ($72,7 \pm 3,4\%$). T cells from patients with periapical lesions expressed significantly higher levels of PD-1 ($73,5 \pm 5,6\%$) and PD-L1 ($59,8 \pm 8,6\%$). The levels of CTLA-4 were higher in CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ ($86,1 \pm 2,6\%$) and CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ ($59,8 \pm 8,6\%$) cells, but in contrast the expression of CD28 was lower than control group. In addition, CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells expressing PD-1 accumulate in lesions with chronic periapical periodontitis. Moreover, PD-L1 expression was intense in macrophage from patients. Our data clearly showed that lesions samples contained elevated amounts of TGF- β , IL-10, TNF- α and IFN- γ when compared with healthy gingival tissue from control individuals. These data show that PD-1 and CTLA-4 engagement could be involved in the modulation of T cells activation in patients with chronic periapical periodontitis.

Key words: Cytokine(s), Host response, Immunology, Chronic Periapical Periodontitis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Caracterização fenotípica de leucócitos na periodontite apical crônica.....	78
FIGURA 2 - Expressão de moléculas de superfície em linfócitos na periodontite apical crônica.....	80
FIGURA 3 - Expressão de PD-1 e PD-L1 em linfócitos na periodontite apical crônica.....	82
FIGURA 4 - Citocinas presentes nas amostras de pacientes com periodontite apical crônica.....	84
FIGURA 5 - Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio presentes nas amostras de pacientes com periodontite apical crônica.....	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Perfil clínico dos pacientes participantes do estudo.....72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% = por cento

± = mais ou menos

°C = graus Celsius

Apcs = células apresentadoras de antígenos

bNOS = óxido nítrico sintetase neuronal

BSA = bovine serum albumin (albumina bovina sérica)

CD = agrupamento de diferenciação (cluster of differentiation)

cm = centímetro

CO₂ = dióxido de carbono

EDTA = ácido etileno diamino tetracético

ELAM-1= endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (molécula de adesão endotelial de leucócitos -1)

ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay

eNOS = óxido nítrico sintetase endotelial

et al = e colaboradores

Fc= fragmento constante

FITC = fluoresceína isoticianato

FOB = Faculdade de Odontologia de Bauru

g = gramas

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

ICAM -1 = inter-cellular adhesion molecule 1 (molécula de adesão intercelular-1)

ICOS = (coestimulador que pode ser induzido)

IFN-γ = interferon gama

Ig = Imunoglobulina

IL = interleucina

iNOS = óxido nítrico induzível

LPS = lipopolissacarídeo

µg/mL = micrograma por mililitro

µL = microlitro

µM = Micromol

LISTA DE ABREVIATURAS

Mg/L= miligrama por litro

MHC = complexo principal de histocompatibilidade

MMP = metaloproteinase

MPO = mieloperoxidase

n = número

nm = nanômetro

NK = natural killer

NO = óxido nítrico

NOS = óxido nítrico sintetase

O₂ = oxigênio

ONOO⁻ = peroxinitrito

P = nível de significância, probabilidade

PBS = phosphate buffer saline (tampão fosfato-salina)

PCR = polymerase chain reaction (reação em cadeia polimerase)

PD-1 = programmed death 1 (morte programada-1)

PD-1^{-/-} = deficiente para PD-1

PD-L1 = programmed death ligand-1 (ligante de PD-1)

PE = ficoeritrina

pg = picograma

pH = potencial de hidrogênio iônico

PMNs = polimorfonucleares

RNA = ácido ribonucléico

RPMI = Roswell Park Memorial Institute

TCR = receptor de célula T

TGF- α = fator de crescimento tumoral alpha

TGF- β = fator de crescimento tumoral beta

Th = T helper (T auxiliar)

TLR = Toll like receptor (receptor do tipo Toll)

TNF- α = tumoral necrosis factor alpha (fator de necrose tumoral alfa)

USP = Universidade de São Paulo

Xg = vezes o valor da gravidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	37
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	45
2.1 Periodontite apical crônica.....	48
2.1.1 Granuloma periapical.....	48
2.1.2 Cisto periapical.....	50
2.2 Modulação da resposta imune na periodontite apical crônica.....	53
3 PROPOSIÇÃO.....	65
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	69
4.1 Seleção de pacientes.....	71
4.2 Captação das amostras.....	72
4.3 Processamento laboratorial das biópsias.....	72
4.4 Fenotipagem pela análise da expressão de moléculas de superfície.....	73
4.5 Dosagem de citocinas.....	73
4.6 Dosagem de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio.....	74
4.7 Análise estatística.....	74
5 RESULTADOS.....	75
5.1 Caracterização fenotípica de leucócitos na periodontite apical crônica.....	77
5.2 Expressão de moléculas de superfície em linfócitos T na periodontite apical crônica.....	79
5.3 Expressão de PD-1 e PDL-1 na periodontite apical crônica.....	81
5.4 Detecção dos níveis de citocinas na periodontite apical crônica.....	83
5.5 Avaliação da presença de MPO e NO na periodontite apical crônica.....	83
6 DISCUSSÃO.....	87
7 CONCLUSÃO.....	97
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	101

1 Introdução

1. INTRODUÇÃO

As patologias pulpares e perirradiculares são usualmente de natureza inflamatória e de etiologia microbiana. A infecção do tecido pulpar como consequência de cárie ou trauma induz uma resposta inflamatória, que, não sendo tratada, determina a necrose da polpa com consequente contaminação do sistema de canais radiculares, túbulos dentinários e infecção do periodonto apical. A evolução desse evento provoca a migração, ativação e a interação coordenada de células imunocompetentes, caracterizando a periodontite apical. Essa reação de defesa do periodonto frente à persistência dos agentes irritantes contidos no sistema de canais radiculares infectado, determina a cronificação da periodontite apical e, com decorrer do tempo, a reabsorção dos tecidos paraendodônticos apicais, caracterizando um processo patológico denominado periodontite apical crônica (MÁRTON; KISS, 2000).

Embora a relevância dos micro-organismos na etiopatogenia da periodontite apical crônica tenha sido claramente comprovada (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965) tem-se mostrado que a amplificação e progressão desse processo são dependentes da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro frente às bactérias e seus produtos (TENG, 2003, GEMMELL; SEYMOUR, 2004). Mesmo que tal resposta proteja o hospedeiro da invasão microbiana, a inacessibilidade dos leucócitos e de fatores antimicrobianos aos micro-organismos no sistema de canais radiculares, somada a sua organização na forma de biofilme na região apical, prejudicam a completa eliminação dos agentes infecciosos (LEONARDO et al., 2002, FABRICIUS et al., 2006, ROCHA et al., 2008). A interação dinâmica entre fatores microbianos e de defesa do hospedeiro na interface entre a polpa radicular infectada e o ligamento periodontal, resulta em inflamação local, reabsorção de tecidos mineralizados e destruição de outras estruturas periapicais caracterizando a lesão periapical (NAIR, 2004).

O tratamento endodôntico radical é a principal terapia de eleição para o tratamento da periodontite apical crônica e tem como objetivo a máxima eliminação da infecção instalada no sistema de canais radiculares e a prevenção da introdução de novos micro-organismos durante e após o tratamento. O controle da infecção no canal radicular propicia um ambiente favorável ao reparo das lesões periapicais, enquanto a persistência de micro-organismos exerce um papel relevante nas falhas do tratamento endodôntico (SJÖGREN et al., 1997, FABRICIUS et al., 2006, RICUCCI; LIN; SPANGBERG, 2009). A taxa estimada de sucesso clínico-radiográfico do tratamento de canais radiculares convencional varia de 64 a 85% dos casos

(SATHORN; PARASHOS; MESSER, 2005, NG et al., 2007, WU; SHEMESH; WESSELLINK, 2009). Essa taxa de sucesso é menor nos dentes com periodontite apical crônica, quando comparando aos dentes com vitalidade pulpar, indicando que dentes com lesão periapical impõem maior desafio para alcance do êxito na terapia endodôntica (KOJIMA et al., 2004, NG et al., 2008).

As lesões inflamatórias periapicais crônicas são classificadas, pela maioria dos autores, em granuloma periapical e cisto radicular ou cisto periodontal apical (SHAFFER; HINE; LEVY, 1983, COHEN; BURNS, 1994). Ambas as patologias, representam dois estágios de desenvolvimento de um mesmo processo inflamatório. Os fatores que determinam a transformação cística de granulomas, bem como o mecanismo envolvido para sua formação, ainda são controversos (PALOSSARI et al., 2003). Os granulomas periapicais e cistos radiculares estão entre as lesões mais frequentemente encontradas na cavidade bucal (NAIR; PAJAROLA; SCHROEDER, 1996, SATORRES et al., 2001). Diversos estudos que procuraram caracterizar o infiltrado inflamatório presente nas lesões periapicais demonstraram que, em geral, o infiltrado inflamatório é predominantemente crônico constituído de células mononucleares, principalmente linfócitos, plasmócitos e macrófagos (TAKAHASHI, 1998, MÁRTON; KISS, 2000). Polimorfonucleares neutrófilos também podem ser encontrados, assim como mastócitos e eosinófilos (YU; STASHENKO, 1987, PIATTELLI et al., 1991, MÁRTON; KISS, 1993). Portanto, há grande variação qualitativa e quantitativa no infiltrado inflamatório dessas lesões (LIAPATAS; NAKOU; RONTOGIANNI, 2003).

O granuloma periapical é a patologia dos tecidos perirradiculares mais comumente encontrada sendo ricamente celularizados e circundados por uma cápsula fibrosa (NAIR et al., 1996). O infiltrado inflamatório é caracterizado pela predominância de macrófagos, seguidos, em ordem decrescente, por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos. Mastócitos também podem ser encontrados. Entre os linfócitos, há um maior registro de linfócitos T em relação ao B. STASHENKO e YU verificaram, em 1989, a presença de linfócitos T $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ em lesões periapicais e observaram que nos períodos de atividade lítica da lesão, os linfócitos T $CD4^{+}$ predominavam. Nas fases de paralisação do crescimento da lesão, os linfócitos T $CD8^{+}$ estavam em maior número. No granuloma, observa-se a reabsorção do osso alveolar apical e a substituição por tecido granulomatoso, constituído basicamente por células imunocompetentes e de componentes do processo de reparação tecidual, como fibroblastos, fibras nervosas e vasos

sanguíneos neoformados. Assim, o processo reabsortivo cria um espaço capaz de comportar um maior número de células inflamatórias na região adjacente ao forame apical, visando impedir a disseminação da infecção para o tecido ósseo e o restante do organismo. Isto permite o estabelecimento de um equilíbrio entre a agressão e a defesa. Na periferia deste tecido granulomatoso, ocorre uma deposição de fibras colágenas, que encapsula a lesão. A reabsorção radicular também pode ocorrer, não necessariamente passível de visualização radiográfica. O granuloma periapical reflete uma lesão inflamatória crônica, granulomatosa, de longa duração, com caráter predominantemente proliferativo e induzida por agentes agressores de origem bacteriana advindos do canal radicular (SIQUEIRA; LOPES, 2004).

A origem do cisto periodontal apical está no granuloma apical, a partir de seu componente epitelial derivado dos restos epiteliais de Malassez. As células epiteliais estimuladas pela reação inflamatória instalada entram em proliferação, invadindo a estrutura do granuloma periapical, aumentando, gradativamente, a massa de tecido epitelial e formando, concomitantemente, a micro cavitação cística. O cisto periodontal apical apresenta, radiograficamente, uma área radiolúcida uniforme, arredondada ou oval, bem definida e, em grande número de vezes, circundada por halo radiopaco, fruto da esclerose óssea reacional que envolve o processo. Os cistos periapicais são caracterizados como uma lesão inflamatória de crescimento não invasivo, que apresenta uma cavidade preenchida por material fluido ou semifluido revestida por epitélio pavimentoso estratificado e suportada por uma cápsula de tecido conjuntivo compatível com granuloma e fibrose superficial (PIATELLI et al., 1991, MÁRTON; KISS, 2000).

Na formação, desenvolvimento e perpetuação da periodontite apical, a cooperação entre subpopulações funcionais e fenotipicamente diferentes de linfócitos T, resulta em um balanço equilibrado de processos de proteção e de destruição tecidual (TAKAHASHI, 1998, MÁRTON; KISS, 2000). Uma das possíveis vias de regulação da resposta inflamatória na periodontite apical crônica seria a produção de citocinas pelas diferentes subpopulações de linfócitos T auxiliares (Th), que atuariam atenuando ou potencializando a reação inflamatória nos tecidos periodontais e dessa forma, determinando a atividade ou latência da periodontite apical crônica (TENG, 2003, YAMAZAKI; YOSHIE; SEYMOUR, 2003, GEMMELL; SEYMOUR, 2004). Fica evidente, portanto, o papel central dos linfócitos e seus produtos de secreção no desenvolvimento das periapicopatias crônicas. As respostas mediadas por linfócitos Th podem exibir um padrão Th1,

que consiste predominantemente de uma resposta imune celular e pró-inflamatória, ou um padrão do tipo Th2, com características anti-inflamatórias e de resposta imune predominantemente humoral (BAKER et al., 2001, BERGLUNDH; LILJENBERG; LINDHE, 2002).

Para que ocorra a ativação das células T é necessário, inicialmente, o reconhecimento do antígeno específico pela interação do receptor de células T (TCR) com o MHC presente na superfície de células apresentadoras de antígenos e a transdução de um segundo sinal via moléculas coestimulatórias (GAUSE et al., 1997, CARRENO; COLLINS, 2002, CUTLER; JOTWANI, 2004). CD28 é o principal receptor coestimulatório presente na superfície de células T, sendo expresso constitutivamente. CTLA-4, um homólogo do CD28, é expresso apenas em células T ativadas e, diferente de CD28, é um regulador negativo da ativação de células T (DUBEY et al., 1996, WATERHOUSE et al., 1996). Outra molécula coestimulatória recentemente estudada é ICOS expressa em células T rapidamente após a ligação TCR-MHC. Considera-se que a co-estimulação inicial do CD28 é importante para a produção de IL-2 pelas células T naïve e ICOS estaria sustentando a ativação e diferenciação celular (FREEMAN; SHARPE, 2002). PD-1 é uma molécula expressa por células T CD4⁺ e CD8⁺, linfócitos B e monócitos ativados, não sendo encontrada em células não estimuladas. O principal papel de PD-1 no sistema imune é a manutenção da tolerância periférica. Após a interação com seus ligantes, mediada pelo TCR, inibe a proliferação e produção de citocinas pelas células T previamente ativadas (AGATA et al., 1996, CARTER et al., 2002, GREENWALD et al., 2005). Pouco é conhecido a respeito da importância das moléculas coestimulatórias CD28, CTLA-4 e PD-1 na resposta imune durante o desenvolvimento de periapicopatias. Para compreender o envolvimento de células T na progressão da periodontite apical crônica torna-se necessário avaliar a presença destas células no foco da infecção, as possíveis variações quanto ao seu perfil de ativação, bem como os fatores que estas células estariam produzindo.

Outro aspecto importante para maior elucidação da modulação da resposta imune na periodontite apical crônica é a compreensão do papel das citocinas presentes nas lesões periapicais. As citocinas são proteínas secretadas pelas células imunocompetentes e que medeiam muitas das funções celulares. São produzidas em resposta a micro-organismos e outros antígenos, e diferentes citocinas estimulam respostas diversas das células envolvidas na imunidade e inflamação. Uma das possíveis vias de regulação da resposta inflamatória na periodontite apical

seria a produção de citocinas pelas diferentes subpopulações de linfócitos T auxiliares (Th), que atuariam atenuando ou potencializando a reação inflamatória nos tecidos periodontais e desta forma, determinando a atividade ou latência da lesão periapical (HREN;IHAN, 2009). Estudos anteriores que avaliaram a expressão de citocinas nas lesões periapicais demonstraram que linfócitos Th1 produzem IL-2, IFN- γ , TNF- β e linfócitos Th2 expressam IL-4, IL-5 e IL-10 (LIAPATAS et al., 2003, TEIXEIRA-SALUM et al., 2010). Além do papel essencial na regulação da resposta imune, as citocinas e espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, como óxido nítrico (NO) e mieloperoxidase (MPO), podem estar implicadas com a destruição tecidual observada na periodontite apical crônica. Algumas citocinas como IL-1, TNF- α estimulam a reabsorção óssea, promovendo a remodelação do tecido ósseo. NO, associado a citocinas (TNF- α , IL-1 e IFN- γ), está implicado no processo de reabsorção óssea verificado em diversas doenças como artrite reumatóide, osteoartrite e periodontites (CHAE et al., 1997).

Considerando que sinais coestimulatórios têm um efeito relevante sobre a atividade e função das células T e que o papel desses sinais tem sido pouco estudado nas periodontites apicais crônicas, o estudo do efeito modulador de moléculas coestimulatórias sobre a ativação de células T poderia trazer uma importante contribuição para o entendimento da resposta inflamatória nas lesões periapicais.

2 Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

As lesões periapicais são patologias frequentes no complexo maxilofacial e são resultantes da contaminação e necrose da polpa dental e progressão da infecção em direção ao ligamento periodontal e osso alveolar. A interação do número de micro-organismos presentes no interior dos canais radiculares, o grau de virulência destes micro-organismos e a defesa orgânica do indivíduo determinam a ocorrência de diferentes tipos de alterações periapicais que podem variar entre abscessos, granulomas e cistos periapicais (ØRSTAVIK; PITT-FORD, 1998, LEONARDO, 2008).

As bactérias desempenham um papel fundamental na etiopatogenia das alterações periapicais (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965, MÖLLER et al., 1981, TAKAHASHI, 1998). O tratamento endodôntico tem como principal objetivo a máxima eliminação de bactérias do sistema de canais radiculares. A eliminação da infecção do canal radicular propicia um ambiente favorável ao reparo das lesões periapicais, enquanto a persistência de micro-organismos exerce um papel significativo nas falhas do tratamento endodôntico (SJÖGREN et al., 1997).

Na maioria dos casos em que o tratamento endodôntico fracassa, o insucesso ocorre devido a procedimentos insatisfatórios de controle e eliminação da infecção (NAIR et al., 1999). Problemas comuns que podem levar ao fracasso da terapia endodôntica incluem a falta de controle asséptico durante o tratamento, acesso incorreto à cavidade pulpar, canais não detectados, falhas na instrumentação, obturações inadequadas, e restaurações coronárias insatisfatórias ou ausentes após o tratamento endodôntico (CHEUNG, 1996).

O insucesso do tratamento endodôntico é determinado clinicamente baseado em acompanhamento radiográfico através da avaliação do surgimento, persistência ou aumento de uma lesão periapical; e em sinais e sintomas do dente tratado endodonticamente (STRINDBERG, 1956). Para resolução dos casos de insucesso existem duas modalidades de tratamento: o retratamento endodôntico e a cirurgia apical. O retratamento endodôntico é, de acordo com a maioria dos autores, o tratamento de primeira escolha, porém a cirurgia paraendodôntica consiste em um tratamento adicional nos casos em que o tratamento fracassou ou não foi possível de ser realizado (SIQUEIRA; LOPES; 2004).

As alterações patológicas no periodonto apical estão associadas às respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro com o intuito de conter o avanço da infecção endodôntica. A ocorrência de dano aos tecidos perirradiculares é resultado do efeito direto e indireto das bactérias. A destruição tecidual causada pelas defesas do hospedeiro em resposta a uma agressão persistente parece ser mais significativa do que os próprios efeitos diretos proporcionados pelos micro-organismos, embora estes sejam os principais agentes desencadeadores de todo o processo. A interação dinâmica entre fatores microbianos e de defesa do hospedeiro na interface entre a polpa radicular infectada e o ligamento periodontal, resulta em inflamação local, reabsorção de tecidos mineralizados e destruição de outras estruturas periapicais caracterizando a lesão periapical (MÁRTON; KISS, 2000).

Quando a resposta inflamatória associada à periodontite apical aguda é eficaz na redução da intensidade da agressão, a resposta cronifica. Células imunocompetentes, como linfócitos, plasmócitos e macrófagos, são atraídas para a região afetada. Isto representa o início de uma resposta imunológica adaptativa, de caráter específico denominada periodontite apical crônica. É imperioso ressaltar que, se o agente agressor for inicialmente de baixa intensidade, a inflamação crônica no ligamento periodontal se estabelece sem ser precedida necessariamente por uma resposta inflamatória aguda (SIQUEIRA; LOPES; 2004).

As lesões periapicais crônicas são classificadas, pela maioria dos autores, em granuloma periapical e cisto radicular e estão entre as lesões mais frequentemente encontradas na cavidade bucal (SHAFFER; HINE; LEVY, 1983, COHEN; BURNS, 1994, CONSOLARO; RIBEIRO, 1998, SATORRES et al., 2001).

2.1 Periodontites Apicais Crônicas

2.1.1 Granuloma Periapical

O termo granuloma periapical refere-se a uma massa de tecido de granulação cronicamente inflamado, no ápice de um dente não vital. Esta denominação, comumente utilizada, não é totalmente correta, pois a lesão não demonstra, microscopicamente, uma inflamação granulomatosa verdadeira (NEVILLE et al., 1998). Na formação do granuloma

periapical, representado principalmente por macrófagos, linfócitos e plasmócitos, estão envolvidos fenômenos imunopatológicos, especialmente relacionados à hipersensibilidade celular em resposta ao poder imunogênico do agente agressor. Na ausência desta condição, o granuloma é dito do tipo corpo estranho, fato observado no extravasamento de alguns cimentos, pastas obturadoras e guta-percha (NAIR et al., 1990, CONSOLARO; RIBEIRO, 1998).

No granuloma periapical tem-se como principal elemento caracterizador a presença de eventos morfológicos e imunopatológicos de uma lesão inflamatória crônica granulomatosa, de longa duração, com caráter predominantemente proliferativo e induzido por agentes agressores de origem bacteriana advindos do canal radicular. Sua finalidade está relacionada com a localização e delimitação dos agentes agressores aos limites do periápice, revelando a persistência do agente agressor no local, provocando a ocorrência de fenômenos imunopatológicos específicos importantes na manutenção da periodontite apical crônica como a presença constante de células imunocompetentes, de imunoglobulinas, de componentes do complemento, bem como de inúmeros mediadores químicos incluindo citocinas e fatores de crescimento (MÁRTON; KISS, 2000).

Os granulomas periapicais podem se originar após a estabilização de um abscesso periapical ou desenvolver-se como uma alteração periapical inicial. Estas lesões não são estáticas e podem se transformar em cistos radiculares ou desenvolver exacerbações agudas com a formação de abscessos (PAIVA; ANTONIAZZI, 1988).

A maioria dos granulomas é assintomática, e o dente envolvido, caracteristicamente, não apresenta mobilidade ou sensibilidade significativa à percussão. O tecido mole que recobre a região periapical pode ou não estar sensível e o elemento dental envolvido não responde aos testes pulpares térmicos ou elétricos. Os granulomas apresentam incidência em torno de 75% das periodontites apicais (SOUZA; PINTO; FREITAS, 1985, LEDESMA-MONTES; HERNÁNDEZ-GUERRERO; GARCÉS-ORTIZ, 2000, SATORRES et al., 2001).

Grande parte dos granulomas periapicais são descobertos durante exames radiográficos de rotina. Inicialmente, observa-se um espessamento do ligamento periodontal. Com a proliferação do tecido de granulação e a concomitante reabsorção óssea, a lesão aparece como uma área radiolúcida ligada ao ápice radicular, de tamanho variável, podendo ser bem circunscrita por uma linha radiopaca ou difusa, sem limites precisos com o osso circunjacente. A reabsorção radicular não é incomum. Embora as lesões maiores do que 2 cm de diâmetro representem muitas vezes

cistos radiculares, vários pesquisadores não têm sido capazes de diferenciar granulomas periapicais de cistos periapicais, tomando como base somente o tamanho e o aspecto radiográfico (NAIR et al., 1996, ROCHA et al., 1998).

Histologicamente, os granulomas periapicais consistem em um tecido de granulação inflamado, circundado por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso. O tecido de granulação apresenta um infiltrado linfocitário denso variável, frequentemente mesclado com poucos neutrófilos, plasmócitos, macrófagos e, menos frequentemente, mastócitos e eosinófilos. Podem estar presentes corpúsculos de Russell. Restos epiteliais de Malassez podem ser identificados no tecido de granulação. Coleções de cristais de colesterol com células gigantes multinucleadas associadas e áreas de extravasamento de hemácias com pigmentação por hemossiderina podem estar presentes (KUC; PETERS; PAN, 2000, SINAN et al., 2002).

O tratamento centraliza-se na redução e eliminação dos micro-organismos agressores. Se o elemento dental puder ser preservado, o tratamento endodôntico deve ser realizado. Os elementos dentais sem possibilidade de serem restaurados devem ser extraídos, seguidos pela curetagem de todo o tecido de granulação periapical (SIQUEIRA; LOPES; 2004).

Nos relatos dos autores consultados, os cistos e granulomas periapicais, têm o comportamento biológico e os achados radiográficos muito semelhantes, por isso justifica a colheita do material em determinados tipos de tratamento, como por exemplo, nas exodontias seguidas por curetagem e nas apicetomias para análise anátomo-patológica, para estabelecer o correto diagnóstico entre ambas.

2.1.2 Cistos Periapicais

Os cistos periapicais também denominados de cistos radiculares, perirradiculares ou periodontais apicais são cistos inflamatórios dos ossos maxilares formados nos ápices de dentes com polpas necróticas e infectadas, sendo considerados sequelas diretas dos granulomas periapicais, embora nem todo granuloma torne-se um cisto durante o seu desenvolvimento (FIGUEIREDO et al. 1999).

A transformação cística ocorre por estimulação dos restos epiteliais de Malassez presentes no ligamento periodontal, que passam a proliferar em decorrência de estímulos inflamatórios na região periapical. Esses estímulos são promovidos pelas bactérias e seus produtos presentes no

canal radicular e periápice e que acionam os mecanismos de defesa do hospedeiro (TORABINEJAD; KETTERING, 1985, BARKHORDAR; SOUZA, 1988). As células epiteliais em proliferação invadem a estrutura do granuloma periapical, aumentando, progressivamente, a massa de tecido epitelial e formando, concomitantemente, a microcavitação cística, cujo mecanismo está fundamentado em diversas teorias (MÁRTON; KISS, 2000, PALOSSAARI et al., 2003). As condições indutoras para provocar a proliferação epitelial dependem da diminuição da tensão de oxigênio, aumento da tensão de gás carbônico, associados a uma redução do pH. Estabelecida a fase iniciação da cavitação cística, o cisto periapical apresenta crescimento contínuo e lento, provocado pela pressão hidrostática intracavitária, que se enriquece de líquido gradativamente à custa da pressão oncótica do líquido cístico (GUIMARÃES, 1982).

O cisto periapical, como todo processo crônico, é caracterizado pela participação da resposta imunológica adaptativa de caráter específico. A formação cística ocorre assim que o epitélio prolifera para ajudar a separar o estímulo inflamatório do osso ao seu redor. A decomposição de restos celulares dentro da luz dos cistos aumenta a concentração de proteínas, produzindo uma pressão osmótica maior, resultando no transporte de fluidos através do revestimento epitelial para o lúmen da cavidade cística. A passagem do fluido ajuda no crescimento do cisto externamente. Com a reabsorção osteoclástica do osso, o cisto se expande. Outros fatores de reabsorção óssea, como as prostaglandinas, interleucinas e proteinases, provenientes das células inflamatórias e células da lesão, também permitem o aumento do cisto (SIQUEIRA; LOPES, 1999, RAITZ et al., 2000).

Embora o sistema imune disponha de mecanismos para eliminar as células epiteliais em proliferação nos cistos radiculares, elas continuam a se multiplicar em razão da manutenção do fator etiológico, ou seja, da infecção endodôntica que determina as reações imunológicas. Entretanto, quando a fonte de irritação é removida, através de tratamento endodôntico, a proliferação epitelial tende a cessar e o sistema imune promove a destruição e remoção das células epiteliais proliferadas e a lesão reduz-se ou desaparece (SHAH, 1988, CALISKAN; TURKUN, 1997, SOARES; GOLDBERG, 2001).

Os cistos periapicais representam quase a metade de todos os cistos relatados na literatura. Acomete mais pessoas do gênero masculino, entre a terceira e sexta década de vida, embora seja relativamente incomum na primeira década, ainda que cáries e dentes sem vitalidade sejam frequentes neste grupo etário (LALONDE; LUEBKE, 1968, STOCKDATE; CHANDLER, 1988,

GOMEZ et al. 1992, RAITZ et al., 2000). A maioria dos cistos periapicais localiza-se mais frequentemente na seguinte ordem: região anterior da maxila, região posterior da maxila, região posterior da mandíbula e região antero-inferior (MORTENSEN; WINTHER; BIRN, 1970, CABRINI; BARROS; ALBANO, 1970, SOUZA; PINTO; FREITAS, 1985, SOUZA et al., 2003).

A maioria dos cistos periapicais é assintomática, e são descobertos, com frequência durante exames radiográficos de rotina. Radiograficamente, o cisto periapical não pode ser diferenciado do granuloma periapical. A radiolucidez associada a um a um cisto periapical é circular ou ovóide, com margem esclerótica estreita contígua com a lâmina dura do elemento dental envolvido. Esta margem esclerótica pode não estar presente, quando o cisto encontra-se aumentando de tamanho. A lesão varia desde 0,5 cm ou menos, até vários centímetros de diâmetro, embora a maioria apresente menos de 1,5 cm. Nos cistos periapicais de longa duração, pode-se notar a reabsorção radicular do dente envolvido e, ocasionalmente, dos dentes vizinhos (PEREIRA, 1985).

Radiograficamente, o diagnóstico diferencial para o cisto periapical deve incluir o granuloma periapical. Em áreas previamente tratadas de alterações patológicas periapicais, devem ser considerados defeitos cirúrgicos ou cicatriz periapical (NEVILLE et al., 1998, REGEZI; SCIUBBA, 2000). Na região antero-inferior, uma radiolucidez periapical deve ser diferenciada da fase precoce da displasia cementária periapical (SANTA CECÍLIA; FAVIERI; AROEIRA, et al., 2000). Nos quadrantes posteriores deve ser considerado o cisto ósseo traumático (GADRE; ZUBAIRY, 2000). Ocasionalmente, tumores odontogênicos, lesões de células gigantes, doenças metastáticas e tumores ósseos primários podem imitar um cisto periapical. Em todas as condições discutidas, os elementos dentais apresentam-se com sensibilidade pulpar (SCHOOLL et al., 1999).

Histologicamente, o cisto periapical é revestido por um epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado de espessura variável. Espongiose e transmigração de células inflamatórias através do epitélio são achadas comuns. Na cápsula fibrosa, o tecido conjuntivo, pode estar focal ou difusamente infiltrado por uma população mista de células inflamatórias. Na direção do epitélio, predominam os PMN, mais profundamente no tecido conjuntivo os linfócitos são mais comuns (STERN et al., 1982). Infiltrado plasmocitário associado com os corpúsculos de Russell, refratáveis e esféricos, são freqüentemente encontrados e, algumas vezes dominam a imagem

microscópica. Focos de calcificação distrófica, cristais de colesterol e células gigantes multinucleadas podem ser encontradas, além de hemorragias na parede do cisto (PESCE; FERLONI, 2002, SINAN et al., 2002). Em uma pequena porcentagem de cistos periapicais, corpúsculos hialinos, denominados corpúsculos de Rushton, podem ser encontrados. Estes corpúsculos no revestimento epitelial são caracterizados por uma forma levemente encurvada, laminação concêntrica e mineralização basofílica ocasional. Acredita-se que a origem destes corpúsculos esteja relacionada à hemorragia prévia (KUC et al., 2000).

As opções terapêuticas para as lesões císticas periapicais variam entre o tratamento não cirúrgico, correspondendo ao tratamento endodôntico convencional ou retratamento do sistema de canais radiculares, e o tratamento cirúrgico, através de enucleação. Em lesões de grande extensão a manobra de marsupialização, ocasiona descompressão da cavidade cística e alívio da pressão interna sobre as células circunvizinhas na área afetada (NEAVERTH; BURG, 1982, SHAH, 1988, TSURUMACHI; SAITO, 1995, GALLEGO et al., 2002).

Os mecanismos moleculares e celulares envolvidos no estabelecimento e desenvolvimento da lesão perirradicular permanecem obscuros. O estudo das características microscópicas dos granulomas e cistos periapicais, a partir de material de biópsias de cirurgias paraendodônticas e de dentes extraídos, tem sido bastante explorado. O estudo das lesões periapicais vem contribuir para a caracterização e o entendimento da sua patogênese e dos fatores envolvidos no recrutamento e ativação das células inflamatórias.

2.2 Modulação da resposta imune na periodontite apical crônica

A resposta imune no periodonto tem início com os componentes do sistema imune inato. Estão incluídas células epiteliais, células de Langerhans, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (KINANE; LAPPIN, 2001, TENG, 2006). As citocinas regulam as atividades celulares, possuem influência na produção e ativação de diferentes células efectoras e são secretadas principalmente por células T e macrófagos (SEYMOUR; GEMMELL, 2001).

Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem em direção ao foco inflamatório, compondo a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a invasão microbiana. Constitutivamente, as células endoteliais dos vasos sanguíneos expressam pequenas quantidades de E-selectina, molécula de adesão leucocitária do endotélio (ELAM-1) e molécula de adesão

intracelular (ICAM-1) que facilitam o extravasamento vascular dos neutrófilos. Uma vez nos tecidos, as células seguem um gradiente de concentração de IL-8, que é uma potente citocina quimiotática para neutrófilos produzida pelo epitélio, fibroblastos e macrófagos em resposta às bactérias (MOUGHAL et al., 1992, TONETTI; IMBODEN; LANG, 1998, DIXON; BAINBRIDGE; DARVEAU, 2004).

À medida que a infecção se estabelece, células endoteliais e fibroblastos produzem CCL2 (MCP-1), uma quimiocina que induz a migração de macrófagos para o sítio da infecção (TONETTI et al., 1994, YU; GRAVES, 1995, SILVA et al., 2007). Os macrófagos representam uma grande população de células nas lesões periapicais, atuando na imunidade inata como fagócitos e na adaptativa como células apresentadoras de antígeno contribuindo para iniciação e regulação do processo inflamatório (BAKER, 2000, METZGER, 2000, KINANE; LAPPIN, 2001, GRAVES; COCHRAN, 2003). Não parece haver diferença na quantidade e distribuição de macrófagos em cistos e granulomas periapicais. Estas células predominam em áreas de inflamação ativa, como no centro dos granulomas e logo abaixo do epitélio cístico. Macrófagos atuam por meio da liberação de citocinas, como IL-1, TNF- α , PGE-2 e metaloproteinases de matriz (MMP), estimulando a reabsorção óssea e a progressão das lesões (STASHENKO, 1990).

A constante migração de células imunocompetentes para o sítio de infecção permite que todo repertório do sistema imune proteja os tecidos de uma variedade de desafios antigênicos (MOUGHAL et al., 1992). O reconhecimento inicial de microrganismos é mediado por receptores celulares expressos em células da imunidade inata. A interação entre moléculas de superfície do patógeno e receptores homólogos presentes na membrana celular de neutrófilos e macrófagos modulam a fagocitose e a ativação celular (GORDON et al., 1988, OHMAN et al., 1988). Portanto, monócitos, macrófagos e neutrófilos são células da imunidade inata que expressam receptores de superfície para manose, CD14, componentes do sistema complemento, porção Fc de moléculas de imunoglobulinas e receptores semelhantes a Toll (TLR, Toll-like receptor) capazes de reconhecer produtos microbianos. A ativação celular, via esses receptores, leva à estimulação da fagocitose, atividade microbicida e produção de citocinas (UNDERHILL; OZINSKY, 2002). As células do sistema imune inato como monócitos, por exemplo, expressam em sua superfície receptores do tipo toll ("*Toll like receptors* - TLR") que reconhecem diferentes estruturas bacterianas e desencadeiam as diferentes respostas celulares. A capacidade das células

da imunidade inata em reconhecer uma diversidade de produtos microbianos esta associada à produção de padrões distintos de citocinas frente à estimulação por diferentes micro-organismos.

No decorrer do processo inflamatório, o infiltrado vai se tornando cada vez mais complexo com a migração de linfócitos T e B. A produção de CCL2 (MPC-1), CCL5 (RANTES) e CCL3 (MIP- α) por fibroblastos, células dendríticas, macrófagos, osteoblastos e mastócitos (GEMMELL et al., 2001, KABASHIMA et al., 2001, PARK et al., 2004, WRIGHT; FRIEDLAND, 2004) favorece a migração de monócitos e células Th1 para o local da infecção (SALLUSTO; LANZAVECCHIA; MACKAY, 1998, SILVA et al., 2007), enquanto, a produção de CCL22 (MDC), CCL17 (TARC) são capazes de atrair células Th2 (SALLUSTO; LANZAVECCHIA; MACKAY, 1998, GU et al., 2000) e CXCL13 (BCA-1) de quimioatrair células B (SILVA et al., 2007). Neste contexto, as quimiocinas possuem uma ação fundamental no recrutamento de leucócitos para o sítio da infecção e apresentam um papel importante no direcionamento do tipo de resposta imune que será desenvolvida, por determinar os subgrupos de leucócitos que irão compor o infiltrado inflamatório (GEMMELL; SEYMOUR, 2004).

Comparando as populações de linfócitos B e T, as periodontites apicais crônicas demonstram um acúmulo de células T, visto tanto em humanos como em lesões periapicais induzidas em ratos (JONTELL; GUNRAJ; BERGENHOL, 1987, ALAVI; GULABIVALA; SPEIGHT, 1998, OKIJI et al., 1992). Este dado, aliado à presença constante de macrófagos, confirma a predominância da reação de hipersensibilidade tardia no mecanismo de formação das lesões periapicais crônicas (YU; STASHENKO, 1987).

Para determinar o perfil celular e as diferenças nas proporções destas células imunocompetentes, bem como o seu envolvimento na patogênese das lesões periapicais crônicas, diversos estudos imunohistoquímicos têm sido realizados. TORABINEJAD; KETTERING, em 1985, procuraram confirmar a presença de células T e determinar a média entre células T e B em 13 amostras de lesões periapicais, sendo 9 granulomas e 4 cistos perirradiculares, representado por um infiltrado inflamatório crônico, predominantemente de linfócitos e plasmócitos. Os resultados mostraram que todas as lesões foram positivas para linfócitos T e B. Demonstraram também, que o número de células T, foi maior que o de células B, não havendo diferenças significativas nas proporções de linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos.

A população de linfócitos T, também varia de acordo com a fase de desenvolvimento das lesões periapicais. Já foi demonstrado que, durante a fase ativa de desenvolvimento, o número de

células T CD4⁺ é maior, enquanto que as células T CD8⁺ aumentam numericamente nas fases mais tardias. Os achados sugerem que linfócitos T CD4⁺ podem mediar atividades envolvidas na destruição óssea e expansão, enquanto os linfócitos T CD8⁺, atuariam na estabilização da lesão (CYMERMAN et al., 1984, KONTIAINEN; RANTA; LAUTENSCHLAGER, 1986, BARKHORDAR; SOUZA, 1988, PIATTELLI et al., 1991, SOL et al., 1998, STASHENKO; YU, 1989, ALAVI; GULABIVALA; SPEIGHT, 1998, RODINI; LARA, 2001).

LIAPATAS; NAKOU; RONTOGIANNI (2003) avaliando o perfil celular em 45 amostras de lesões periapicais, sendo 25 granulomas, 17 cistos e 3 fibroses cicatriciais, mostraram que não havia diferença estatisticamente significativa no infiltrado inflamatório crônico de cistos e granuloma periapicais. Em ambas as lesões, a maioria das células inflamatórias encontradas foram linfócitos T, linfócitos B e macrófagos, indicando a persistência da resposta inflamatória, induzida por exposição prolongada dos tecidos periapicais a vários agentes desencadeando uma reação imunológica. O estudo também demonstrou que células T eram mais prevalentes que células B e que a proporção de linfócitos T CD4⁺ era maior que linfócitos T CD8⁺. Estes achados demonstraram que granuloma e cisto radicular representam dois estágios diferentes no desenvolvimento dos processos periapicais crônicos resultantes de uma resposta imune persistente.

Os mastócitos são células escassas nas lesões periapicais. Embora possam participar do controle da progressão da doença, nem sempre há variações na concentração dessas células entre cistos e granulomas (YANAGISAWA, 1980, KONTIAINEN; RANTA; LAUTENSCHLAGER, 1986, PIATTELLI et al., 1991). São encontrados nas periferias das lesões periapicais em associação com linfócitos ou, mais comumente, de forma isolada. Podem inibir a produção de mediadores químicos que promovem a resposta imune e a destruição óssea, como a IL-2, IFN- γ , por meio da liberação de histamina e supressão da atividade de células T frente aos antígenos. Participam também do controle da formação de fibras colágenas e, conseqüentemente, na formação da cápsula fibrosa na periferia das lesões (DOHLSTEN; SJÖGREN; CARLSSON, 1987; MÁRTON; KISS, 2000).

Acredita-se que os plasmócitos participam mais ativamente no processo de reparo do que na iniciação e desenvolvimento das lesões periapicais, uma vez que células positivas para IgG e IgE predominam nas fases tardias onde se observam indícios de reparo tecidual e estabilização da

reabsorção óssea (AKAMINE et al., 1994). Apesar de não haver evidências da participação direta de anticorpos no processo de reparo, as células IgG positivas parecem atuar na quimiotaxia para neutrófilos, macrófagos e linfócitos (YANAGISAWA, 1980). Além disso, IgA e IgM são encontradas em concentrações elevadas nos granulomas periapicais, parede e fluido cístico (JOHANNESSEN; NILSEN; SKAUG, 1983, TORRES et al., 1994).

As citocinas pró-inflamatórias mais comumente presentes nas lesões periapicais são a IL-1 α , IL-1 β e TNF- α , produzidas por macrófagos. Estas citocinas estão envolvidas na estimulação de osteoclastos na reabsorção óssea, no aumento da resposta vascular local e na estimulação de linfócitos (STASHENKO; YU; WANG, 1992). Os PMN também são capazes de gerar citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8, envolvidas nos processos de reabsorção óssea (TAKAHASHI; POOLE; KIANE, 1995). As citocinas anti-inflamatórias são principalmente a IL-4, IL-10 e TGF- β . TGF- β está envolvido no processo de reparação nas lesões periapicais, inibindo a formação de osteoclastos, estimulando a proliferação de fibroblastos, atuando na síntese de fibras colágenas e na angiogênese local (STASHENKO; TELES; SOUZA, 1998, DANIN et al., 2000).

As respostas mediadas por linfócitos Th podem exibir um padrão Th1, que consiste predominantemente de uma resposta imune celular e pró-inflamatória, ou um padrão do tipo Th2, com características anti-inflamatórias e de resposta imune predominantemente humoral. A polarização de linfócitos *naive* para um padrão Th1 é dependente da produção de IL-12 por células apresentadoras de antígeno, especialmente pelas células dendríticas. Além de determinar uma resposta imune adaptativa do tipo celular, a IL-12 induz a produção de IFN- γ por células NK, células dendríticas e macrófagos, sendo um importante fator de regulação da resposta imune inata (BASTOS et al., 2004). Contudo, estudos recentes demonstraram que na ausência de IL-12, outras citocinas como IL-23 ou a IL-18 também são capazes de induzir a produção de IFN- γ e a polarização de linfócitos Th1 (NAKANISHI et al., 2001, BROMBASCHER; KASTELEIN; ALBER, 2003, SZABO et al., 2003).

IFN- γ apresenta diversos efeitos no sistema imune, sendo a principal citocina ativadora de macrófagos, estimulando a fagocitose, captação e apresentação de antígenos, produção de citocinas inflamatórias e mediadores antimicrobianos, como o óxido nítrico (BOGDAN, 2000, BOGDAN, 2001, SZABO et al., 2003). Dessa forma, no desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1, que apresenta um papel crítico na imunidade protetora contra diversos patógenos intracelulares, a IL-12 atua basicamente como indutora da polarização, enquanto o IFN- γ pode

ser considerado a citocina efetora desse padrão de resposta imune (VAN DER VEEN, 2001, COOPER et al., 2002, CHAKRAVORTTY; HENSEL, 2003).

Além de mediadores de respostas do tipo Th1, citocinas envolvidas em respostas Th2 também estão potencialmente envolvidas na patogênese da doença (YAMAZAKI; NAKAJIMA; HARA, 1995, GEMMELL; SEYMOUR, 1998, BARTOVA et al., 2000, PETIT et al., 2001). A polarização de células Th2 é dependente da produção de IL-4, e em alguns casos de IL-13 (NELMS et al., 1999, MURPHY; REINER, 2002, AGNELLO et al., 2003, JARNICKI; FALLON, 2003, ZHOU; OUYANG, 2003, STETSON et al., 2004, WYNN, 2004). Uma vez polarizadas, as células Th2 expressam preferencialmente receptores de quimiocinas como CCR4 e CCR8 tornando-as responsivas a quimiocinas como CCL1 e CCL22. A partir de então, tornam-se competentes para produzir citocinas características do padrão Th2, como IL-4 e IL-10 (NELMS et al., 1999, PESTKA et al., 2004).

IL-4 é uma citocina pleiotrópica produzida principalmente por células Th2, que pode exercer efeitos estimulatórios ou supressivos em diferentes tipos celulares. As propriedades supressoras e anti-inflamatórias de IL-4 são em grande parte devidas a sua capacidade de inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias e TFN- γ , impedindo, dessa forma, a polarização de células Th1 (HAMILTON et al., 1999, NELMS et al., 1999, AGNELLO et al., 2003). IL-4 também pode agir amplificando respostas do tipo Th2 através da expressão de quimiocinas que levam ao recrutamento de outras células Th2 (HAMILTON; OHMORI; TEBO 2002, YAMASHITA; KURODA, 2002, ROT; VON ADRIAN, 2004), ou estimulando a produção de outras citocinas que podem atuar de forma complementar ou sinérgica a IL-4 (BRUBAKER; MONTANER, 2001, JARNICKI; FALLON, 2003, PESTKA et al., 2004). Uma dessas citocinas, a IL-10, também apresenta propriedades anti-inflamatórias, por reduzir a expressão de moléculas coestimulatórias em células apresentadoras de antígenos e inibindo a síntese de citocinas inflamatórias e Th1 por células T, NK e macrófagos (HSU; MOORE; SPITS, 1992, ROUSSET et al., 1992, MOORE et al., 1993, HAMILTON et al., 1999, PESTKA et al., 2004). Tal citocina está geralmente associada a uma significativa redução na reação inflamatória e a produção de IL-10 pode prejudicar a eliminação de agentes infecciosos levando a latência de infecções (BELKAID et al., 2002, MITTRUCKER; KAUFMANN, 2004).

Outras moléculas presentes na resposta imunológica do periodonto e que desempenham atividade imunomoduladora são as espécies reativas de oxigênio denominadas óxido nítrico (NO)

e mieloperoxidase (MPO). O óxido nítrico (NO) constitui um radical livre sintetizado na presença de O₂ a partir do aminoácido L-arginina, que é convertido em L-citrulina e NO por um grupo de isoenzimas, coletivamente chamadas de NO sintases (NOS). As NOS existem em três isoformas diferentes, denominadas NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (bNOS) e NOS induzível (iNOS) (MONCADA; HIGGS, 1993). O NO é produzido por células inflamatórias em resposta a estímulos como os Lipopolissacarídeos (LPS), fragmentos antigênicos de fungos e citocinas inflamatórias e/ou imunorreguladoras como IL-1, TNF- α , TNF- β , IFN- γ . NO pode reagir com moléculas de oxigênio ou com outras biomoléculas originando compostos citotóxicos como o peroxinitrito (ONOO⁻), o qual tem sido considerado mais tóxico do que seu precursor NO (CHAE et al., 1997, HIROSE et al., 2001). A MPO é produzida no estágio pré-mielócito e armazenada nos grânulos primários de neutrófilos. No foco de infecção, a MPO é liberada nos fagossomos e, junto com a elastase, participa da degradação bacteriana (BELAAOUAJ, 2002).

A síntese de NO tem sido observada em macrófagos e células gigantes multinucleadas bem como em outras células como neutrófilos, linfócitos T *helper*, fibroblastos, células epiteliais, osteoclastos, osteoblastos, condrócitos, células de Langerhans, células endoteliais, eosinófilos e em mastócitos, podendo ter vários efeitos dependendo do tipo de célula que produz, do sítio de liberação e da concentração produzida (MONCADA et al., 1992). O NO apresenta importante função na resposta de defesa, podendo atuar como molécula citotóxica frente a fungos, bactérias, protozoários, bem como células tumorais e células próximas do sítio de produção. A iNOS responsável pela síntese de NO, é expressa durante ativação de macrófagos por TNF- α e IFN- γ . Em contrapartida, as citocinas IL-10, IL-4 e TGF- β inibem a expressão de iNOS e consequente produção de NO por macrófagos *in vitro* (OSWALD et al., 1992, MacMICKING; XIE; NATHAN, 1997).

NO apresenta importante papel imunorregulador sendo produzido pelas células do sistema imune como macrófagos e linfócitos T. A produção de NO por células T *helper* e sua participação na modulação da resposta imune celular permanecem controversas. Estudo *in vitro* demonstrou produção de NO por células Th1, mas não por células Th2; além disso, o NO inibiu a secreção de IL-2 e IFN- γ por células Th1 e não causou nenhum efeito na produção de IL-4 por células Th2. De acordo com TAYLOR-ROBINSON et al. (1994), o NO produzido por células Th1 participa de um mecanismo de *feed-back* negativo inibindo a produção de IL-2 e IFN- γ , prevenindo, assim, a proliferação de células Th1, de células CD8⁺ e de macrófagos;

adicionalmente, as células Th2 proliferam na presença de IL-4, cuja produção não foi afetada por NO. A supressão da resposta imune provocada por NO, também pode ser executada através da inibição de expressão do MHC classe II pelos macrófagos, prejudicando a apresentação antigênica (SICHER; VAZQUEZ; LU, 1994). O papel exercido pelo NO na progressão da periodontite apical crônica foi atribuído à indução de apoptose em macrófagos e osteoblastos (LIN et al., 2007).

Apesar dos mecanismos moleculares relacionados à progressão da periodontite apical crônica permanecerem pouco conhecidos, fica evidente o papel central dos linfócitos e seus produtos de secreção no desenvolvimento da doença. Para que ocorra a ativação das células T é necessário, inicialmente, o reconhecimento do antígeno específico pela interação do receptor de células T (TCR) com o MHC presente na superfície de células apresentadoras de antígenos e a transdução de um segundo sinal via moléculas coestimulatórias (GAUSE et al., 1997, CARRERO; COLLINS, 2002, CUTLER; JOTWANI, 2004). CD28 é o principal receptor coestimulatório presente na superfície de células T, sendo expresso constitutivamente. CTLA-4 (CD152), um homólogo do CD28, é expresso apenas em células T ativadas e, diferente de CD28, é um regulador negativo da ativação de células T.

A molécula de CD28 é uma glicoproteína homodimérica pertencente à superfamília das imunoglobulinas. Trata-se de uma molécula expressa constitutivamente na maioria dos linfócitos T e após a ativação, sua expressão pode ser ainda maior (TURKA et al., 1990). É um dos principais coreceptores que promovem coestimulação para a ativação linfocitária, especialmente em células T *naïves*, ou seja, que não tenham sido apresentadas ao antígeno (DUBEY et al., 1996). Adicionalmente, em células T efectoras ou de memória, a produção de determinadas citocinas, tais como IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-5 também são dependentes da coestimulação via CD28 (DUBEY et al., 1996, MARTINS et al., 2004). Com efeito, a ligação em CD28 leva ao aumento da expressão de CD40L e das cadeias α , β , γ do receptor de IL-2, além de induzir a transcrição de RNA mensageiro para IL-2, IL-4, CTLA-4, a secreção de citocinas e a proliferação celular, eventos envolvidos na ativação das células T (SPERLING; BLUESTONE, 1996). Contudo, animais deficientes de CD28 (CD28^{-/-}) sobrevivem normalmente (NOEL et al., 1996, SPERLING; BLUESTONE, 1996), embora apresentem algumas deficiências na produção de citocinas do padrão Th2 (KING et al., 1996).

A molécula CTLA-4 é uma glicoproteína pertencente à superfamília das imunoglobulinas, que apresenta alta homologia com CD28. Com efeito, seus ligantes são os mesmos: B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). Contudo, CTLA-4 liga-se às moléculas B7 com afinidade 100 vezes maior que CD28 (CHAMBERS et al., 1996). CTLA-4 é expressa de maneira estritamente regulada, sendo detectadas apenas em uma pequena parcela de células T ativadas (LINSLEY et al., 1992). Quando ativados, tanto linfócitos T CD4⁺ como CD8⁺ podem expressar CTLA-4. Ensaios *in vitro* mostram que os maiores níveis de expressão de CTLA-4 podem ser detectados depois de 48 a 72 horas de cultura na presença de anticorpo anti-CD3 e IL-2 (CHAMBERS et al., 1996).

Embora as primeiras tentativas de elucidação da importância de CTLA-4 no controle da resposta imune tenham resultado em achados controversos, estudos mais recentes estabeleceram claramente a importância dessa molécula como um regulador negativo da resposta imune (WATERHOUSE et al., 1996). O bloqueio de CTLA-4, pela administração de anticorpos solúveis, leva ao aumento da resposta T *in vitro* (KRUMMEL; ALLISON, 1995), enquanto que a ligação dessa molécula, pelo “cross-linking” com anticorpos específicos inibe a ativação de células T humanas (KRUMMEL; ALLISON, 1995) e murinas (WALUNAS et al., 1994).

A evidência definitiva da importância de CTLA-4 na manutenção da homeostasia do sistema imune foi obtida com a criação de animais geneticamente deficientes de CTLA-4 (CTLA-4^{-/-}) (WATERHOUSE et al., 1995). Esses animais apresentaram expansão policlonal de células T e desenvolveram uma doença linfoproliferativa fatal, que leva à morte em 3 a 4 semanas após o nascimento (CHAMBERS et al., 1996; WATERHOUSE et al., 1996). Análises histológicas revelaram um extenso acúmulo linfocitário nos linfonodos, timo e baço, além de infiltrados focais e difusos na medula óssea, pulmão, fígado, pâncreas e coração dos animais CTLA-4^{-/-}. Linfócitos extraídos do baço desses animais proliferam espontaneamente *in vitro* e expressam marcadores de ativação (WATERHOUSE et al., 1995).

Tem sido sugerido que, fisiologicamente, o término das respostas de células T mediado por CTLA-4 poderia facilitar a geração de células T de memória com capacidade de responder ao estímulo antigênico assim que a expressão de CTLA-4 retornasse aos índices normais (CHAMBERS et al., 1996, WATERHOUSE et al., 1996). Alternativamente, CTLA-4 tem sido implicada na regulação de mecanismos de anergia, baseado em observações de que o bloqueio dessa molécula em animais com TCR transgênico previne a indução de anergia por peptídeos específicos (PEREZ et al., 1997). Embora os mecanismos pelos quais CTLA-4 participa do

controle da resposta imune não estejam totalmente elucidados, foi descrito que o sinal mediado por esta molécula inibe os efeitos da ligação de CD28, ou seja, bloqueia a produção de IL-2, a expressão da cadeia α do receptor de IL-2 e de CD69 e a progressão do ciclo celular (CHAMBERS et al., 1996, WATERHOUSE et al., 1996). Relatos mais recentes demonstraram que a ligação de CTLA-4 leva também à produção de TGF- β , que estaria diretamente implicado na inibição da proliferação de linfócitos (CHEN; JIN; WAHL, 1998).

Recentemente, pesquisadores têm relacionado o envolvimento de outras vias nos mecanismos de regulação da resposta imune. A molécula de PD-1 tem sido amplamente estudada pelo seu importante papel na inativação de células T (ISHIDA et al., 1992, SHINOHARA et al., 1994, VIBHAKAR et al., 1997, GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005). Semelhante a CD28 e CTLA-4, esta molécula é uma glicoproteína, porém monomérica, pertencente à superfamília das imunoglobulinas (IWAI et al., 2003, DAY et al., 2006, PETROVAS et al., 2006, TRAUTMANN et al., 2006, URBANI et al., 2006, SHARPE et al., 2007). A sua expressão em células T é estritamente regulada, como CTLA-4, sendo detectada apenas em células T ativadas. No entanto, sua expressão não se restringe aos linfócitos T, podendo ser encontrado tanto em linfócitos B como em monócitos ativados (AGATA et al., 1996). PD-1 apresenta dois ligantes, PD-L1 (B7-H2) e PD-L2 (B7-DC), que possuem padrões distintos de expressão. PDL-1 pode ser expresso em células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas (FREEMAN et al., 2000, TSENG et al., 2001), enquanto PD-L2 se restringe aos macrófagos e células dendríticas (ISHIDA et al., 2002, LIANG et al., 2003, PETROFF et al., 2003, WIENDL et al., 2003). Além disso, trabalhos têm mostrado que a ação de IFN- γ induz a expressão de PD-L1, enquanto IL-4 induz a expressão de PD-L2, sugerindo um possível papel desses ligantes na regulação da resposta Th1 e Th2 (LIANG et al., 2003, LOKE; ALLISON, 2003).

Inicialmente, as primeiras tentativas de descobrir o papel de PD-1 na resposta imune geraram resultados controversos, no entanto estudos mais recentes determinaram a importância dessa molécula como regulador negativo da atividade das células T. A ligação de PD-1 pelo “cross-linking” com anticorpos específicos *in vitro*, inibiu a produção de IL-2 e a proliferação de células T (CARTER et al., 2002).

A importância de PD-1 na manutenção da homeostasia foi confirmada após a construção de animais geneticamente deficientes (PD-1^{-/-}) (NISHIMURA et al., 1999, NISHIMURA et al., 2001, OKAZAKI et al., 2003). Esses animais desenvolveram doença auto-imune, como artrite

reumatóide, glomerulonefrite e cardiopatia. Esses achados indicam a participação de PD-1 nos mecanismos de tolerância periférica.

Considerando que sinais coestimulatórios têm um efeito relevante sobre a atividade e função das células T e que o papel desses sinais tem sido pouco estudado nas periodontites apicais crônicas, o estudo do efeito modulador de moléculas coestimulatórias sobre a ativação de células T poderia trazer uma importante contribuição para o entendimento da resposta inflamatória nas lesões periapicais humanas.

3 Proposição

3. PROPOSIÇÃO

Considerando que sinais coestimulatórios têm um efeito relevante sobre a atividade e função das células T e que o papel desses sinais tem sido pouco estudado nas periodontites apicais crônicas, o presente estudo objetivou:

1. Investigar a presença e quantidade de células e citocinas envolvidas na periodontite apical crônica.
 2. Analisar a expressão de moléculas coestimulatórias PD-1, CTLA-4 e CD28 em lesões periapicais.
 3. Identificar a presença e níveis de óxido nítrico e mieloperoxidase na periodontite apical crônica.
-

4 Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de Pacientes

Foram inseridos nesse estudo 40 pacientes adultos provenientes das clínicas da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru e do Serviço de Urgências Odontológicas da FOB-USP. O consentimento dos voluntários foi obtido após a leitura da carta de informação ao paciente e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB-USP (Protocolo 111/2008).

Para participação no estudo os pacientes foram submetidos à anamnese, exame clínico, periodontal e radiográfico e deveriam apresentar, como principal critério de inclusão, dente com insucesso do tratamento endodôntico associado à lesão periapical visível radiograficamente e com indicação para realização de cirurgia paraendodôntica. Os critérios para exclusão da amostra foram pacientes com doença periodontal avançada ou com lesão do tipo endoperiodontal; história médica evidenciando modificadores sistêmicos como *diabetes mellitus* – tipo 1 ou 2 e cardiopatias; mulheres grávidas ou em fase de amamentação; pacientes que passaram por terapia antibiótica, anti-inflamatória ou hormonal nos 6 meses prévios a realização do estudo. As amostras foram obtidas a partir de dentes anteriores e posteriores, com exceção de terceiros molares, que apresentavam boas condições periodontais, ausência de cárie e restauração coronária satisfatória. Os 40 indivíduos selecionados foram divididos em pacientes que apresentavam periodontite apical crônica ($n=20$) e pacientes controle ($n=20$).

A análise dos pacientes portadores de periodontite apical crônica revelou um predomínio do sexo feminino (65,0%), com idades entre 20 e 60 anos. A idade mínima entre os participantes foi de 22 anos e a máxima de 56 anos (média de $38,8 \pm 2,2$ anos). Os dentes acometidos por lesões periodontais apicais que compuseram a amostra foram incisivos centrais superiores ($n=06$), incisivos laterais superiores ($n=04$), incisivos centrais inferiores ($n=02$), incisivos laterais inferiores ($n=02$), caninos superiores ($n=01$), pré-molares superiores ($n=03$), molares superiores ($n=02$). A maioria dos indivíduos não apresentou sintomatologia dolorosa (75,0%) e nem comprometimento periodontal (90,0%). Os pacientes recrutados para o grupo controle apresentaram idades entre 21 e 44 anos, sendo 10 do sexo feminino e 10 do sexo masculino. A Tabela 1 fornece um resumo do perfil clínico dos pacientes que compuseram a amostra.

Tabela 1 – Perfil clínico dos pacientes participantes do estudo.

Características	Periodontite Apical Crônica (n= 20)	Controle (n= 20)
Idade (20-30/31-40/41-50/51-60)	07/05/05/03	09/05/06/00
Gênero (M/F)	07/13	10/10
Sintomatologia dolorosa (+/-)	05/15	00/20
Fístula (+/-)	06/14	00/20
Comprometimento periodontal (+/-)	02/18	00/20
Dentes (Anteriores/Posteriores)	15/05	00/20

4.2 Captação das amostras

As amostras selecionadas foram constituídas de biópsias excisionais de lesões periapicais obtidas a partir de cirurgias paraendodônticas. O material foi coletado através da enucleação total da lesão, a fim de se preservar ao máximo sua integridade estrutural. As amostras foram acondicionadas em meio RPMI gelado e encaminhadas imediatamente para processamento no laboratório de microbiologia da FOB-USP. O tecido foi lavado em meio RPMI para a remoção do excesso de sangue e dividido em duas partes iguais. Metade da amostra foi acondicionada em solução de formol tamponado a 10% e encaminhada para o Serviço de Patologia da FOB-USP para laudo anatomopatológico, a outra parte foi reservada para processamento laboratorial. As amostras referentes ao grupo controle consistiram em fragmentos de tecido gengival saudável obtidos da região vestibular de dentes posteriores durante a execução de cirurgia periodontal ou exodontia por indicação ortodôntica.

Os resultados da avaliação microscópica revelaram que as 20 lesões periapicais se dividiram em 15 granulomas e 5 cistos radiculares.

4.3 Processamento laboratorial das biópsias

Após a divisão da biópsia, a metade reservada para o estudo foi fragmentada e incubada a 37°C por 15 minutos em 1 mL de meio RPMI 1640 contendo 4µL de liberase. Após o processo de digestão enzimática do material, procedeu-se à lavagem em PBS/EDTA/BSA por duas vezes,

através da centrifugação a 500g por 10 minutos a 4°C. A seguir, o tecido foi triturado usando Medimachine (BD PharMingen) por 4 minutos, filtrado e novamente centrifugado. O sobrenadante foi coletado e congelado a -20°C para posterior dosagem de citocinas. A viabilidade celular foi determinada por exclusão do azul de Trypan a 2% e a concentração ajustada para 1×10^6 células viáveis por mL de meio de cultura (CAMPANELLI et al., 2006).

4.4 Fenotipagem pela análise da expressão de moléculas de superfície

A análise fenotípica de leucócitos isolados das lesões periapicais e do tecido gengival foi realizada por citometria de fluxo conforme protocolo padrão. Para tal, procedeu-se à distribuição de 100 µL da suspensão celular para cada tubo de citometria, a adição de 5 µL de anticorpos específicos, e a incubação a 4°C por 2 horas. Os anticorpos monoclonais conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou proteína clorofil peridina (PerCP) utilizados foram anti: CD3 (UCHT1), CD4 (SK3), CD8 (RPA-T8 e HIT8a), CD14 (M5E2), CD19 (HIB19), CD25 (M-A251), CD28 (CD28.2), CD45RO (UCHL1), CD152 (BNI3), PD-1 (MIH4), PD-L1 (MIH1) humanos e isotipos controle de camundongos, todos provenientes da BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Anticorpos controle (de mesmo isotipo) anti-TNPs, conjugados aos mesmos fluorocromos, foram utilizados para que fossem descontadas as fluorescências emitidas inespecificamente. Após a incubação com os anticorpos, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS, sendo centrifugadas a 250g por 10 minutos e armazenadas em 100 mL de PBS formol a 4°C por, no máximo, 3 dias. Em seguida, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACScan (Becton and Dickson, San Jose, CA, USA) utilizando o canal de fluorescência 1 (FL1) para os anticorpos marcados com FITC, 2 (FL2) para os marcados com PE e 3 (FL3) para os marcados com PerCP. Para as análises utilizou-se o programa Cell Quest (CAMPANELLI et al., 2003).

4.5 Dosagem de citocinas

Os sobrenadantes anteriormente estocados foram submetidos ao “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA), sendo avaliadas as seguintes citocinas: TGF- β , IL-10, IFN- γ , TNF- α . Brevemente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal

primário (captura/100µL por poço) diluído em tampão de ligação carbonato/bicarbonato, de acordo com especificações do fabricante. Após 12 horas, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS/Tween 20. Os bloqueios dos anticorpos para evitar ligação inespecífica foram feitos com PBS contendo 10% SFB por 1 hora a temperatura ambiente (Kit OPTSEia, BD Biosciences). As placas foram novamente lavadas com PBS/Tween 20 e as citocinas recombinantes foram colocadas nos poços. Após 3 horas de incubação a 37°C, as placas foram lavadas, os anticorpos secundários biotinilados e a estreptoavidina peroxidase foram diluídos em PBS 10% SFB e colocados nos poços. Após novas lavagens, a reação foi revelada pela adição de tetrametilbenzidina e H₂O₂. Após 40 minutos, a reação foi interrompida com H₂SO₄ 4N, e o resultado aferido em leitor de ELISA, a 492nm.

4.6 Dosagem de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

A produção de NO foi avaliada em sobrenadantes do macerado das lesões periapicais. Para tal foi mensurada a produção de NO⁻² (nitrito) nos sobrenadantes pela reação colorimétrica de Griess. Resumidamente, 100µL do sobrenadante obtidos e processados como descrito acima, foram adicionados a 100 µL de reagente de Griess e incubados por 10 minutos a 26°C. Em seguida, determinou-se a absorbância (450 nm) em leitor de Elisa. Os resultados expressos em µmoles serão determinados pela comparação com a curva padrão (realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 e 1.5 µM).

Para determinar a atividade da mieloperoxidase, a mesma amostra de sobrenadante utilizada para identificação de NO, foi incubada com H₂O₂ 0,5 mM e tetrametilbenzidina (16 mM). A atividade de MPO foi mensurada em leitor de ELISA com uma absorbância de 450 nm.

4.7 Análise estatística

Os dados referentes à caracterização fenotípica de leucócitos e da expressão de moléculas de superfície em linfócitos foram analisados pelo teste t pareado. Já os dados referentes à dosagem de citocinas e espécies reativas do oxigênio e nitrogênio foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. Para verificação de possíveis diferenças entre os grupos analisados, adotou-se o nível de significância igual a 5%.

5 Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização fenotípica de leucócitos na periodontite apical crônica

Para determinar quantitativamente a presença de leucócitos na periodontite apical crônica, realizou-se a fenotipagem celular das amostras através da análise de expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo. Leucócitos foram isolados nos grupos com periodontite apical crônica e grupo controle e analisados quanto à expressão de CD3 (células T), CD19 (células B) e CD14 (macrófagos). Os resultados demonstraram que o número total de leucócitos isolados do tecido de lesões apicais de pacientes com periodontite apical crônica ($5,6 \pm 0,9 \times 10^5$ células/amostra) foi maior que o isolado do grupo controle ($2,7 \pm 0,4 \times 10^5$ células/biópsia) (Figura 1A).

A proporção de células T CD3⁺ isoladas do infiltrado inflamatório das lesões periapicais ($59,3 \pm 3,7\%$) foi estatisticamente superior à observada no grupo controle ($38,4 \pm 4,8\%$), sendo a principal população celular presente na periodontite apical crônica. Em relação às subpopulações de linfócitos T, as células T CD3⁺CD4⁺ foram encontradas em maiores proporções nas lesões periapicais ($72,7 \pm 3,4\%$) que o observado nas amostras de tecido gengival ($8,8 \pm 1,5\%$). Já para a população de células T CD3⁺CD8⁺ não houve diferença significativa entre os dois grupos ($23,8 \pm 2,8\%$ grupo com periodontite apical crônica e $11,5 \pm 2,6\%$ grupo controle). Foi detectada uma baixa concentração de linfócitos B (CD19⁺) tanto no grupo controle ($7,1 \pm 2,0\%$) quanto nos indivíduos com periodontite apical crônica ($9,1 \pm 2,4\%$) sem diferença significativa entre ambos. A proporção de células CD14⁺ foi maior nas amostras de pacientes com periodontite apical crônica ($15,9 \pm 6,1\%$) que no grupo controle ($0,4 \pm 0,4\%$). Os resultados mostraram que há um maior número de leucócitos, especialmente linfócitos T CD4⁺, isolados das lesões de pacientes com periodontite apical crônica (Figura 1B).

Figura 1. Caracterização fenotípica de leucócitos na periodontite apical crônica.

Amostras provenientes de pacientes controle ($n = 20$, barras abertas) e de pacientes com periodontite apical crônica ($n = 20$, barras fechadas) passaram por um processo de digestão enzimática com liberase e desagregação tecidual usando “Medmachine”. Em seguida, a concentração e viabilidade celular foram determinadas (A) e as células caracterizadas por citometria de fluxo (B). Os dados apresentados representam a média $\pm$ SEM do resultado de cada paciente analisado individualmente. Os resultados foram analisados através de teste t pareado e $*p < 0,05$ foi considerado significativo. ($***p < 0,001$)

5.2 Expressão de moléculas de superfície em linfócitos T na periodontite apical crônica

Uma vez caracterizado o infiltrado inflamatório, avaliou-se o perfil de expressão de moléculas coestimulatórias pelas células T recém isoladas de lesões periapicais (Figura 2). Quando avaliada a expressão da molécula coestimulatória CD28, importante na ativação de linfócitos T, os resultados revelaram uma proporção similar de células $CD4^+CD28^+$ (Figura 2B) isoladas de pacientes com periodontite apical crônica ($27,0 \pm 2,0\%$) e de pacientes controle ($33,7 \pm 5,5\%$). Entretanto, quando avaliada a expressão de CD28 em linfócitos T $CD8^+$ (Figura 2D) verificou-se uma concentração significativamente baixa no grupo com periodontite apical crônica ($0,5 \pm 0,5\%$) quando comparado ao grupo controle ($38,6 \pm 3,2\%$).

A presença de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ positivas para CTLA-4, uma molécula inibitória para ativação celular, foi observada em linfócitos isolados de pacientes controle e com periodontite apical crônica (Figura 2). Em relação à proporção de células T $CD4^+$ coexpressando CTLA-4 (Figura 2B), observou-se uma porcentagem estatisticamente maior de células positivas para essa molécula no grupo com periodontite apical crônica ($86,1 \pm 2,6\%$) em comparação aos indivíduos do grupo controle ($2,9 \pm 0,5\%$). Essa diferença, também foi observada em células T $CD8^+CTLA-4^+$ (Figura 2d) de pacientes com periodontite apical ($38,1 \pm 15,3\%$) em comparação ao grupo controle ($1,7 \pm 0,4\%$).

Os resultados mostraram diferenças na expressão de CD25 por células T isoladas do tecido gengival de pacientes controle e do tecido de lesões apicais crônicas (Figura 2). Observou-se que uma porcentagem significativamente maior de células T $CD4^+CD25^+$ (Figura 2B) no grupo com periodontite apical crônica ($38,6 \pm 24,9\%$) em comparação ao grupo controle ($0,1 \pm 0,01\%$). Em relação à população de células T $CD8^+CD25^+$ (Figura 2D), observou-se percentagem elevada, mas não estatisticamente significante entre os dois grupos, sendo $6,5 \pm 3,5\%$ para amostras de lesão periapical e $0,1 \pm 0,01\%$ para amostras de tecido gengival.

A expressão de CD45RO mostrou-se superior nas amostras provenientes de pacientes com periodontite apical crônica (Figura 2). Entretanto, quando avaliadas individualmente as subpopulações de linfócitos T, houve diferença estatisticamente significante nas amostras de lesão periapical ($86,8 \pm 4,1\%$) e tecido gengival ($38,3 \pm 7,8\%$), apenas em linfócitos T $CD4^+$ (Figura 2B). Já para células T $CD8^+$, apesar da identificação de CD45RO ter sido alta, não houve diferença significante entre o grupo controle ($41,7 \pm 4,6\%$) e os pacientes com periodontite

apical crônica ($58,5 \pm 4,9\%$).

Figura 2. Expressão de moléculas de superfície em linfócitos na periodontite apical crônica. Amostras provenientes de pacientes controle (n=20, barra aberta) e de pacientes com periodontite apical crônica (n=20, barra fechada) passaram por um processo de digestão enzimática com liberase e desagregação tecidual usando “Medmachine”. Em seguida, a concentração e viabilidade celular foram determinadas e, por último, as células caracterizadas por citometria de fluxo. Os dados representam a média $\pm$ SEM do resultado dos pacientes analisados individualmente. (A) O painel mostra a “gate” de linfócitos CD4⁺ (R1) de um paciente com periodontite apical crônica. (B) Cada coluna representa a porcentagem de células T CD4⁺ que co-expressam CD28, CTLA-4 (CD152), CD45RO e CD25. (C) O painel mostra a “gate” de linfócitos CD8⁺ (R2) de um paciente representativo. (D) Cada coluna representa a porcentagem de células T CD8⁺ que co-expressam CD28, CTLA-4 (CD152), CD45RO e CD25. Os resultados foram analisados através de teste t pareado e $p < 0,05$ foi considerado significativo (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$).

5.3 Expressão de PD-1 e PDL-1 na periodontite apical crônica.

Detectou-se uma maior expressão de PD-1 em relação à PD-L1 nos leucócitos isolados das amostras de pacientes com periodontite apical crônica. A média de expressão foi de $49,1 \pm 7,3\%$ para PD-1 e $23,9 \pm 5,4\%$ para PD-L1 (Figura 3A). Quando avaliada a expressão de PD-1 entre as subpopulações de células T, observou-se que a percentagem de linfócitos T $CD4^+PD-1^+$ foi significativamente maior no grupo com periodontite apical crônica ($73,5 \pm 5,6\%$) que no grupo controle ($5,7 \pm 1,3\%$). A maior expressão de PD-1 em amostras de lesão periapical ($30,7 \pm 9,9\%$), também foi confirmada para linfócitos T $CD8^+$, entretanto não houve diferença significativa em relação às amostras controle ($4,0 \pm 0,8\%$) (Figura 3B e C).

Em relação à expressão de PD-L1, a análise das subpopulações de linfócitos demonstrou que mais da metade das células T $CD3^+CD4^+$ ($59,8 \pm 8,6\%$) presentes nas amostras eram $PD-L1^+$ e $34,3 \pm 9,6\%$ dos linfócitos T $CD3^+CD8^+$ expressavam PD-L1. Além disso, quase a totalidade da população de macrófagos ($CD14^+$) isolados dos tecidos eram $PD-L1^+$ ($89,7 \pm 3,7\%$) (Figura 3D e E). Estes resultados podem indicar um possível envolvimento da via de sinalização de PD-1 e PDL-1 na modulação da resposta de células T de pacientes com periodontite apical crônica.

Figura 3. Expressão de PD-1 e PD-L1 em linfócitos na periodontite apical crônica. Amostras de tecido gengival de pacientes controle ($n=20$, barra aberta) e de pacientes com periodontite apical crônica ($n=20$, barra fechada) passaram por um processo de digestão enzimática com liberase e desagregação tecidual usando “Medmachine”. Em seguida, a concentração e viabilidade celular foram determinadas e, por último, as células caracterizadas por citometria de fluxo. (A) Os dados apresentados representam a média $\pm$ SEM da expressão de PD-1 e PD-L1 em Linfócitos T de cada paciente analisado individualmente. (B) O painel mostra a média da expressão de PD-1 em Linfócitos T de um paciente com periodontite apical crônica. (C) Cada coluna representa a porcentagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ que coexpressam PD-1. (D) O painel mostra a média da expressão de PDL-1 em Linfócitos T de um paciente representativo. (E) Cada coluna representa a porcentagem de células T CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos (CD14⁺) que coexpressam PDL-1. Os dados apresentados representam a média $\pm$ EPM de cada indivíduo testados individualmente (* $p<0,05$; *** $p<0,001$).

5.4 Detecção dos níveis de citocinas na periodontite apical crônica.

A dosagem de citocinas foi analisada nas amostras de pacientes saudáveis e com periodontite apical crônica objetivando identificar TGF- β , IL-10, TNF- α e IFN- γ . A presença de todas as citocinas pesquisadas foi significativamente maior nas amostras provenientes de lesões periapicais quando comparado ao grupo controle (Figura 4). A maior diferença entre pacientes com periodontite apical e pacientes controle foi em relação à produção de IL-10, que apresentou concentração de $853,5 \pm 157,7$ pg/mg nas lesões periapicais e $160,4 \pm 62,58$ pg/mg de tecido em amostras do grupo controle (Figura 4B).

TGF- β , também foi detectado em grande quantidade nos tecidos provenientes de pacientes afetados pela periodontite apical (14451 ± 1489 pg/mg de tecido) quando comparado aos pacientes controle ($3740 \pm 795,6$ pg/mg de tecido) (Figura 4A).

A dosagem de IFN- γ em lesões apicais ($3046 \pm 727,3$ pg/mg de tecido) foi 3 vezes maior que a identificada em amostras controle ($1017 \pm 318,5$) (Figura 4C).

A produção de TNF- α também foi incrementada no grupo com periodontite apical crônica ($750,4 \pm 146,7$ pg/mg de tecido) em relação ao grupo controle ($308,9 \pm 80,6$ pg/mg de tecido) (Figura 4D).

5.5 Avaliação da presença de mieloperoxidase e óxido nítrico na periodontite apical crônica.

Foram pesquisadas também, espécies reativas do oxigênio procurando estabelecer uma relação entre a presença de mieloperoxidase e óxido nítrico e a periodontite apical crônica. As amostras provenientes de pacientes com periodontite apical crônica apresentaram concentração significativamente maior de mieloperoxidase ($3252 \pm 756,6$ unidades/mg) e óxido nítrico ($28,23 \pm 5,8$ μ M) em comparação ao grupo controle (Figura 5A e B).

Figura 4. Citocinas presentes em amostras de periodontite apical crônica. Amostras provenientes de pacientes controle ($n=20$, barra aberta) e de pacientes com periodontite apical crônica ($n=20$, barra fechada) passaram por um processo de digestão enzimática com liberase e desagregação tecidual usando “Medmachine”. Em seguida, o sobrenadante de cada amostra foi obtido e filtrado. Os níveis de TGF- β (A), IL-10 (B), IFN- γ (C) e TNF- α (D) foram identificados através de ELISA e os dados normalizados pela concentração de proteína total. Os resultados foram submetidos ao teste de Mann-Whitney (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$).

Figura 5. Espécies reativas de Oxigênio e Nitrogênio presentes nas amostras de pacientes com periodontite apical crônica. Amostras de tecido gengival de pacientes controle ($n = 20$, barra aberta) e de pacientes com periodontite apical crônica ($n = 20$, barra fechada) passaram por um processo de digestão enzimática com liberase e desagregação tecidual usando “Medmachine”. Em seguida, o sobrenadante de cada amostra foi obtido e filtrado. Os níveis de atividade de mieloperoxidase (MPO) (A) e nitrito (NO) (B) foram analisados através de reação enzima/substrato e os dados normalizados pela concentração de proteína total. Os resultados foram submetidos ao teste de Mann-Whitney (*** $p < 0,001$).

6 Discussão

6. DISCUSSÃO

Os granulomas e cistos radiculares representam dois diferentes estágios de desenvolvimento da resposta imunopatológica em tecidos apicais frente à infecção persistente nos canais radiculares. Apesar da presença de micro-organismos patogênicos ser fundamental para o início e desenvolvimento das periapicopatias, a amplificação e progressão da doença são altamente dependentes da resposta imune e inflamatória gerada pelo hospedeiro em resposta aos micro-organismos e seus produtos. Diversos estudos já comprovaram a relevância do papel dos micro-organismos na etiopatogenia da periodontite apical crônica (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965, FABRICIUS et al., 2006). Entretanto, o resultado da interação dinâmica entre fatores microbianos e de defesa do hospedeiro na interface entre a polpa radicular infectada e o ligamento periodontal é determinante para a inflamação local, reabsorção de tecidos mineralizados e destruição de outras estruturas periapicais que caracterizam a lesão periapical (MÁRTON; KISS, 2000).

As lesões periapicais apresentam infiltrado inflamatório com diferente padrão celular o qual é resultante do tempo de instalação do quadro infeccioso e do tipo de resposta imunológica presente nos tecidos afetados. Assim, diversos tipos celulares como neutrófilos, macrófagos, linfócitos T CD4, T CD8 e linfócitos B podem ser encontrados em números elevados nos tecidos de pacientes com periodontite apical crônica. Vários estudos têm sido realizados a fim de determinar a fenotipagem celular de lesões periapicais crônicas utilizando ensaios de imunohistoquímica (STERN et al., 1982, BARKHORDAR; DESOUZA, 1988, LUKIC et al., 1990, PIATTELLI et al., 1991, MATSUO et al., 1992, LIAPATAS et al., 2003) ou citometria de fluxo (SOL et al., 1998, VERNAL et al., 2006, COLIĆ et al., 2009, HREN; IHAN, 2009). Os resultados encontrados confirmam que a composição celular varia significativamente, dependendo do estágio de desenvolvimento e de progressão da lesão, das características histológicas das lesões, da presença ou ausência de sintomas clínicos e dos métodos utilizados para detecção e quantificação de células inflamatórias. Os achados mais frequentes são de que linfócitos T e plasmócitos representam a população predominante de células infiltradas (KOOP; SCHWARTING, 1989, SOL et al., 1998, COLIĆ et al., 2009).

O primeiro passo em nosso estudo foi realizar a fenotipagem celular do infiltrado inflamatório envolvido no desenvolvimento da periodontite apical crônica. Os resultados

demonstraram aumento no número de células inflamatórias isoladas das lesões de pacientes com periodontite apical em comparação a amostra controle (Figura 1A). A análise do fenótipo de tais células, através de citometria de fluxo, verificou que linfócitos T $CD3^+CD4^+$ foi a população predominante nas lesões, sendo detectado também a presença de linfócitos T $CD8^+$, células B e macrófagos (Figura 1B). O maior número de células inflamatórias observado no tecido periodontal de pacientes com periodontite apical crônica pode ser explicado pela persistência do agente agressor e a constante liberação de antígenos que induziriam a migração permanente de células inflamatórias para o foco da infecção. Os resultados obtidos corroboraram com diversos estudos que se propuseram a avaliar a composição celular do infiltrado inflamatório presente em lesões periapicais (TORABINEJAD; KETTERING, 1985, JONTELL; GUNRAJ; BERGENHOL, 1987, STASHENKO; YU, 1989, OKIJI et al., 1992, ALAVI; GULABIVALA; SPEIGHT, 1998, RODINI; LARA, 2001, LIAPATAS et al., 2003, COLIĆ et al., 2009).

Como esperado, os resultados mostraram uma alta concentração de linfócitos T $CD4^+$ em pacientes com periodontite apical crônica, mas sem diferença significativa em relação ao grupo controle para linfócitos T $CD8^+$, linfócitos B e macrófagos. Entretanto, resultados conflitantes a respeito da subpopulação predominante de linfócitos T em lesões periapicais têm sido relatados (KONTIAINEN et al., 1986, KOPP et al., 1987, BARKHORDAR; DESOUZA, 1988, MÁRTON; KISS, 1993, SOL et al., 1998). A composição do infiltrado celular não é estática ao longo do curso da doença, podendo variar dependendo do estágio de desenvolvimento. Estudos imunohistoquímicos em lesões periapicais induzidas em ratos confirmaram que células T $CD4^+$ predominam nas fases iniciais de desenvolvimento da lesão, enquanto que na fase crônica de estabilização da lesão há uma maior presença de células T $CD8^+$ (STASHENKO; YU, 1989, KAWASHIMA et al., 1996). As diferenças entre nossos resultados e os encontrados na literatura podem ser devido a metodologia empregada para a quantificação e determinação das células presentes nas lesões.

Após identificar a presença e determinar as subpopulações de leucócitos, procedeu-se à identificação de moléculas de superfície nos linfócitos com o objetivo de investigar a participação de células T e de moléculas coestimulatórias na imunomodulação da periodontite apical crônica. A resposta imune antígeno-específica é caracterizada por reconhecimento do antígeno, ativação, proliferação e diferenciação em células efectoras e de memória (MCKINSTRY; STRUTT; SWAIN, 2008, ZHU; PAUL, 2008, MURPHY; STOCKINGER, 2010). Estudos

fenotípicos utilizam a combinação de diferentes marcadores para caracterizar as células em efetoras e de memória, tais como a alta expressão de CD45RO, combinada com a baixa expressão da molécula CD62L e dos marcadores de ativação CD25 e CD69 (DUTTON et al., 1998). Neste contexto, a identificação de importantes moléculas de superfície envolvidas na modulação da resposta de células T torna-se fundamental para o entendimento da progressão da periodontite apical crônica.

Recentemente, evidências têm emergido demonstrando que a molécula coestimulatória CD28 é um modulador crucial da ativação de células T, uma vez que fornece o estímulo adicional para a produção de IL-2 e a expressão de seu receptor (IL-2R) (SPERILING; BLUESTONE, 1996). CTLA-4 está claramente estabelecida como um regulador negativo da resposta imune. O bloqueio de CTLA-4, pela administração de anticorpos solúveis, leva ao aumento da resposta de células T *in vitro* (KRUMMEL; ALLISON, 1995). Embora os mecanismos de controle pelos quais CTLA-4 participa da resposta imune não estejam totalmente elucidados, sabe-se que o sinal mediado por esta molécula inibe os efeitos da ligação de CD28, ou seja, bloqueia a produção de IL-2, a expressão da cadeia α do receptor de IL-2 e de CD69 e a progressão do ciclo celular (CHAMBERS et al., 1996, WATERHOUSE et al., 1996). A ligação de CTLA-4 leva também à produção de TGF- β , que estaria diretamente implicado na inibição da proliferação dos linfócitos (CHEN et al., 1998). Considerando estas informações, juntamente com as que demonstraram que o bloqueio de CTLA-4 promove um aumento da resposta contra diferentes patógenos (MURPHY et al., 1998, SAHA et al., 1998, KIRMAN et al., 1999, CAMPANELLI et al., 2003) podemos supor que CTLA-4 poderia exercer papel regulador também na periodontite apical crônica, em associação ou não com a expressão de CD28.

Os resultados encontrados em nosso estudo demonstraram que a frequência de células CD25⁺ e CD45RO⁺ foi maior na subpopulação de linfócito T CD3⁺CD4⁺ isolada das lesões de pacientes com periodontite apical crônica (Figura 2B). A expressão destes marcadores em linfócitos T CD3⁺CD4⁺ pode estar associada com células T reguladoras (GASPAROTO et al., 2010). As células T reguladoras têm importante papel na supressão da resposta imune (AKBAR et al., 2007). Dentre os mecanismos desempenhados pelos linfócitos T reguladores estão à produção de citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF- β e o contato célula-célula, o qual pode envolver a expressão de coreceptores como, por exemplo, CTLA-4 (McGEE; AGRAWAL, 2006, STRAUSS et al., 2007, POLANCZYK et al., 2007). De fato, verificamos que as lesões

periapicais apresentaram níveis elevados de IL-10 e TGF- β (Figura 4 A e B). Além disso, a expressão de CTLA-4 foi aumentada tanto nos linfócitos T CD3⁺CD4⁺ quanto em linfócitos T CD3⁺CD8⁺ (Figura 2 B e D). Como CTLA-4 é uma molécula inibitória capaz de se ligar em moléculas B7-1 e B7-2 expressas em células apresentadoras de antígeno, desencadeando sinalização inibitória na ativação das células T, a alta expressão de CTLA-4 no foco da infecção pode estar relacionada com a inibição de ativação das células T nas lesões de pacientes com periodontite apical crônica.

Vias alternativas podem estar relacionadas com os mecanismos de regulação da resposta imune. A molécula de PD-1 tem sido amplamente estudada pelo seu importante papel na inativação de células T (ISHIDA et al., 1992, SHINOHARA et al., 1994, VIBHAKAR et al., 1997, GREENWALD et al., 2005). A associação do PD-1 com seus ligantes PD-L1 e PD-L2 inibe a produção de IL-2 e a proliferação de células T (CARTER et al., 2002), o que compromete negativamente sua função efetora. Além disso, estudos demonstraram que a ação do IFN- γ induz a expressão de PD-L1, sugerindo um possível papel desses ligantes na regulação da resposta Th1 e Th2 (LIANG et al., 2003, LOKE; ALLISON, 2003).

Como demonstrado na caracterização dos linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ detectou-se alta percentagem de células positivas para PD-1 (Figura 3 A e C). A presença de grande quantidade de linfócitos T CD4⁺PD-1⁺ tem sido associada a um estado crônico de estimulação dos linfócitos, levando a exaustão destas células (HIRANO et al., 2005, ALDERSON et al., 2008, FRANCISCO et al., 2009, BROWN et al., 2010, FRANCISCO; SAGE; SHARPE, 2010). A alta expressão dessas moléculas inibitórias, particularmente PD-1, correlacionar-se-ia com a inibição de ativação de células T e a produção de citocinas como, por exemplo, IFN- γ e IL-10. Em concordância com essa suposição, nossos resultados de expressão de citocinas *in situ* revelaram alta produção de IL-10 nas lesões de pacientes com periodontite apical (Figura 4B).

Outro achado, que poderia apontar para uma possível exaustão de células T no foco da infecção, seria os resultados para expressão de PD-L1. Em condições de homeostasia, a molécula inibitória PD-L1 é expressa em células apresentadoras de antígenos e em tecidos não linfóides, como coração e pulmões. Os níveis de PD-L1 e das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 presentes em células apresentadoras de antígenos são personagens importantes na extensão de ativação das células T e, conseqüentemente, no limiar entre tolerância e autoimunidade

(FREEMAN et al., 2000). Em situações de doença, é sabido que PD-L1 contribui para a manutenção de doenças virais (BROOKS et al., 2008). Em nosso estudo, PD-L1 foi detectado em linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ e em mais de 90% dos macrófagos (CD14⁺) isolados das lesões de pacientes com periodontite apical crônica (Figura 3E). De fato, dados recentes apontam para alta expressão de PD-L1 em macrófagos (LOKE; ALLISON, 2003) e estas células são encontradas em grande número em lesões de pacientes com periodontite apical (TAKAHASHI, 1998). Assim, a presença de leucócitos expressando PD-1 e PD-L1 em pacientes com periodontite apical crônica pode afetar os mecanismos de defesa do hospedeiro favorecendo a persistência e progressão da doença.

Outro aspecto importante para maior elucidação da modulação da resposta imune na periodontite apical crônica é a identificação e dosagem de citocinas. Uma das possíveis vias de regulação da resposta inflamatória na periodontite apical seria a produção de citocinas pelas diferentes subpopulações de linfócitos T auxiliares (Th), que atuariam atenuando ou potencializando a reação inflamatória nos tecidos periodontais e desta forma, determinando a atividade ou latência da lesão periapical (HREN; IHAN, 2009, TEIXEIRA-SALUM et al., 2009). As respostas mediadas por linfócitos Th podem exibir um padrão Th1, que consiste de uma resposta imune celular e pró-inflamatória, ou um padrão do tipo Th2, com características anti-inflamatórias e de resposta imune predominantemente humoral. Estudos anteriores que avaliaram a expressão de citocinas nas lesões periapicais demonstraram que linfócitos Th1 produzem IL-2, IFN- γ , TNF- β e linfócitos Th2 são produtores de IL-4, IL-5 e IL-10 (WALKER et al., 2000, LIAPATAS et al., 2003).

IFN- γ apresenta diversos efeitos no sistema imune, sendo a principal citocina ativadora de macrófagos, estimulando a fagocitose, captação e apresentação de antígenos, produção de citocinas inflamatórias e mediadores antimicrobianos, como óxido nítrico (BOGDAN, 2000, BOGDAN, 2001, SZABO et al., 2003). A persistência da agressão bacteriana leva a constante liberação de IFN- γ pelo hospedeiro, contribuindo para a permanência do quadro inflamatório (GARLET et al., 2006). A IL-10 apresenta propriedades anti-inflamatórias reduzindo a expressão de moléculas coestimulatórias em células apresentadoras de antígenos e inibindo a síntese de citocinas inflamatórias e Th1 por células T, NK e macrófagos (HSU et al., 1992; ROUSSET et al., 1992; MOORE et al., 1993; HAMILTON et al., 1999; PESTKA et al., 2004). Tal citocina está geralmente associada a uma significativa redução na reação inflamatória e a produção de IL-10

pode prejudicar a eliminação de agentes infecciosos levando a latência de infecções (BELKAID et al., 2002, MITTRUCKER; KAUFMANN, 2004, SAKAGUCHI et al., 2004). Em nossos resultados foram detectados altos níveis de IL-10 e INF- γ indicando que ambas desempenham importante papel na patogênese da periodontite apical crônica.

TGF- β é uma citocina pleiotrópica pertencente ao grupo das células T reguladoras (Treg), que são citocinas que regulam a indução e a atividade das células T efectoras controlando respostas imunes exacerbadas (DUTZAN et al., 2009) e atuando no metabolismo do tecido conjuntivo (BABEL et al., 2006). Apresenta papel modulador, aumenta o reparo cicatricial, acelera a remodelação de tecido conjuntivo e promove a angiogênese. A ausência de TGF- β provavelmente contribui para maior destruição tecidual (BABEL et al., 2006). Nossos resultados apresentaram alta positividade para TGF- β na periodontite apical crônica. Os níveis elevados dessa citocina estariam ocorrendo não somente como forma de modular a resposta inflamatória frente à persistente agressão bacteriana, mas também para minimizar a extensão do tecido lesado durante a evolução da doença (CARDOSO et al., 2008).

Algumas citocinas, como TNF- α , estimulam a produção local de quimiocinas que atuam na amplificação e manutenção da resposta inflamatória local, além de exercer papel relevante na osteoclastogênese estimulando a reabsorção e inibindo a formação óssea (GRAVES et al., 2003, KWAN TAT et al., 2004). Esta citocina age em várias fases dos mecanismos de recrutamento do leucócito, induzindo o aumento de produção de moléculas de adesão e a produção de quimiocinas e metaloproteinases da matriz (MMP) (PFIZENMAIER; WAJANT; GRELL, 1996, DINARELLO, 2000). Além disso, TNF- α estimula a apresentação de antígenos, a expressão de moléculas coestimulatórias e a atividade bactericida dos fagócitos (GARLET et al., 2006). Estudos corroboraram com nossos resultados apresentando alta positividade para TNF- α nas reações inflamatórias periapicais (ATAOGLU et al., 2002, TEIXEIRA-SALUM et al., 2010). Macrófagos podem ser estimulados por TNF- α a produzirem óxido nítrico, outra molécula implicada à reabsorção óssea (GARLET et al., 2006).

Óxido nítrico parece ser uma importante molécula reguladora na remodelação óssea e está envolvido no processo de reabsorção que ocorre em doenças como periodontite, artrite reumatóide e osteoartrite (CHAE et al., 1997). Óxido nítrico tem demonstrado exercer um efeito bifásico no processo de reabsorção óssea. Em altas concentrações, tem um efeito de atividade osteoblástica, ao passo que em baixa concentração pode estimular a reabsorção óssea

(RAUSTON et al., 1995, TAKEICHI et al., 1998). O NO é um radical livre produzido a partir do aminoácido L-arginina através da ação de isoenzimas, globalmente denominadas NO sintetases (NOS). Quando o NO é localmente produzido em altas concentrações, pode agir como molécula citotóxica contra células infectadas e sadias resultando em extensa destruição tecidual. A expressão da enzima iNOS e a produção de NO encontram-se elevadas no periodonto em estado de doença (MATEJKA et al., 1998, LAPPIN et al., 2000, HIROSE et al., 2001, BATISTA et al., 2002). Adicionalmente, a capacidade de células inflamatórias em expressar iNOS, bem como sintetizar e secretar NO, foi evidenciada a partir de amostras de lesões periapicais inflamatórias crônicas e de exsudatos inflamatórios coletados de sítios com reabsorção óssea e inflamação crônica (LIN et al., 2007).

Outro fator que contribui intensamente para a destruição dos tecidos apicais que podemos observar na periodontite apical crônica são as enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A mieloperoxidase (MPO), uma espécie reativa de oxigênio, é produzida por neutrófilos e armazenada em seus grânulos primários. No foco da infecção, a MPO é liberada nos fagossomos e, junto com a elastase, participa da degradação da bactéria. MPO contribui na defesa do hospedeiro e também é capaz de limitar oxidativamente a elastase, controlando assim possíveis danos teciduais provocados pela liberação da elastase (BELAAOUAJ, 2002). A presença de MPO em tecidos periodontais doentes tem sido relatada em diversos estudos, mas normalmente investigada como um marcador do nível de inflamação local (YAMALIK et al., 2000, LISKMANN et al., 2004). Em nosso estudo também foram encontradas altas doses de NO e MPO nas lesões periapicais avaliadas indicando que estes mediadores estão potencialmente envolvidos no controle da infecção periapical.

Embora exista um vasto conhecimento científico a respeito do tratamento das infecções endodônticas, estudos ainda precisam ser realizados para um melhor conhecimento sobre os eventos biológicos envolvidos no desenvolvimento da periodontite apical crônica. O conhecimento sobre o papel das moléculas coestimulatórias na imunopatogênese da periodontite apical servirá de base para o direcionamento de novas estratégias de prevenção, assim como o desenvolvimento de novos procedimentos terapêuticos.

7 Conclusão

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nas condições experimentais utilizadas neste estudo podemos concluir que:

1. Pacientes com periodontite apical crônica apresentam aumento no número de células nos tecidos apicais, sendo Linfócitos T $CD3^{+}CD4^{+}$ a população celular predominante.
2. A expressão de moléculas coestimulatórias CTLA-4 e PD-1 encontra-se aumentada em células T de pacientes com periodontite apical crônica.
3. Os níveis das citocinas TGF- β , IL-10, TNF- α e IFN- γ encontram-se aumentados nos tecidos apicais de pacientes com periodontite apical crônica.
4. Pacientes com periodontite apical crônica apresentam altos níveis de atividade de mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico (NO).

Referências Bibliográficas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996;8(5):765-72.

Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, et al. Cytokines and transcription factors regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol*. 2003;23(3):147-61.

Akamine A, Anan H, Hamachi T, Maeda K. A histochemical study of the behavior of macrophages during experimental apical periodontitis in rats. *J Endod*. 1994;20(10):474-8.

Akbar AN, Vukmanovic-Stejić M, Taams LS, Macallan DC. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4⁺ T cells in the periphery. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(3):231-7.

Alavi AM; Gulabivala K, Speight PM. Quantitative analysis of lymphocytes and their subsets in periapical lesions. *Int Endod J*. 1998;31(4):233-41.

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

Babel N, Cherepnev G, Babel D, Tropmann A, Hammer M, Volk HD, et al. Analysis of tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β , Interleukin- 10, IL-6 and Interferon- γ gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2006;77(12):1978-83.

Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*. 2000;2(10):1181-92.

Baker PJ, Garneau J, Howe L, Roopenian DC. T-cell contributions to alveolar bone loss in response to oral infection with *Porphyromonas gingivalis*. *Acta Odontol Scand*. 2001;59(4):222-5.

Barkhordar RA; Desouza YG. Human T-lymphocyte subpopulations in periapical lesions. *Oral surg*. 1988;65(6):763-6.

Bartova J, Kratka-Opatrna Z, Prochazkova J, Krejsa O, Duskova J, Mrklas L, et al. Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings. *Mediators inflamm*. 2000;9(2):115-20.

Bastos KR, Marinho CR, Barboza R, Russo M, Alvarez JM, D'Imperio Lima MR. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Microbes and Infection / Institut Pasteur*. 2004;6(6):630-6.

Batista A. Avaliação da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em gengivites associadas a placa dentobacteriana e periodontites crônicas localizadas [tese]. Bauru(SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2001.

Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Dis*. 2002;8(1):254-60.

Belaaouaj A. Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis. *Microbes Infect*. 2002;4(12):1259-64.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature*. 2002;420(6915):502-7.

Berglundh T, Liljenberg B, Lindhe J. Some cytokine profiles of T-helper cell in lesions of advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002;29(8):705-9.

Bogdan C. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Current opinion in immunology*. 2000;12(4):419-24.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat immunol*. 2001;2(10):907-16.

Brombacher F, Kastelein RA, Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends immunol*. 2003;24(4):207-12.

Brooks DG, Ha SJ, Elsaesser H, Sharpe AH, Freeman GJ, Oldstone MBA. IL-10 and PD-L1 operate through distinct pathways to suppress T-cell activity during persistent viral infection. *PNAS*. 2008;105(51):20434-9.

Brown KE, Freeman GJ, Wherry EJ, Sharpe AH. Role of PD-1 in regulating acute infections. *Curr Opin Immunol*. 2010; 22(3):397-401.

Brubaker JO, Montaner LJ. Role of interleukin-13 in innate and adaptive immunity. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2001;47(4):637-51.

Cabrini RL, Barros RE, Albano H. Cysts of the jaws: a statistical analysis. *J Oral Surg*. 1970; 28(7-12):485-9.

Caliskan MK, Türkün M. Periapical repair and apical closure of a pulpless tooth using calcium hydroxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997;84(6):683-7.

Campanelli AP. Modulação da resposta imune e resposta granulomatosa durante a infecção pelo *P. brasiliensis* [tese]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2003.

Campanelli AP, Martins GA, Souto JT, Pereira MS, Livonesi MC, Martinez R, et al. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T Lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. *J Infect Dis*. 2003; 187(9):1496-505.

Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodskyn CI, et al. CD4⁺CD25⁺ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis.* 2006;193(9):1313-22.

Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Júnior WM, Rossi MA, Silva JS. Characterization of CD4⁺CD25⁺ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol.* 2008;84(1):311-8.

Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:29-53.

Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, et al. PD-1 :PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells is overcome by IL-2. *Eur J Immunol.* 2002;32(3):634-43.

Chae HJ, Park RK, Chung HT, Kang JS, Kim MS, Choi DY, et al. Nitric oxide is a regulator of bone remodelling. *J Pharm Pharmacol.* 1997;49(9):897-902.

Chakravorty D, Hensel M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes and Infection / Institut Pasteur.* 2003;5(7):621-7.

Chambers CA, Krummel MF, Boitel B, Hurwitz A, Sullivan TJ, Fournier S, et al. The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses. *Immunol Rev.* 1996;153:27-46.

Chen W, Jin W, Wahl SM. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. *J Exp Med.* 1998;188(10):1849-57.

Cheung GS. Endodontic failures - changing the approach. *Int Dent J.* 1996;46(3):131-8.

Cohen S; Burns RC. *Pathways of the pulp.* 6 ed. St. Louis: Mosby, 1994.

Colić M, Gazivoda D, Vucević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol.* 2009; 47(1):101-113

Consolaro A; Ribeiro FC. Periapicopatias: Etiopatogenia e interrelações dos aspectos clínicos, radiográficos e microscópicos e suas implicações terapêuticas. In: Leonardo MR, Leal JM. *Endodontia: Tratamento de canais radiculares.* 3 ed. São Paulo: Panamericana, 1998, p.77-102.

Cooper AM, Kipnis A, Turner J, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *J Immunol.* 2002;168(3):1322-7.

Cutler CW, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol.* 2004;35:135-57.

Cymerman JJ, Cymerman DH, Waltes J, Nevins AJ. Human T Lymphocyte subpopulations in chronic periapical lesions. *J Endod.* 1984;10(1):9-11.

Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006;443(7109):350-4.

Danin J, Linder LE, Lundqvist G, Andersson L. Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1 in chronic periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000;90(4):514-7.

Dinarello C. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000;188(2):503-8.

Dixon DR, Bainbridge BW, Darveau RP. Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontol* 2004;35:53-74.

Dohlsten M, Sjögren HO, Carlsson R. Histamine acts directly on human T cells to inhibit interleukin-2 and interferon-gama production. *Cell Immunol*. 1987;109(1):65-74.

Dubey C, Croft M, Swain SL. Naïve and effector CD4 T cells differ in their requirements for T cell receptor versus costimulatory signals. *J Immunol*. 1996;157(8):3280-9.

Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:201-23.

Dutzan N; Gamonal J, Silva A, Sanz M, Vernal R. Over-expression of forkhead Box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-k B ligand, interleukin (IL) – 17, IL-10 and transforming growth factor- β during the progression of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009;36(5):396-400.

Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, Happonen RP, Moller AJ. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(4):278-85.

Figueiredo CRLV, Santos JN, Albuquerque J, Cavalcanti RL. Immunopathological mechanisms involved in the growth and expression of radicular cysts. *RPG*. 1999;6(2):180-7.

Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009; 206(13):3015-29.

Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010; 236:219-42.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation, *J Exp Med*. 2000;192(7):1027-34.

Freeman GJ, Sharpe AH. The B-7 – CD28 Superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(2):116-26.

Gadre KS, Zubairy RA. Aneurysmal bone cyst of the mandibular condyle: report of a case. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;58(4):439-43.

Gallego RD, Torres LD, Garcia CM, Romero RMM, Infante CP, Gutiérrez PJL. Differential diagnosis and therapeutic approach to periapical cysts in daily dental practice. *Med Oral*. 2002;7(1):54-8.

Garlet GP, Cardoso CRB, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor- α receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol*. 2006;147(1):128-38.

Gasparoto TH, de Souza Malaspina TS, Benevides L, de Melo EJ Jr, Costa MR, Damante JH, et al. Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother*. 2010; 59(6):819-28.

Gause WC, Halvorson MJ, Lu P, Greenwald R, Lindsey P, Urban JF, et al. The function of costimulatory molecules and the development of IL-4-producing T cells. *Immunol Today*. 1997;18(3):115-20.

Gemmell E, Seymour GJ. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. *J Dent Res*. 1998;77(1):16-26.

Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2004;35:21-41.

Gemmell E, Carter CL, Seymour GJ. Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clin Exp Immunol*. 2001;125(1):134-41.

Gomez RS, Figueiredo PF, Capistrano HM, Loyola AM. Levantamento das biópsias bucais realizadas na Faculdade de Odontologia da UFMG. *Arq Centr Est Odont B Hor*. 1992;29(2):105-113.

Gordon S, Perry VH, Rabinowitz S, Chung LP, Rosen H. Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. *J Cell Sci Suppl*. 1988;9:1-26.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003;74(3):391-401.

Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:515-48.

Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*. 2000;404(6776):407-11.

Guimarães SAC. Patologia básica da cavidade bucal. 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo JM. Regulation of chemokine expression by anti-inflammatory cytokines. *Immunol Res.* 2002;25(3):229-45.

Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo JM, Kishore R. Regulation of macrophage gene expression by pro and anti-inflammatory cytokines. *Pathobiology.* 1999;67(5-6):241-4.

Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res.* 2005;65(3):1089-96.

Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. *J Periodontol.* 2001;72(5):590-7.

Hren NI, Ihan A. T lymphocyte activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts. *Arch Oral Biol.* 2009;54(2):156-61.

Hsu DH, Moore KW, Spits H. Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-12 induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. *Int Immunol.* 1992;4(5):563-9.

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992;11(11):3888-95.

Ishida M, Iwai Y, Tanaka Y, Okazaki T, Freeman GJ, Minato N, et al. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett.* 2002;84(1):57-62.

Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med.* 2003;198(1):39-50.

Jarnicki AG, Fallon PG. T helper type-2 cytokine responses: potential therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol.* 2003;3(4):449-55.

Johannessen AC, Nilsen R, Skaug N. Deposits of immunoglobulins and complement factor C3 in human dental periapical inflammatory lesions. *Scand J Dent Res.* 1983;91(3):191-9.

Jontell M, Gunraj MN, Bergenhol TZG. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. *J Dent Res.* 1987;66(6):1149-53.

Kabashima H, Yoneda M, Nagata K, Hirofuji T, Ishihara Y, Yamashita M, et al. The presence of chemokine receptor (CCR5, CXCR3, CCR3)-positive cells and chemokine (MCP1, MIP-1alpha, MIP-1 beta, IP-10)-positive cells in human periapical granulomas. *Cytokine.* 2001;16(2):62-6.

Kakehashi S, Staley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20:340-9.

Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J Endod*. 1996;22(6):311-6.

Kinane DF, Lappin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand*. 2001;59(3):154-60.

King CL, Xianli J, June CH, Abe R, Lee KP. CD28-deficient mice generate an impaired TH2 response to *Schistosoma* infection. *Eur J Immunol*. 1996;26(10):2448-55.

Kirman J, McCoy K, Hook S, Prout M, Delahunt B, Orme I, et al. CTLA-4 blockade enhances the immune response induced by mycobacterial infection but does not lead to increased protection. *Infect Immun*. 1999;67(8):3786-92.

Kojima K, Inamoto K, Nagamatsu K, Hara A, Nakata K, Morita I, et al. Success rate of endodontic treatment of teeth with vital and non vital pulps. A meta-analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97(1):95-9.

Konttinen S, Ranta H, Lautenschlager I. Cells infiltrating human periapical inflammatory lesions. *J Oral Pathol*. 1986;15(10):544-6.

Kopp W, Schwarting R. Differentiation of T lymphocyte subpopulations, macrophages, and HLA-DR-restricted cells of apical granulation tissue. *J Endod*. 1989;15(2):72-5.

Koop W, Schwarting R, Gerdes J. Immunological processes in apical granulation tissue. 3. Nonspecific immunity. Immunohistological representation of mononuclear phagocytes and polymorphonuclear granulocytes. *Dtsch Zahnarztl Z*. 1987;42(9):841-6.

Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995;182(2):459-65.

Kuc I, Peters E, Pan J. Comparison of clinical and histologic diagnoses in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000; 89(3):333-7.

Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: Interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(1):49-60.

Lalonde ER, Luebke RG. The frequency and distribution of periapical cysts and granulomas: an evaluation of 800 specimens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1968;25(2): 861-8.

Lappin DF, Kjeldsen M, Sander L, Kinane DF. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2000;35(6):369-73.

Lappin DF, Macleod CP, Kerr A, Mitchell T, Kinane DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clin Exp Immunol*. 2001;123(2):294-300.

Ledesma-Montes C, Hernández-Guerrero JC, Garcés-Ortiz M. Clinico-pathologic study of odontogenic cysts in a Mexican sample population. *Arch Med Res*. 2000; 31(4): 373-6.

Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares. Princípios técnicos e biológicos. Volumes 1 e 2. São Paulo: Artes Médicas; 2008.

Leonardo MR, Rossi MA, Silva LAB, Ito IY, Bonifácio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod*. 2002; 28(12):815-8.

Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczack MF, Horwitz BH, Freeman GJ, et al. Regulation of PD-1, PD-L1 and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol*. 2003;33(10):2706-16.

Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J*. 2003;36(7):464-71.

Lin SK, Kok SH, Lin LD, Wang CC, Kuo MYP, Lin CT, et al. Nitric oxide promotes the progression of periapical lesion via inducing macrophage and osteoblast apoptosis. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22:24-9.

Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med*. 1992; 176(6):1595-604.

Liskmann S, Zilmer M, Vihalemm T, Salum O, Fischer K. Correlation of peri-implant health and myeloperoxidase levels: A cross-section clinical study. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(5):546-52.

Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulatory by Th1 and Th2 cells. *PNAS*. 2003;100(9):5536-41.

Lukic A, Arsenijevic N, Vujanic G, Ramic Z. Quantitative analysis of the immunocompetent cells in periapical granuloma: correlation with the histological characteristics of the lesions. *J Endod*. 1990; 16(3):119-22.

MacMicking J, Xie Q, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:114-27.

Martins GA, Campanelli AP, Silva RB, Tadokoro CE, Russo M, Cunha FQ, et al. CD28 is required for T cell activation and IFN-gama production by CD4+ and CD8+ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2004;6(13):1133-44.

Márton IJ; Kiss C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. *Int Endod J*. 1993; 26(2):131-6.

Márton IJ, KISS C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;5(3):139-50.

- Matejka M, Partykal L, Ulm C, Solar P, Sinzinger H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1998;33(8):517-8.
- Matsuo T, Ebisu S, Shimabukuro Y, Ohtake T, Okada H. Quantitative analysis of immunocompetent cells in human periapical lesions: correlations with clinical findings of the involved teeth. *J Endod.* 1992;18(10):497-500.
- McGee HS, Agrawal DK. Th2 cells in the pathogenesis of airway remodeling: regulatory T cells a plausible panacea for asthma. *Immunol Res.* 2006; 35(3):219-32.
- McKinstry KK, Strutt TM, Swain SL. The effector to memory transition of CD4 T cells. *Immunol Res.* 2008; 40(2):114-127.
- Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 2000;16(1):1-8.
- Mittrucker HW, Kaufmann SH. Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited. *Eur J Immunol.* 2004;34(2):306-12.
- Möller AJR, Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.* 1981; 89(6): 475-84.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1992;43(2):109-41.
- Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *New Engl J Med.* 1993;329(27):2002-12.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:165-90.
- Mortensen H, Winther JE, Birn H. Periapical granulomas and cysts: an investigation of 1600 cases. *Scand J Dent Res.* 1970;78(3):241-50.
- Moughal NA, Adonogianaki E, Thornhill MH, Kinane DF. Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally induced gingivitis. *J Periodontol Res.* 1992;27(6):623-30.
- Murphy ML, Cotterell SE, Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen, *Leishmania donovani*. *J Immunol.* 1998;161(8):4153-60.
- Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(12):933-44.
- Murphy KM, Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol.* 2010; 11(8): 674-80.
-

Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(6):348-81.

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

Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Sundqvist G. Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. *J Endod*. 1990;16(12):589-95.

Nair PNR, Sjögren U, Fidgor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;87(5):617-27.

Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsi H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001;12(1):53-72.

Neaverth EJ, Burg HA. Decompression of large periapical cyst lesions. *J Endod*. 1982;8(4):175-82.

Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Ann Rev Immunol*. 1999;17:701-38.

Neville EJ, Damm DD, Allen CM, Bouquot, JE. Doenças da polpa e do periápice. In: *Patologia Oral & Maxilofacial*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.93-118.

Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature. Part 1: effects of study characteristics on probability of success. *Int Endod J*. 2007; 40(12):921-39.

Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature. Part 2: influence of clinical factors. *Int Endod J*. 2008; 41(1):6-31.

Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11(2):141-51.

Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*. 2001;291(5502):319-22.

Noel PJ, Boise LH, Green JM, Thompson CB. CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J Immunol*. 1996;157(2):636-42.

Ohman L, Maluszynska G, Magnusson KE, Stendahl O. Surface interactions between bacteria and phagocytic cells. *Prog Drug Res* 1988; 32: 131-47.

- Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J et al. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1 deficient mice. *Nat Med.* 2003;9(12):1477-83.
- Okiji T, Kawashima N, Kosaka T, Matsumoto A, Kobayashi C, Suda H. An immunohistochemical study of the distribution of immunocompetent cells, especially macrophages and antigen-expressing cells of heterogeneous populations, in normal rat molar pulp. *J Dent Res.* 1992;71(5):1196-202.
- Ørstavik D, Pitt-Ford TR. Apical periodontitis: microbial infection and host responses. In: Ørstavik D, Pitt-Ford TR. *Essential Endodontology*. Oxford: Blackwell Science; 1998, p.1-8.
- Oswald IP, Gazzinelli RT, Sher A, James SL. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol.* 1992;148(11):3578-82.
- Paiva JG; Antoniazzi JH. Etiopatogenia das alterações periapicais. In: *Endodontia: base para a prática clínica*. Artes Médicas. 1988. p.77-89.
- Palossaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjardervane L, Salo H. Expressions profile of matrix metalloproteinase (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(2):117-27.
- Park SH, Hsiao GY, Huang GT. Role of substance P and calcitonin gene-related peptide in the regulation of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression in human dental pulp. *Int Endod J.* 2004;37(3):185-92.
- Pereira FA. Estudo histopatológico e radiográfico de lesões apicais. *CCS.* 1985;7(1):44-7.
- Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity.* 1997;6(4):411-7.
- Pesce C; Ferloni M. Apoptosis and Rushton body formation. *Histopathology.* 2002; 40(1):109-11.
- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:891-28.
- Petit MD, Hovenkamp E, Hamann D, Roos MT, van der Velden U, Miedema F, et al. Phenotypical and functional analysis of T cells in periodontitis. *J Period Res.* 2001;36(4):2001.
- Petroff MG, Chen L, Phillips TA, Azzola D, Sedlmayr P, Hunt JS. B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface. *Biol Reprod.* 2003;68(5):1496-504.
- Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med.* 2006;203(10):2281-92.
- Pfizenmaier K, Wajant H, Grell M. Tumor necrosis factor in 1996. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996;7(3):271-8.

- Piattelli A, Artese L, Rosini S, Quaranta M, Musiani P. Immune cells in periapical granuloma: morphological and immunohistochemical characterization. *J Endod.* 1991;17(1):26-9.
- Polanczyk MJ, Hopke C, Vandenbark AA, Offner H. Treg suppressive activity involves estrogen-dependent expression of programmed death-1 (PD-1). *Int Immunol.* 2007; 19(3):337-43.
- Raitz R, Nardi H, Almeida TE, Araújo VC. Cisto radicular: uma análise epidemiológica de 1507 casos. *RPG.* 2000;7(1):27-30.
- Ralston SH, Ho LP, Helfrich MH, Grabowski OS, Johnston PW, Benjamin N. Nitric oxide: A cytokine-induced regulator of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 1995;10(7):1040-9.
- Regezi JA, Sciubba JJ. Cistos da boca. In: *Patologia Bucal: correlações clinicopatológicas*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.260-291.
- Ricucci D, Lin MN, Spångberg LS. Wound healing of apical tissues after root canal therapy: a long-term clinical, radiographic and histopathologic observation study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(4):609-21.
- Rocha CT, Rossi MA, Leonardo MR, Rocha LB, Nelson-Filho P, Silva LA. Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulps with or without radiographically evident apical pathosis. *Int Endod J.* 2008;41(8):664-9.
- Rocha MMNP, Moreira JLB, Menezes DB, Cunha MPSS, Carvalho CBM. Estudo bacteriológico de lesões periapicais. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 1998;12(3):215-23.
- Rodini CO, Lara VS. Study of the expression of CD68+ Macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(2):221-7.
- Rot A, Von Adrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:891-28.
- Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, et al. Interleukin-10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *PNAS.* 1992;89(5):1980-3.
- Saha B, Chattopadhyay S, Germond R, Harlan DM, Perrin PJ. CTLA4 (CD152) modulates the Th subset response and alters the course of experimental *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol.* 1998;28(12):4213-20.
- Sakaguchi E, Sakaida I, Okita K. Th1/Th2 balance in HCV-related liver cirrhosis and the effect of TGF-beta on Th1 response: possible implications for the development of hepatoma. *Nippon Rinsho.* 2004;62 Suppl7(Pt1):175-8.
- Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today.* 1998;19(12):568-74.

- Santa Cecília M, Favieri A, Aroeira RAL. Displasia cementária periapical, conseqüências de diagnóstico incorreto: relato de um caso. *Rev Bras Odontol*. 2000;57(1):10-1.
- Sathorn C, Parashos P, Messer HH. Effectiveness of single-versus multiple-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J*. 2005; 38(6): 347-55.
- Satorres NM, Faura SM, Brescó SM, Berini AL, Gay EC. Prevalence of biopsied oral lesions in a service of oral surgery. *Med Oral*. 2001;6(4):296-305.
- Scholl RJ, Kellett HM, Neumann DP, Laurie AG. Cysts and cystic lesions of the mandible: clinical and radiologic histopathologic review. *Radiographics*. 1999;19(5):1107-24.
- Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Act Odontol Scand*. 2001;59(3):167-73.
- Shafer WG, Hine MK, Levy BM. A textbook of oral pathology. 4ed. Philadelphia: WB Saunders, 1983.
- Shah N. Nonsurgical management of periapical lesions: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1988;66(3):365-71.
- Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*. 2007;8(3):239-45.
- Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics*. 1994;23(3):704-6.
- Sicher SC, Vazquez MA, Lu CY. Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide. *J Immunol*. 1994;153(3):1293-300.
- Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007;86(4):306-19.
- Sinan AY, Aker H, Mustaf ZT, Ahmet M, Tuncer E. Cholesterol granuloma formation in apical periodontal cyst. *Chin Med J*. 2002;115(3):103-10.
- Siqueira Júnior JF, Lopes HP. Endodontia. Biologia e Técnica. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997; 30(5):297-306.
- Soares IJ, Goldberg F. Reparo após o tratamento de canais radiculares. In: Endodontia: técnica e fundamento. São Paulo: Artmed, 2001. p.231-50.
-

- Sol MA, Tkaczuk J, Voigt JJ, Rand M, Sixou M, Maurette A, Thomsen, M. Characterization of lymphocyte subpopulations in periapical lesions by flow cytometry. *Oral Microbiol Immunol*. 1998;13(4):253-8.
- Souza LB, Pinto LP, Freitas RA. Cistos e granulomas periodontais apicais: análise de casos. *Estomat Cult*. 1985; 15(2):47-52.
- Souza ME, Torres MA, Duarte AHS, Sobral APV. Lesões periapicais: estudo epidemiológico. *RBPO*. 2003;2(1):39-46.
- Sperling AL, Bluestone JA. The complexities of T-cell co-stimulation: CD28 and beyond. *Immunol Rev*. 1996;153:155-82.
- Stashenko P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol*. 1990;6(3):89-96.
- Stashenko P, Teles R, Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(4):498-521.
- Stashenko P, Yu SM. T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. *J Dent Res*. 1989;68(5):830-4.
- Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod*. 1992;7(2):422-6.
- Stern MH, Dreizen S, Mackler BF, Levy BM. Isolation and characterization of inflammatory cells from the human periapical granuloma. *J Dent Res*. 1982;61(7):1408-12.
- Stetson DB, Voehringer D, Grogan JL, Xu M, Reinhardt RL, Scheu S, et al. Th2 cell: orchestrating barrier immunity. *Adv Immunol*. 2004;83:163-89.
- Stockdate CR, Chandler NP. The nature of the periapical lesions: a review of 1108 cases. *J Dent*. 1988;16(3):123-9.
- Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. A unique subset of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(15 Pt 1):4345-54.
- Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:713-58.
- Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J*. 1998;31(5):311-25.
- Takanashi K, Poole I, Kinane DF. Detection of interleukin-1 β mRNA-expressing cells in gingival crevicular fluid by *in situ hybridization*. *Arch Oral Biol*. 1995;40(3):941-7.

Takeichi O, Saito I, Hayashi M, Tsurumachi T, Saito T. Production of human-inducible nitric oxide synthase in radicular cysts. *J Endod.* 1998;24(3):157-60.

Takeichi O, Saito I, Okamoto Y, Tsurumachi T, Saito T. Cytokine regulation on the synthesis of nitric oxide in vivo by chronically infected human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology.* 1998;93(2):275-80.

Taylor-Robinson AW, Liew FY, Severn A, Xu D, McSorley SJ, Garside P, et al. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol.* 1994;24(4):980-4.

Teixeira-Salum TB, Rodrigues DBR, Gervasio AM, Souza CJA, Rodrigues Jr V, Loyola AM. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(3):250-6.

Teng YA. Protective and destructive immunity in periodontium: part 1- innate and humoral immunity and the periodontium. *J Dent Res.* 2006;85(3):198-208.

Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(4):237-52.

Tonetti MS, Imboden MA, Gerber L, Lang NP, Laissue J, Mueller C. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infect Immun.* 1994;62(9):4005-14.

Tonetti MS, Imboden MA, Lang NP. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *J Periodontol.* 1998;69(10):1139-47.

Torres JO, Torabinejad M, Matiz RA, Mantilha EG. Presence of secretory IgA in human periapical lesions. *J Endod.* 1994;20(2):87-9.

Torabinejad M; Kettering JD. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endod.* 1985;11(3):122-5.

Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med.* 2006;12(10):1198-202.

Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Hauang X, Slansky JE, Pai SI, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med.* 2001;193(7):839-46.

Tsurumachi T, Saito T. Treatment of large periapical lesions by inserting a drainage tube into the root canal. *Endod Dent Traumatol.* 1995;11(1):41-6.

Turka LA, Ledbetter JA, Lee K, June CH, Thompson CB. CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3+ mature lymphocytes. *J Immunol.* 1990;144(5):1646-53.

Underhill DM; Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:825-52.

Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, et al. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol.* 2006;80(22):11398-403.

Van Der Veen RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int Immunopharmacol.* 2001;1(8):1491-500.

Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, Chaparro A, Leon R, Chandia S, et al. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Dis.* 2006;12(3):283-9.

Vibhakkar R, Juan G, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Finger LR. Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T-lymphocytes. *Exp Cell Res.* 1997;232(1):25-8.

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

Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* 1994;1(5):405-13.

Waterhouse P, Marengere LE, Mittrucker HW, Mak TW. CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation. *Immunol Rev.* 1996;153(10):183-207.

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. *Science.* 1995;270(5238):985-8.

Wiendl H, Mitsdoerffer M, Schneider D, Melms A, Locuhmuller H, Hohlfeld R, et al. Muscle fibres and cultured muscle cells express the B7.1/2-related inducible co-stimulatory molecule, ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Brain.* 2003;126(5):1026-35.

Wright KM, Friedland JS. Regulation of chemokine gene expression and secretion in *Staphylococcus aureus*-infected osteoblasts. *Microbes and Infection / Institut Pasteur.* 2004;6(9):844-52.

Wu MK, Shemesh H, Wesselink PR. Limitations of previously published systematic reviews evaluating the outcome of endodontic treatment. *Int Endod J.* 2009;42(8):656-66.

Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev.* 2004; 4(8):583-94.

- Yamalík N, Cagloyan F, Kiliñç A, Tumer C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. *J periodontol*. 2000; 71(3):460-7.
- Yamashita U, Kuroda E. Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production. *Crit Rev Immunol*. 2002;22(2):105-14.
- Yamazaki K, Nakajima T, Hara K. Immunohistological analysis of T cell functional subsets in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Exp Immunol*. 1995;99(3):348-91.
- Yamazaki K, Yoshie H, Seymour GJ. T cell regulation of the immune response to infection in periodontal disease. *Histol Histopathol*. 2003;18(3):889-96.
- Yanagisawa S. Pathologic study of periapical lesions 1. Periapical granulomas: clinical, histopatologic and immunohistopathologic studies. *J Oral Pathol*. 1980;9(5):288-300.
- Yu SM, Stashenko P. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. *J Endod*. 1987;13(11):535-40.
- Yu X, Graves DT. Fibroblasts, mononuclear phagocytes, and endothelial cells express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflamed human gingiva. *J Periodontol*. 1995;66(1):80-8.
- Zhou M, Ouyang W. The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunol Res*. 2003;28(1):25-37.
- Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008; 112(5):1557-69.
-