**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

RAPHAEL JURCA GONÇALVES DA MOTTA

**Estudo clínico-patológico da distribuição de linfócitos
citotóxicos e linfócitos T regulatórios na doença periodontal**

Ribeirão Preto

2017

RAPHAEL JURCA GONÇALVES DA MOTTA

**Estudo clínico-patológico da distribuição de linfócitos
citotóxicos e linfócitos T regulatórios na doença periodontal**

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa de Pós-Graduação, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Tirapelli

**Ribeirão Preto
2017**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central do
Campus USP-Ribeirão Preto

da Motta, Raphael Jurca Gonçalves

Estudo clínico-patológico da distribuição de linfócitos citotóxicos e linfócitos t regulatórios na doença periodontal. Ribeirão Preto, 2017.

90p.: il.; 30cm

Versão corrigida da Dissertação. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Orientadora: Tirapelli, Camila

1. Doença periodontal.
2. Periodontite agressiva.
3. Pesquisa clínica.
4. Imunoistoquímica.
5. Linfocitos citotóxicos.
6. Linfocitos T regulatórios.
7. FOXP3.

FOLHA DE APROVAÇÃO

da Motta, RJG. **Estudo clínico-patológico da distribuição de linfócitos citotóxicos e linfócitos t regulatórios na doença periodontal.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

1) Prof.(a). Dr.(a).: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.(a). Dr.(a).: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.(a). Dr.(a).: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof.(a). Dr.(a).: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico...

Primeiramente à Deus, por me proporcionar saúde e sabedoria para tomar as decisões certas e me amparar nos momentos que precisei.

Aos meus Pais, Maria de Fátima Jurca da Motta e Kleber Gonçalves da Motta por serem minhas referências de vida, estarem sempre ao meu lado e me apoiarem em todos os momentos, me incentivando, motivando e por proporcionarem todas as condições para que chegasse até aqui, serei eternamente grato a vocês!

Aos meus irmãos Bianka e Felipe, por todo apoio e carinho!

A todos meus Amigos, que sempre me motivaram e proporcionaram momentos de descontração e alegria durante esses anos.

Agradecimientos

À Profª Drª Camila Tirapelli, minha orientadora querida, a qual todos os elogios não caberiam nesta dissertação e será sempre um exemplo não apenas profissional, mas principalmente de ser humano. Sou eternamente grato por todos os ensinamentos desde o princípio de minha vida acadêmica, ao me introduzir no mundo científico e desde então sempre buscar tirar o melhor de mim, sempre com muita paciência e compreensão, espero ainda poder aprender muito e retribuir seus ensinamentos.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, por toda estrutura e contribuição em minha formação.

Ao Programa de Pós-graduação na área de Reabilitação Oral por todo suporte e todos os Professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese pela contribuição em minha formação como mestre.

Ao Profº Drº Vinícius Pedrazzi por toda contribuição como relator do meu projeto e em meu exame de Qualificação do Mestrado, todas as sugestões foram de extrema valia e tornaram o trabalho muito mais completo, Obrigado professor!

Às funcionárias Fernanda Talita de Freitas, Regiane de C. Tirado Damasceno e Ana Paula Xavier por sempre estarem dispostas em ajudar todos os momentos que precisei ao longo de todo o curso.

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), pela concessão da bolsa, auxílio e confiança na elaboração do trabalho (nº do processo: 13/08589-3), realizado ainda na graduação, que deu início ao projeto e à esta dissertação de mestrado.

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa, auxílio e principalmente confiança na elaboração deste trabalho.

Ao Profº Drº Jorge Esquiche León, pela contribuição científica ímpar, disponibilizando estrutura e materiais sem os quais não seria possível a realização deste trabalho, sempre com muita disposição e paciência.

Ao DESCOL (Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal) por disponibilizar os laboratórios para que fossem realizadas as fases laboratoriais deste trabalho.

Aos Técnicos do DESCOL: Gilberto André e Silva, Kleber Augusto Loureiro e Adriana de Mattos Gonçalves da Silva por sempre me ajudarem nos processos laboratoriais, sempre com muita disposição e contribuindo para a realização deste trabalho.

Ao CEIT (Centro de Estudos e Inovação Tecnológica) por disponibilizar sua estrutura para estudos.

A todos os Colaboradores que participaram direta ou indiretamente deste estudo: Roberto Juns Da Silva, Kelly Rocio Vargas Villafuerte, Cindy Giglio Munhoz, Karen Pintado Palomino, João Henrique Parise Fortes, Cecília Vilela Matias Vasconcelos, Bianka Jurca Gonçalves Da Motta, André Luiz Macedo Fressatti, Camila C. Martinatti e todos outros que contribuíram para que concluíssemos este trabalho através do atendimento dos pacientes.

Aos Funcionários das Clínicas: Fernando Henrique Torrieri, Karina Dadalt Quaglio, Roberta da Silva, Vera do Nascimento Scandelai, Silvia Helena Fabris F. Campos e José Ap. Neves do Nascimento (Srº Zé) por todo apoio no atendimento aos pacientes deste trabalho, vocês tornaram a fase clínica possível.

Aos Funcionários da Esterilização: China e Galvão por cuidarem tão bem dos processos de esterilização e armazenagem dos materiais utilizados nos processos clínicos.

Aos Funcionários do DAPE: José Carlos Ferreira Junior, Fátima Aparecida Rizoli e Ditinha pelo apoio durante os atendimentos aos pacientes na clínica de pacientes especiais.

A minhas colegas Karen Pintado Palomino e Marcella Moreira Salles por me ajudarem na fase preparatória para a prova de mestrado e assim tornarem minha entrada possível.

A todos os pacientes que participaram da pesquisa, colaborando com cada etapa do trabalho.

Resumo

da Motta, RJG. **Estudo clínico-patológico da distribuição de linfócitos citotóxicos e linfócitos T regulatórios na doença periodontal.** Ribeirão Preto, 2017. 90p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar a expressão e o padrão de distribuição de linfócitos citotóxicos (LCs) e linfócitos T regulatórios (LTregs) no tecido gengival de pacientes com doença periodontal através de análise imunoistoquímica. Foram selecionados 30 pacientes (10 por grupo) com diagnóstico de periodontite agressiva (PA), periodontite crônica (PC) e gengiva clinicamente saudável (controle); dos quais foi colhida uma amostra de tecido gengival. A distribuição das células (epitélio e córion) foi identificada usando os imunomarcadores CD56, CD57, Granzima B e Perforina (LCs); CD4, CD25, FOXP3 (LTregs). A imunoexpressão foi avaliada, utilizando representação de imagem por meio de um sistema computadorizado, constituído por microscópio de luz, adaptado a uma câmera de alta resolução. Contagens independentes de 10 campos separados para cada caso foram feitas. Two-way ANOVA e posterior teste de Fisher foram utilizados para observar diferenças entre os diagnósticos e os marcadores; e teste t de Student para observar diferenças entre epitélio e córion ($p < 0.05$). Os resultados indicaram que pacientes com PA e PC apresentaram um número significativamente maior de células CD56+ e CD57+, em relação ao grupo controle, porém sem diferenças entre si; um número significativamente maior de células CD56+ e CD57+ foi observado em relação às células Granzima B+ e Perforina+ em todos os pacientes. Em relação aos LTregs, o número de células CD25+ e FOXP3+, foi significativamente diferente entre PA, PC e controle, aparecendo em maior número na PC. Células CD4+ foram observadas em número similar em pacientes com PA e PC, diferindo significativamente do grupo controle; em pacientes com PA e PC, foi observado um número significativamente maior de CD4+, em relação às células CD25+ e FOXP3+. Pacientes com PA e PC tem maior número de LCs no tecido gengival em relação ao grupo controle – sugerindo a participação destas células na patogênese da PA e PC. Pacientes com PA apresentaram menor número de LTregs no tecido gengival em comparação aos pacientes com PC, sugerindo que estas células podem estar envolvidas no mecanismo de regulação do processo inflamatório e reabsorção óssea.

Palavras-chave: doença periodontal, periodontite agressiva, pesquisa clínica, imunoistoquímica, linfócitos citotóxicos, linfócitos T regulatórios, FOXP3.

Abstract

da Motta, RJG. **Clinicopathological study of the distribution of cytotoxic lymphocytes and regulatory T lymphocytes in periodontal disease.** Ribeirão Preto, 2017. 90p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

ABSTRACT

This project aims to observe the expression and distribution of cytotoxic lymphocytes (LCs) and regulatory T lymphocytes (LTregs) in gingival tissue from periodontal disease affected patients through immunohistochemical analysis. 30 patients (10 per group) diagnosed with aggressive periodontitis (PA), chronic periodontitis (PC) and clinically healthy gingiva (control) were selected; from which a sample of gingival tissue was collected. The distribution of cells (epithelium and chorion) was identified using the immunomarkers CD56, CD57, Granzyme B, Perforin (LCs); CD4, CD25, FOXP3 (LTregs). The immunoexpression was assessed using image representation by a computer system, comprising a light microscope adapted to a high resolution camera. Independent counts of 10 separate fields for each case were done. Two-way ANOVA and posterior Fisher's Test were used to observe differences between diagnostics and immunomarkers; and unpaired Student t test to observe differences between epithelium and chorium ($p < 0.05$). The results indicates that patients with PA and PC presented a significantly higher number of CD56+ and CD57+ cells, in relation to control, but without differences between each other; a significantly higher number of CD56+ and CD57+ cells was observed in relation to Granzyme B and Perforine cells in all patients. Related to the LTregs, the number of CD25+ and FOXP3+ cells was significantly different between PA, PC and control, appearing in greater number in PC. CD4+ cells were observed in similar number in patients with PA and PC, it was observed a significantly higher number of CD4+, in relation to CD25+ and FOXP3+ cells. Patients with PA and PC have a greater number of LCs in gingival tissue in relation to control group - suggesting the participation of this cells in the pathogenesis of PA and PC. Patients with PA presented less LTregs in gingival tissue when compared to PC patients, suggesting that this cells may be involved in the regulatory mechanism of the inflammatory process and bone resorption.

Key-words: periodontal disease, aggressive periodontitis, clinical research, immunohistochemistry, cytotoxic lymphocytes, regulatory T lymphocytes, FOXP3.

Lista de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Representação gráfica do número de células positivas encontradas no tecido gengival (epitélio + córion) de pacientes com PA, PC e gengiva clinicamente saudável (controle), para os marcadores de LCs (CD56, CD57, Perf e Gran B)..... **63**
- Figura 2.** Análise IQ de LCs nos tecidos gengivais de pacientes com PA, PC e gengiva clinicamente saudável. Nos tecidos gengivais de pacientes com PA, note que as células CD56+ e CD57+ são evidentes e em maior número do que as células Gran B+ e Perf+; especialmente no córion. Nos tecidos gengivais de pacientes com PA e PC observe que a distribuição de células CD56+ e CD57+ mostra preferencial localização no córion em associação com infiltrados inflamatórios, enquanto que as células com grânulos citotóxicos (Gran B e Perf) são escassas. Nos tecidos gengivais de pacientes com gengiva clinicamente sadia, os LCs têm localização preferencial no córion. Tecidos com PA e PC, apresentam maior número de CD56+ e CD57+ em relação ao controle. As setas ressaltam as células imunopositivas para cada imunomarcador. Células Perf+ e Gran B+ são mostradas em detalhe na parte inferior direita..... **65**
- Figura 3.** Representação gráfica do número de células positivas encontradas no tecido gengival (epitélio + córion) de pacientes com PA, PC e gengiva clinicamente saudável (controle), para os marcadores de LTregs (CD4, CD25 e FOXP3)..... **69**
- Figura 4.** Análise IQ de LTregs nos tecidos gengivais de pacientes com PA, PC e gengiva clinicamente saudável. Nos tecidos gengivais de pacientes com PA e PC e controle, note que as células CD4+ são evidentes e em maior número do que as células CD25+ e FOXP3+; especialmente no córion. Note que a frequência e distribuição tissular de células CD25+ e FOXP3 é mais evidente nos tecidos gengivais de pacientes com PC, especialmente no córion. Nos tecidos gengivais de pacientes com gengiva clinicamente sadia, células CD4+, CD25+ e FOXP3+ apresentam-se em menor número em relação aos tecidos de pacientes com PA e PC. Pacientes com PA apresentam menor número de células CD25+ e FOXP3+ no tecido gengival em comparação aos pacientes com PC. As setas ressaltam as células imunopositivas para cada imunomarcador..... **71**

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Valores médios de células positivas no epitélio, córion e total (epitélio + córion) de pacientes com periodontite agressiva, periodontite crônica e gengiva clinicamente saudável, para os marcadores de linfócitos citotóxicos.....	62
Tabela 2.	Valores médios de células positivas no epitélio, córion e total (epitélio + córion) de pacientes com periodontite agressiva, periodontite crônica e gengiva clinicamente saudável, para os marcadores de linfócitos T regulatórios.....	68

Lista de **A**breviaturas e **S**iglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- PA** - Periodontite agressiva
- PC** - Periodontite crônica
- LC** - Linfócito citotóxico
- LTreg** - Linfócito T regulatório
- LTh** - Linfócito T auxiliar
- LTC** - Linfócito T citotóxico
- NK** - *Natural killer*
- Perf** - Perforina
- Gran B** - Granzima B
- IQ** - Imunoistoquímica
- RANKL** - Receptor ativador do fator nuclear kappa-B ligante
- IL** - Interleucina
- TNF** - Fator de necrose tumoral
- OPG** - Osteoprotegerina
- PGE2** - Prostaglandina E2
- HE** - Hematoxilina e Eosina
- DAB** - Diaminobenzidina
- IFN** - Interferon

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO.....	41
2. PROPOSIÇÃO.....	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1 Delineamento do estudo.....	55
3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	55
3.3 Colheita das amostras de tecido.....	56
3.4 Análise das amostras de tecido.....	57
3.5 Análise das reações de imunoistoquímica.....	57
3.6 Análise estatística.....	57
4. RESULTADOS.....	59
4.1 Linfócitos citotóxicos.....	61
4.2 Linfócitos T regulatórios.....	67
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS.....	83

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Periodontite é uma doença inflamatória crônica dos tecidos periodontais que ocorre quando o sistema imune de um indivíduo—modulado por variações genéticas e estilo de vida - responde ao ataque de bactérias (Page & Kornman, 1997). A prevalência atual na população mundial é de 11% e é considerada a principal causa de perda dentária (Leite et al., 2017; Marcenes et al., 2014).

O processo saúde-doença periodontal é regulado pela quantidade e virulência do biofilme dental, as condições do hospedeiro e a intensidade da resposta inflamatória e imune. Clinicamente, o diagnóstico se divide em gengiva sadia, gengivite e periodontite. A gengiva clinicamente saudável é aquela capaz de enfrentar a agressão microbiana sem progredir para uma condição de doença, provavelmente devido a vários fatores defensivos, os quais incluem o efeito antimicrobiano dos anticorpos; a função fagocitária dos neutrófilos e macrófagos; o efeito destrutivo do complemento sobre os patógenos microscópicos; a descamação regular das células epiteliais para a cavidade oral; a barreira epitelial intacta e o fluxo positivo do fluido do sulco gengival, que pode remover os patógenos microscópicos e seus produtos nocivos. Todos esses fatores podem agir simultaneamente para reduzir a carga bacteriana, prevenindo uma resposta excessiva dos sistemas de defesa. A gengivite ocorre quando os produtos microbianos iniciam uma resposta inflamatória substancial, sendo que a gengivite também pode iniciar e perpetuar respostas imunes aos patógenos microscópicos orais, porém, o nível da resposta será consideravelmente menor do que a intensa destruição tecidual e a perda óssea observada nas lesões periodontais. Na verdade, o efeito prejudicial mais importante pode ser da própria resposta imune do hospedeiro aos antígenos apresentados pelos patógenos microscópicos (Silva et al., 2015).

Neste contexto, diversas populações de células do sistema imune são importantes, dentre elas, os linfócitos citotóxicos (LCs) e linfócitos T regulatórios (LTregs) (Hienz et al., 2015). Os linfócitos consistem em populações funcionalmente distintas, de extrema importância para o sistema imunológico, das quais as que foram mais bem caracterizadas são os linfócitos T auxiliares (LTh) e os linfócitos citotóxicos (LCs), este último grupo incluindo os linfócitos T citotóxicos (LTC) e as células *natural killer* (NK). O linfócito T é responsável, principalmente, pelo auxílio ao sistema imunológico na resposta imunológica celular, reagindo à estimulação

antigênica. Os LTh secretam moléculas chamadas citocinas, cuja função é estimular a proliferação e a diferenciação das células T, assim como a ativação de outras células, incluindo as células B, responsável pela resposta imunitária humoral, os macrófagos e outros leucócitos. Os LCs são capazes de detectar e destruir células que produzem antígenos estranhos, como as células infectadas por vírus e outros microrganismos intracelulares. Em contraste, a função principal dos LTregs é a de inibir as respostas imunológicas, através de indução da imunotolerância. As células NK estão envolvidas na imunidade natural contra os vírus e outros organismos extracelulares, sendo a primeira linha de defesa do sistema imune. Linfócitos T ativados, células fagocitárias mononucleares e outros leucócitos desempenham o papel de células efetoras nas diferentes respostas imunológicas (Silva et al., 2015).

Na doença periodontal, o infiltrado inflamatório composto por células T, células B, macrófagos e neutrófilos no tecido gengival está aumentado, com um incremento simultâneo na secreção de mediadores inflamatórios (Di Benedetto et al., 2013; Yucel-Lindeberg e Bage, 2013). Estas células inflamatórias também interagem com células estromais, tais como osteoblastos, ligamento periodontal e fibroblastos gengivais. A osteoclastogênese mediada pelo receptor ativador do fator nuclear kappa B/ ligante (RANKL) desempenha um papel central na reabsorção óssea inflamatória, sendo que sua expressão está aumentada na periodontite (Yasuda et al., 1998; Liu e Xu, 2003). Os linfócitos T ativados podem mediar a reabsorção óssea através da produção excessiva de sRANKL (RANKL solúvel), e os achados sugerem que os linfócitos T e B ativados são uma das principais fontes que expressam RANKL no tecido periodontal doente (Taubman et al., 2005; Yasuda et al., 1998; Nagasawa et al., 2007; Udagawa et al., 1999). Numerosos modelos animais suportam esta associação (Hienz et al., 2015). Os papéis de mediadores inflamatórios locais gerados por macrófagos e linfócitos T na reabsorção óssea têm sido extensivamente estudados. As suas funções efetoras nos tecidos podem ser diretas ou indiretas como recentemente relatado em relação à via de produção RANKL estimulada por osteoblastos. A reabsorção óssea alveolar na periodontite pode assim ser direta ou indiretamente induzida pelo infiltrado inflamatório celular (Shwartz et al., 1997; Taubman et al., 2005; Saffar et al., 1997; Liu et al., 2003). Apesar do papel fundamental dos linfócitos produtores de RANKL na reabsorção

óssea inflamatória, em condições fisiológicas, eles podem não estar envolvidos (Hienz et al., 2015).

A literatura mostra que os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ estão presentes nas lesões periodontais, assim como linfócitos T ativados e com memória. Diferentes subgrupos de células T parecem estar envolvidos na regulação positiva ou negativa da reabsorção óssea periodontal mediada por RANKL. Além disso, os LTh1 e LTh2 e suas citocinas associadas podem estar presentes, com uma polarização do perfil Th1 (Baron, 1995; Kawai et al., 2006; Han et al., 2007; Taubman et al., 2001). Foi proposto que os LTh1 promovem a perda óssea, uma vez que RANKL parece ser predominantemente expresso nos LTh1, enquanto que os LTregs suprimem a perda óssea mediada por LTh1. A produção de citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina (IL)-1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é regulada por LTh1. Estas células podem induzir reabsorção óssea indiretamente por estimulação de precursores de osteoclastos e subsequente ativação de osteoclastos através da produção de RANKL por osteoblastos (Han et al., 2007; Taubman et al., 2001). A osteoprotegerina (OPG) é um conhecido fator inibidor de osteoclastos e membro da família de receptores TNF. A OPG é produzida por osteoblastos ativados e possui a função de inibir a maturação e ativação de osteoclastos. A OPG tem alta afinidade pelo RANKL nos osteoblastos, impedindo que esta molécula se ligue ao RANK na superfície dos osteoclastos. Este mecanismo faz com que a OPG iniba a reabsorção óssea induzida pelos osteoclastos estimulados pelo RANKL. As células T ativadas podem também, através da produção de RANKL promover a atividade dos osteoclastos. Estes mecanismos envolvendo células imunes e a reabsorção óssea periodontal parecem depender da extensão do recrutamento de LTh1 em tecidos inflamados (Taubman et al., 2001). Foi bem reconhecido que o controle desta mudança é mediado pelos subgrupos de LTh1 e LTh2. LTregs e LTh17 foram demonstrados em tecidos periodontais, sugerindo um papel destes tipos de linfócitos na imunorregulação da doença (Di Benedetto et al., 2013; Ohlrich et al., 2009).

Clinicamente, as duas principais formas da doença periodontal são a PC e a PA. Embora as duas formas compartilhem algumas características clínicas, há várias diferenças clássicas que permitem diagnosticá-las separadamente (Nath e Ravendram, 2013; Armitage, 1999). Do ponto de vista imunológico, ainda não é possível diferenciar claramente a PC da PA, entretanto há indícios de que o processo de início e progressão das doenças seja diferente (Ford et al., 2010).

Diferentemente da PC, início precoce e curso rápido de destruição do tecido periodontal, geralmente atribuída a uma resposta imune alterada contra patógenos periodontais, são características da PA (Nath e Raveendran, 2013; Nowak et al., 2013; Anjana et al., 2012; Ford et al., 2010; Venkatesan et al., 2013). Neste contexto, a resposta imune do hospedeiro tem um papel central na patogênese da periodontite (Anjana et al., 2012; Garlet et al., 2010; Ozturk et al., 2011; Smith et al., 2010; Lins et al., 2008). De acordo com a literatura, alguns indivíduos demonstram destruição óssea agressiva e altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e reabsorções ósseas que não podem ser completamente explicadas apenas pela presença de bactérias patogênicas. A variação genética dos principais fatores reguladores imunológicos ou inflamatórios pode explicar essas variâncias na manifestação da doença periodontal, bem como a presença de formas agressivas da doença (Garant et al., 2003).

Na PC, substâncias biologicamente ativas presentes na placa bacteriana induzem uma resposta inflamatória local nos tecidos gengivais e no periodonto (Nanci e Bosshardt, 2006). O influxo resultante de células inflamatórias produz uma série de citocinas, por exemplo, PGE2, IL-1 e RANKL, que promovem a reabsorção através dos osteoclastos, a célula primária de reabsorção óssea. Assim, em condições inflamatórias patológicas, produtos de células inflamatórias iniciam a atividade dos osteoclastos e interferem no delicado equilíbrio entre os processos de proteção e destruição periodontal (Oates e Cochran, 1996; McCauley e Nohutcu, 2002; Teitelbaum et al., 2007; Yasuda et al., 1998; Nagasawa et al., 2007; MacDonald, 1986). Esta é denominada imunopatogênese da doença periodontal, e pesquisas pioneiras nesta área ao longo da última década geraram um novo campo denominado “osteoimunologia” (Gruber, 2010; Ohlrich et al., 2009).

Assim, enquanto os linfócitos T representam predominantemente o tipo de célula inflamatória presente nos estágios iniciais e estáveis da doença periodontal, os linfócitos B predominam em lesões mais avançadas com destruição já estabelecida (Offenbacher et al., 1996; Mickhaleva et al., 2001; Jotwani et al., 2001; Cirrincione et al., 2002; Jotwani e Cutler, 2003). Ainda, e muito importante, os LTregs representam uma subpopulação de linfócitos T caracterizados pela expressão das moléculas de superfície CD4 e CD25, bem como do fator nuclear FOXP3. Os LTregs induzem a supressão dos mecanismos inflamatórios,

especialmente de células T efectoras/ativadas, as quais expressam CD56, CD57, Granzima B (GranB) e Perforina (Perf), bloqueando a ativação e a função destes linfócitos, sendo assim importantes no controle da resposta imunológica (Melo et al., 2009).

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas para estudar a presença e distribuição de diferentes células do sistema imunológico nos tecidos afetados pela doença periodontal na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos na sua patogênese a assim avançar na proposição de tratamentos mais eficientes no futuro (Anjana et al., 2012; Ozturk e Yıldız, 2011; Lins et al., 2008). Tais estudos têm demonstrado variações no número e densidade de subpopulações de linfócitos e células dendríticas em diferentes estágios na doença periodontal. Por exemplo, há estudos avaliando diferentes subgrupos de linfócitos na doença periodontal, através dos marcadores: CD45 (Seguier et al., 2000; Cifcibasi et al., 2014 e Sabarish et al., 2016), para linfócitos em geral; CD3 (Seguier et al., 2000; Cifcibasi et al., 2014), CD4 (Cifcibasi et al., 2014; Orbak et al., 2006; Artese et al., 2010), CD8 (Seguier et al., 2000; Cifcibasi et al., 2014; Orbak et al., 2006; Artese et al., 2010), TIA-1, Gran B (Seguier et al., 2000), CD28, CD16, CD56, CD16 (Cifcibasi et al., 2014), para linfócitos T e células NK; CD20 (Seguier et al., 2000), CD19, (Cifcibasi et al., 2014), para linfócitos B; os LTregs foram avaliados na doença periodontal através dos marcadores FOXP3 (Sabarish et al., 2016; Dutzan et al., 2009; Okui et al., 2012; Okui et al., 2008; Nakajima et al., 2005; Ernst et al., 2007), CD25 (Lins et al., 2012; Sabarish et al., 2016; Okui et al., 2008; Nakajima et al., 2005; Ernst et al., 2007), CD4 (Sabarish et al., 2016; Okui et al., 2008; Nakajima et al., 2005); bem como outros marcadores de linfócitos CD69 (Vitales-Noyola et al., 2016) e IL-17A (Okui et al., 2012) na doença periodontal. Nosso grupo em publicação recente mostrou que células dendríticas imaturas estavam mais presentes em tecidos de pacientes com PA, enquanto pacientes com PC apresentavam maior número de células dendríticas maduras, indicando uma possível falha no processo de maturação de tais células (da Motta et al., 2016). Entretanto, nenhum estudo avaliou a distribuição de LTregs na PC e PA em tecidos gengivais e apenas um estudo abordou a distribuição de linfócitos citotóxicos nestas condições, utilizando os marcadores CD4 e CD8 (Artese et al., 2011). Assim, uma análise detalhada da distribuição tissular de LTregs e LCs na PC e PA através de marcadores imunoistoquímicos, é crucial para um melhor

entendimento da distribuição das células do sistema imune na doença periodontal envolvidas na imunotolerância e nas reações de imunotoxicidade.

Em razão disso, o objetivo deste estudo foi observar através da análise imunistoquímica o padrão de distribuição tissular de LCs e LTregs na resposta inflamatória presentes no tecido gengival de pacientes saudáveis ou com doença periodontal (PC e PA). A compreensão dos mecanismos biológicos que controlam a imunopatogênese dos processos de remodelação e reabsorção óssea contribuirá para esclarecer não apenas o controle local da função óssea, mas também a fisiopatologia da perda óssea acelerada, como visto na doença periodontal e também em outras doenças imunoinflamatórias dos ossos, como osteoporose e artrite reumatóide (Baron, 1989; Baron, 1995; Taubman et al., 2005).

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

A hipótese da pesquisa é que para diferentes diagnósticos periodontais, a localização e imunoexpressão de marcadores de linfócitos citotóxicos (LCs) e linfócitos T regulatórios (LTregs) na resposta inflamatória pode variar.

Para testar esta hipótese, analisamos no tecido gengival de pacientes com diagnóstico de periodontite agressiva, periodontite crônica e gengiva clinicamente saudável a expressão e o padrão de distribuição de marcadores para LCs e LTregs. Para isso, foram utilizados os imunomarcadores CD56, CD57, Perforina e Granzima B (LCs) e CD4, CD25, FOXP3 (LTregs).

3. **M**ateriais e **M**étodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética Da FORP-USP e aprovado sob o número CAAE: 12945713.1.0000.5419

3.1 Delineamento do estudo

As variáveis avaliadas neste estudo foram as células marcadas positivamente, contadas a partir dos campos obtidos em cada lâmina, em epitélio e córion.

Os fatores de variação foram os diferentes diagnósticos (PA, PC e controle) e os imunomarcadores utilizados, para LCs (CD56, CD57, Perf e Gran B); e para LTregs (CD4, CD25 e FOXP3).

O número amostral foi de 10 pacientes por diagnóstico, totalizando 30. Para cada paciente foram obtidas 7 lâminas histológicas, uma para cada marcador, totalizando 210 lâminas, nas quais foram capturadas 10 imagens para epitélio e 10 para córion, totalizando 4200 imagens.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Exame clínico extra e intra-bucal, considerando o exame periodontal completo e radiográfico (radiografias periapicais e panorâmica) foram realizados nos pacientes da Área de Clínica Integrada da FORP – USP, buscando a seleção de 30 pacientes (10 por grupo) com diagnóstico de PA, PC e gengiva clinicamente sadia (controle).

A seleção dos pacientes obedeceu aos seguintes critérios de inclusão e exclusão:

- a. Inclusão para os pacientes com PA: idade máxima de 40 anos, perda de inserção de mais de 3mm detectada por sondagem periodontal (profundidade de sondagem > 5mm), perda óssea localizada ou generalizada, detectada por exame radiográfico e quantidade de biofilme e calculo dental inconsistente com a severidade de destruição periodontal.
- b. Inclusão para os pacientes com PC: gengiva com sinais clínicos de inflamação, perda de inserção de mais de 3mm detectada por

sondagem periodontal (profundidade de sondagem > 5mm), e perda óssea localizada ou generalizada, detectada por exame radiográfico.

- c. Inclusão para os pacientes do Controle: gengiva sem sinais clínicos de inflamação, profundidade de sondagem < 3mm, ausência de perda de inserção detectada por sondagem periodontal e de perda óssea detectada por exame radiográfico.
- d. Exclusão: presença de alterações sistêmicas que possa interferir na progressão da doença, tratamento com antibióticos ou antiinflamatórios nos últimos 06 meses, tratamento periodontal em andamento ou nos últimos 6 meses, tabagistas, gestantes e lactantes.

Os pacientes selecionados de acordo com os critérios acima foram convidados a participar do estudo após o diagnóstico e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da FORP USP, obtida em 01 de Abril de 2013 (Número CAAE: 12945713.1.0000.5419).

Os critérios para definição do diagnóstico obedeceram a Academia Americana de Periodontia (Armitage, 1999).

3.3 Colheita das amostras de tecido

Sob anestesia local (Mepivacaína 2% com adrenalina [1:100.000]), e atendendo as normas de biossegurança, amostras de tecido gengival foram removidas durante o procedimento cirúrgico de rotina. Foram obtidas por meio de excisão realizada com lamina de bisturi tipo 15C. No caso dos pacientes do grupo A o tecido gengival foi removido durante procedimentos inerentes a seu plano de tratamento original (por exemplo, aumento de coroa clínica e gengivectomias) e no caso dos pacientes do Grupo B e C durante o primeiro procedimento de tratamento da doença periodontal (cirurgia periodontal ou raspagens supra e sub gengivais). O tecido removido (cerca de 5x2x2mm) foi imediatamente limpo em solução fisiológica e armazenado em solução de formol a 10% por 24 horas.

3.4 Análise das amostras de tecido

O laboratório de Histopatologia da FORP/ USP recebeu as amostras de tecido que foram embebidas em parafina (+55°C) e seccionadas consecutivamente. A partir de cada bloco, nove seções foram preparadas: uma seção recebeu coloração hematoxilina e eosina (HE) e outras oito foram preparadas para análise IQ (CD4, CD25, FOXP3, CD56, CD57, Perforina, Granzima B).

Para as reações de IQ, foram realizados cortes histológicos de 3 µm de espessura, os quais foram colocados sobre lâminas devidamente revestidas com organo-silano (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os cortes foram hidratados e tratados com peróxido de hidrogênio (3%). Após a incubação com o anticorpo primário, foram utilizados anticorpos secundários conjugados com o sistema streptavidina-biotina-peroxidase (K0690; Universal Dako LSAB+ Kit, Peroxidase, Carpinteria, CA, USA), posteriormente foi usado o cromógeno diaminobenzidina (DAB) e contracolorados com hematoxilina de Carazzi.

3.5 Análise das reações de imunoistoquímica

A imunoexpressão foi avaliada, utilizando-se representação de imagem por meio de um sistema computadorizado, constituído por microscópio de luz (Leica DM500), adaptado a uma câmera de alta resolução (Leica ICC50) e monitor de vídeo colorido. As imagens foram obtidas utilizando-se o programa Leica IM50 Image Managem e o processamento das mesmas foi feito através do programa Leica QWin Image Processing and Analysis System. Considerou-se marcação positiva aquela que apresente coloração acastanhada, conferida pelo cromógeno DAB. Após a avaliação das lâminas em aumento de x100, áreas com maior densidade de imunomarcção foram selecionadas e a densidade e porcentual de células positivas foram registrados em um campo microscópico de x400 (0,785mm²) (células positivas/mm²). Contagens independentes de 10 campos separados para cada caso foram feitas, sendo a média ± desvio padrão destes valores registrados.

3.6 Análise estatística

Os dados foram analisados com o software estatístico Prism, versão 6.0 (Graphpad, CA, USA). Através do teste Shapiro-Wilk observamos se houve distribuição normal ou não dos dados. Foi utilizado Two-way ANOVA (considerando o diagnóstico periodontal e os imunomarcadores como fatores independentes) e

posterior teste de Fisher para observar diferenças entre as médias, e teste t de Student para observar diferenças entre epitélio e córion. Nível de confiança adotado foi de 95% ($p < 0.05$).

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Linfócitos citotóxicos

Os valores observados para os LCs encontram-se dispostos na tabela 1. A figura 1 ilustra os valores da tabela 1. A figura 2 traz imagens representativas da imunoistoquímica.

Comparando-se a distribuição dos LCs em córion e epitélio do tecido gengival, foi observada uma distribuição preferencial dos LCs no córion em todos os grupos avaliados. Células CD56+ e CD57+ foram identificadas em número similar em pacientes com PA e PC. No entanto significativamente, células CD56+ e CD57+ foram observadas em menor número no grupo controle, quando comparadas com pacientes com PA e PC. Com relação aos marcadores Perf e Gran B não foi observada diferença na distribuição, em epitélio e córion, em nenhum dos grupos de diagnóstico. No entanto, foi observada uma ligeira predileção pelo córion.

Comparando-se a distribuição das células Perf+ e Gran B+ em relação aos diagnósticos, não foi observada diferença estatisticamente significante entre PA, PC e controle. Entretanto, pacientes com PA e PC apresentaram um número maior de células CD56+ e CD57+ no tecido gengival, em relação ao grupo controle.

Quando comparamos os marcadores entre si, dentro de cada diagnóstico, para os valores totais, encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os marcadores CD56 e CD57 em relação aos marcadores Perf e Gran B, para todos os diagnósticos, sendo evidente um número maior de células CD56+ e CD57+. Ainda, não houve diferença entre células CD56+ e CD57+ entre si, bem como as células Perf+ e Gran B+.

Tabela 1. Valores médios de células positivas no epitélio, córion e total (epitélio + córion) de pacientes com periodontite agressiva, periodontite crônica e gengiva clinicamente saudável, para os marcadores de linfócitos citotóxicos.

Diagnóstico Periodontal									
Marcadores	Periodontite Agressiva			Periodontite Crônica			Controle		
	Epitélio	Córion	Total	Epitélio	Córion	Total	Epitélio	Córion	Total
CD56	3.2 (±1.3) aA	9.5 (±6.0) aA	12.7 (±3.0) aA	2.9 (±0.8) *aA	8.2 (±2.5) *aA	11.1 (±1.3) aA	2.5 (±0.9) aA	4.7 (±1.5) aB	7.2 (±1.0) aB
CD57	3.0 (±1.5) aA	10.5 (±10.8) aA	13.5 (±4.5) aA	2.9 (±1.0) *aA	10.1 (±3.8) *aA	13.0 (±2.0) aA	2.8 (±2.2) aA	6.1 (±3.6) aB	8.9 (±2.0) aB
Perforina	1.6 (±0.6) bA	1.8 (±0.9) bA	3.4 (±1.3) bA	2.2 (±0.8) aA	1.8 (±0.4) bA	4.0 (±1.3) bA	1.1 (±0.7) aA	1.0 (±0.6) bA	2.1 (±1.3) bA
Granzima B	1.7 (±0.5) bA	3.6 (±2.0) bA	5.3 (±2.0) bA	2.6 (±1.3) aA	2.9 (±1.9) bA	5.5 (±3.2) bA	1.6 (±1.2) aA	2.3 (±1.1) bA	3.9 (±2.0) bA

Significância estatística:

Epitélio x córion: nas linhas, dentro de cada marcador e diagnóstico, asteriscos indicam diferença estatística entre epitélio e córion de acordo com teste t de Student com nível de confiança de 95%.

Diagnóstico: nas linhas, para cada marcador. letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os diagnósticos de acordo com o teste Two-way Anova.

Marcadores: nas colunas, para cada diagnóstico, letras minúsculas indicam diferença estatística entre os marcadores de acordo com o teste Two-way Anova.

Figura 1. Representação gráfica dos valores médios de células positivas encontradas no tecido gengival (epitélio + córion) de pacientes com PA, PC e gengiva clinicamente saudável (controle), para os marcadores de LCs (CD56, CD57, Perf e Gran B).

Figura 2. Análise IQ de LCs nos tecidos gengivais de pacientes com PA, PC e gengiva clinicamente saudável. Nos tecidos gengivais de pacientes com PA, note que as células CD56+ e CD57+ são evidentes e em maior número do que as células Gran B+ e Perf+; especialmente no córion. Nos tecidos gengivais de pacientes com PA e PC observe que a distribuição de células CD56+ e CD57+ mostra preferencial localização no córion em associação com infiltrados inflamatórios, enquanto que as células com grânulos citotóxicos (Gran B e Perf) são escassas. Nos tecidos gengivais de pacientes com gengiva clinicamente sadia, os LCs têm localização preferencial no córion. Tecidos com PA e PC, apresentam maior número de CD56+ e CD57+ em relação ao controle. As setas ressaltam as células imunopositivas para cada imunomarcador. Células Perf+ e Gran B+ são mostradas em detalhe na parte inferior direita.

4.2 Linfócitos T regulatórios

Os valores observados para os LTregs encontram-se dispostos na tabela 2. A figura 3 ilustra os valores da tabela 2. A figura 4 traz imagens representativas da imunoistoquímica.

Comparando-se a distribuição dos LTregs em córion e epitélio, células CD4+ foram identificadas em número significativamente maior no córion em relação ao epitélio nos pacientes com PA e PC. Células FOXP3+ foram notadas em número significativamente maior no córion de pacientes com PC do que em pacientes com PA.

Comparando-se a distribuição de LTregs em relação aos diagnósticos, o número de células CD25+ e FOXP3+, foi diferente entre PA, PC e controle, aparecendo em número significativamente maior na PC do que na PA. Células CD4+ foram observadas em número similar no tecido gengival de pacientes com PA e PC, diferindo significativamente do grupo controle.

Quando comparamos os marcadores entre si, dentro de cada grupo de diagnóstico, em relação aos valores totais de células imunocoradas, encontramos no tecido de pacientes com PA, PC e controle, um número significativamente maior de células CD4+ em relação às células CD25+ e FOXP3+.

Tabela 2. Valores médios de células positivas no epitélio, córion e total (epitélio + córion) de pacientes com periodontite agressiva, periodontite crônica e gengiva clinicamente saudável, para os marcadores de linfócitos T regulatórios.

Marcadores	Periodontite Agressiva			Periodontite Crônica			Controle		
	Epitélio	Córion	Total	Epitélio	Córion	Total	Epitélio	Córion	Total
CD4	3.6 (±1.7) *aA	12.0 (±5.6) *aA	15.6 (±5.6) aA	3.4 (±1.1) *aA	12.0 (±3.9) *aA	15.4 (±3.7) aA	2.0 (±1.5) aA	6.0 (±2.9) aB	8.0 (±1.9) aB
CD25	3.3 (±2.0) aA	7.8 (±4.4) bA	11.1 (±5.6) bA	5.5 (±4.1) bB	8.9 (±3.8) aA	14.4 (±5.8) aB	2.2 (±0.9) aA	2.4 (±1.4) bB	4.6 (±2.2) bC
FOXP3	2.6 (±1.7) aA	7.6 (±3.9) bA	10.2 (±5.5) bA	3.3 (±1.7) *aA	11.0 (±2.9) *aA	14.3 (±3.5) aB	1.9 (±1.2) aA	2.8 (±0.7) cB	4.7 (±1.7) bC

Significância estatística:

Epitélio x córion: nas linhas, dentro de cada marcador e diagnóstico asteriscos indicam diferença estatística entre epitélio e córion de acordo com teste t de Student com nível de confiança de 95%.

Diagnóstico: nas linhas, para cada marcador, letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os diagnósticos de acordo com o teste Two-way Anova.

Marcadores: nas colunas, para cada diagnóstico, letras minúsculas indicam diferença estatística entre os marcadores de acordo com o teste Two-way Anova.

Figura 3. Representação gráfica dos valores médios de células positivas encontradas no tecido gengival (epitélio + córion) de pacientes com PA, PC e gengiva clinicamente saudável (controle), para os marcadores de LTregs (CD4, CD25 e FOXP3).

Figura 4. Análise IQ de LTregs nos tecidos gengivais de pacientes com PA, PC e gengiva clinicamente saudável. Nos tecidos gengivais de pacientes com PA e PC e controle, note que as células CD4+ são evidentes e em maior número do que as células CD25+ e FOXP3+; especialmente no córion. Note que a frequência e distribuição tissular de células CD25+ e FOXP3 é mais evidente nos tecidos gengivais de pacientes com PC, especialmente no córion. Nos tecidos gengivais de pacientes com gengiva clinicamente sadia, células CD4+, CD25+ e FOXP3+ apresentam-se em menor número em relação aos tecidos de pacientes com PA e PC. Pacientes com PA apresentam menor número de células CD25+ e FOXP3+ no tecido gengival em comparação aos pacientes com PC. As setas ressaltam as células imunopositivas para cada imunomarcador.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, um campo fascinante chamado osteoimunologia tem recebido especial interesse, principalmente porque fornece uma relação entre as células do sistema imune e a patogênese da doença periodontal (Alnaeeli et. al. 2009, Alnaeeli et. al. 2007). A compreensão dos mecanismos biológicos que controlam a imunopatogênese dos processos de remodelação e reabsorção óssea irá esclarecer não apenas os mecanismos da homeostase do tecido ósseo, mas também a fisiopatologia da perda óssea acelerada, como visto na doença periodontal e também em outras doenças imunoinflamatórias dos ossos, como osteoporose e artrite reumatóide (Baron, 1989; Baron, 1995; Taubman et. al. 2005).

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas para avaliar a presença e distribuição de células do sistema imune na doença periodontal na tentativa de elucidar seus mecanismos imunológicos que eventualmente poderiam ser utilizados no planejamento do tratamento, bem como identificar potenciais alvos terapêuticos. (Artese et al., 2011; Cifcibasi et al., 2014; Orbak et al., 2006; Segulier et al., 2000; Vitales-Noyola et al., 2016; Sabarish et al., 2016; Lins et al., 2012; Okui et al., 2012; Dutzan et al., 2009; Okui et al., 2008; Kim et al., 2007; Ernst et al., 2007; Nakajima et al., 2005; Smith et al., 2010; Stelin et al., 2009; Gemmell et al., 2002b; Amunulla et al., 2008; Hussain et al., 2015; Thorbert-Mros et al., 2015; Bodineau et al., 2009).

Entretanto, os imunomarcadores utilizados não fornecem informações sobre o papel dos LTregs na regulação de lesões periodontais em pacientes com PA (Vitales-Noyola et al., 2016; Sabarish et al., 2016; Lins et al., 2012; Okui et al., 2012; Dutzan et al., 2009; Okui et al., 2008; Kim et al., 2007; Ernst et al., 2007; Nakajima et al., 2005) e apenas um autor abordou a análise de LCs em tecidos de pacientes com PA (Artese et al., 2011). Neste estudo, nós mostramos pela primeira vez, através dos imunomarcadores CD25 e FOXP3, que existe diferença na distribuição de LTregs nos tecidos de pacientes com PC e PA, sendo os LTregs mais frequentemente observados nos tecidos de pacientes com PC. Em relação aos LCs, mostramos através dos marcadores CD56 e CD57 que tais células estão mais presentes, e em distribuição similar, em tecidos de pacientes com PA e PC, quando comparados ao grupo controle. De fato, a avaliação do tecido gengival clinicamente

saudável mostrou números significativamente menores de LCs (CD56 e CD57) e LTregs (CD25 e FOXP3).

Há estudos na literatura que corroboram nossos achados em relação à presença dos LTregs na doença periodontal. Em um estudo (Nakajima et al., 2005) comparando pacientes com gengivite crônica e PC, observou-se que a percentagem de células CD4+/CD25+ aumentou conforme o aumento de células B; e FOXP3, um marcador característico para LTregs, foi expresso em maior número na PC comparada com a gengivite crônica. Estes achados já sugeriam que os LTregs podem desempenhar papéis reguladores em doenças periodontais. Outro autor (Garlet et al., 2010) por meio de um estudo usando modelo animal demonstrou um aumento no número de células CD4+/CD25+ e CD4+/FOXP3+, caracterizando a presença de LTregs no ambiente periodontal em um estágio tardio da infecção. Nesse contexto, nosso estudo avança comparando os LTregs na PC e PA. Nossa hipótese para o fato de haver maior número de LTregs nos tecidos de pacientes com PC quando comparados com pacientes com PA se fundamenta no curso clínico da doença. De fato, pacientes com PA parecem ter uma resposta do sistema imune exacerbada, ou desregulada, que leva a um processo inflamatório intenso e liberação de mediadores inflamatórios com perda óssea acelerada. Em pacientes com PC, através da presença significativa de LTregs, parece haver uma maior regulação da resposta imunológica gerando um processo inflamatório mais brando e destruição óssea mais lenta, em relação a PA. Isto é relevante, se temos em consideração os estudos que mostram uma inibição ou diminuição da atividade osteoclástica na presença de LTregs (Nakajima et al., 2005; Ohlrich et al., 2009).

Considerando a PA e a presença de LCs ou linfócitos B, há apenas dois estudos na literatura que avaliam o tecido gengival (Artese et al., 2011) e sangue periférico (Cifcibasi et al., 2014); sendo que o primeiro notou em pacientes com PA células CD20+ (linfócitos B) significativamente mais prevalentes em relação à PC; já o segundo avaliou linfócitos T citotóxicos CD8+ e CD28+, onde foram encontrados valores significativamente elevados em PA e PC comparados ao grupo controle.

Em relação aos LCs, nosso estudo mostrou que estas células se encontram em maior número em tecidos gengivais de pacientes com PA e PC em relação ao controle, com predominância significativa em córion em relação ao epitélio. Na literatura, interessante, nem todos os estudos, envolvendo análise

imunoistoquímica da doença periodontal, avaliam os tecidos gengivais doentes. Curiosamente, alguns estudos têm mostrado que o número de LCs no epitélio gengival pode ser aumentado (Saglie et al. 1987) ou diminuído (Seguier et al., 2000), ou não mostrar nenhuma alteração quantitativa (Gemmell et al., 2002) durante a inflamação na doença periodontal.

Um achado interessante de nosso estudo está que o uso de marcadores como Gran B e Perf não se mostraram eficazes em identificar LCs na doença periodontal em relação ao controle. Uma explicação reside no fato que LCs em condições inflamatórias expressam granulações citotóxicas em baixas quantidades. No entanto, o uso destes marcadores é importante porque fornecem informações do grau de ativação das células CD56+ e CD57+. Assim, conforme mostrado neste estudo, este grau de ativação dos LCs na PA e PC é discreto. Além disso, sabe-se que as células T representam o tipo predominante de células inflamatórias presentes nos estágios iniciais da doença periodontal, enquanto que as células B e até as populações de macrófagos predominam em lesões mais avançadas, onde a destruição do tecido periodontal é evidente (Thorbert-Mros et al., 2015; Artese et al., 2011; Allam et al., 2011; Offenbacher et al., 1996); como era o caso em geral dos pacientes do nosso estudo. Além disso, tem sido demonstrado que níveis mais elevados de interleucina (IL)-2, IL-10, IL-17, fator alfa de necrose tumoral (TNF)- α e interferon (IFN)- γ podem ser detectados em PC (Souto et al., 2014).

Futuros estudos poderão envolver a avaliação das populações celulares frente a diferentes opções terapêuticas, que podem comparar o tratamento considerando a doença periodontal do ponto de vista infeccioso ou autoimune.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

De acordo com a análise de nossos dados, a imunoexpressão e localização de marcadores para linfócitos citotóxicos (LCs) e linfócitos T regulatórios (LTregs) na resposta inflamatória pode variar.

- ✓ Pacientes com periodontite agressiva (PA) e periodontite crônica (PC) apresentaram maior número de LCs no tecido gengival doente em relação ao grupo controle – confirmando que estas células participam na patogênese, provavelmente possuindo ação semelhante no processo inflamatório, da PA e PC.
- ✓ Pacientes com PA apresentaram menor número de LTregs no tecido gengival doente em comparação aos pacientes com PC, sugerindo que estas células podem estar envolvidas no mecanismo de regulação do processo inflamatório e reabsorção óssea.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Allam JP, Duan Y, Heinemann F, Winter J, Götz W, Deschner J, Wenghoefer M, Bieber T, Jepsen S, Novak N. IL-23-producing CD68(+) macrophage-like cells predominate within an IL-17-polarized infiltrate in chronic periodontitis lesions. *J Clin Periodontol*. 2011 Oct;38(10):879-86.
2. Alnaeeli M, Park J, Mahamed D, Penninger JM, Teng YT. Dendritic cells at the osteo-immune interface: implications for inflammation induced bone loss. *J Bone Miner Res*. 2007 Jun;22(6):775-80.
3. Alnaeeli M, Teng YT. Dendritic cells: a new player in osteoimmunology. *Curr Mol Med*. 2009 Sep;9(7):893-910.
4. Amunulla A, Venkatesan R, Ramakrishnan H, Arun KV, Sudarshan S, Talwar A. Lymphocyte subpopulation in healthy and diseased gingival tissue. *J Indian Soc Periodontol*. 2008 May;12(2):45-50.
5. Anjana R, Joseph L, Suresh R. Immunohistochemical localization of CD1a and S100 in gingival tissues of healthy and chronic periodontitis subjects. *Oral Dis*. 2012 Nov;18(8):778-85.
6. Artese L, Simon MJ, Piattelli A, Ferrari DS, Cardoso LA, Faveri M, Onuma T, Piccirilli M, Perrotti V, Shibli JA. Immunohistochemical analysis of inflammatory infiltrate in aggressive and chronic periodontitis: a comparative study. *Clin Oral Investig*. 2011 Apr;15(2):233-40.
7. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1–6.
8. Baron R. Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. *Anat Rec*. 1989 Jun;224(2):317-24.
9. Baron R. Molecular mechanisms of bone resorption. An update. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1995 Oct;266:66-70.
10. Bodineau A, Coulomb B, Tedesco AC, Séguier S. Increase of gingival matured dendritic cells number in elderly patients with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2009 Jan;54(1):12-6.
11. Cifcibasi E, Ciblak M, Kiran B, Badur S, Firatli E, Issever H, Cintan S. The role of activated cytotoxic T cells in etiopathogenesis of periodontal disease: does it harm or does it heal? *Sci Rep*. 2015 Mar 19;5:9262.
12. Cirrincione C, Pimpinelli N, Orlando L, Romagnoli P. Lamina propria dendritic cells express activation markers and contact lymphocytes in chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2002 Jan;73(1):45-52.
13. da Motta RJG, Tirapelli C, Juns da Silva R, Villafuerte KRV, Almeida LY, Ribeiro-Silva A, León JE. Immature, but Not Mature, Dendritic Cells Are More Often

- Present in Aggressive Periodontitis Than Chronic Periodontitis: An Immunohistochemical Study. *J Periodontol*. 2016 Dec;87(12):1499-1507.
14. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:503754.
 15. 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-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009 May;36(5):396-403.
 16. Erciyas K, Orbak R, Kavrut F, Demir T, Kaya H. The changes in T lymphocyte subsets following periodontal treatment in patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2006 Jun;41(3):165-70.
 17. Ernst CW, Lee JE, Nakanishi T, Karimbux NY, Rezende TM, Stashenko P, Seki M, Taubman MA, Kawai T. Diminished forkhead box P3/CD25 double-positive T regulatory cells are associated with the increased nuclear factor kappaB ligand (RANKL+) T cells in bone resorption lesion of periodontal disease. *Clin Exp Immunol*. 2007 May;148(2):271-80.
 18. Ford PJ, Gamonal J, Seymour GJ. Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000. 2010 Jun;53:111-23.
 19. Garlet GP, Cardoso CR, Mariano FS, Claudino M, de Assis GF, Campanelli AP, Avila-Campos MJ, Silva JS. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. *J Clin Periodontol*. 2010 Jul;37(7):591-600.
 20. Garant PR. Oral Cells and Tissues. Quintessence Publishing Co. Chicago 2003.
 21. Gemmell E, Carter CL, Hart DN, Drysdale KE, Seymour GJ. Antigen-presenting cells in human periodontal disease tissues. *Oral Microbiol Immunol*. 2002a Dec;17(6):388-93.
 22. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002b;13(1):17-34.
 23. Gruber R. Cell biology of osteoimmunology. *Wien Med Wochenschr*. 2010 Sep;160(17-18):438-45.
 24. Han X, Kawai T, Taubman MA. Interference with immune-cell-mediated bone resorption in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2007;45:76-94.
 25. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res*. 2015;2015:615486.
 26. Hussain QA, McKay IJ, Gonzales-Marin C, Allaker RP. Detection of adrenomedullin and nitric oxide in different forms of periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2016 Feb;51(1):16-25.

27. Jotwani R, Cutler CW. Multiple dendritic cell (DC) subpopulations in human gingiva and association of mature DCs with CD4+ T-cells in situ. *J Dent Res*. 2003 Sep;82(9):736-41.
28. Jotwani R, Palucka AK, Al-Quotub M, Nouri-Shirazi M, Kim J, Bell D, Banchereau J, Cutler CW. Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: in situ, in vivo, and in vitro studies. *J Immunol*. 2001 Oct 15;167(8):4693-700.
29. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihiro S, Seki M, Karimbux NY, Goncalves RB, Valverde P, Dibart S, Li YP, Miranda LA, Ernst CW, Izumi Y, Taubman MA. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*. 2006 Sep;169(3):987-98.
30. Kim YG, Lee CK, Nah SS, Mun SH, Yoo B, Moon HB. Human CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit the differentiation of osteoclasts from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jun 15;357(4):1046-52.
31. Leite FR, Peres KG, Do LG, Demarco FF, Peres MA. Prediction of Periodontitis Occurrence: Influence of the Classification, Sociodemographic and General Health Information. *J Periodontol*. 2017 Mar 31:1-14.
32. Lins RD, Figueiredo CR, Queiroz LM, da Silveira EJ, Freitas Rde A. Immunohistochemical evaluation of the inflammatory response in periodontal disease. *Braz Dent J*. 2008;19(1):9-14.
33. Lins RD, Alves PM, Godoy GP, Silveira EJ, Queiroz LM, Freitas Rde A. Immunohistochemical evaluation of CD25+ cell expression in the progression of periodontal disease. *Braz Dent J*. 2012;23(4):322-7.
34. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, Tan A, Price P, Zheng MH. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med*. 2003 Jan;11(1):17-21.
35. MacDonald BR. Parathyroid hormone, prostaglandins and bone resorption. *World Rev Nutr Diet*. 1986;47:163-201.
36. McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol*. 2002 Nov;73(11):1377-91.
37. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, Murray CJ. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res*. 2013 Jul;92(7):592-7.
38. Melo KM, Carvalho KI, Bruno FR, Ndhlovu LC, Ballan WM, Nixon DF, Kallas EG, Costa-Carvalho BT. A decreased frequency of regulatory T cells in patients with common variable immunodeficiency. *PLoS One*. 2009 Jul 29;4(7):e6269.
39. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000. 2006;40:11-28.

40. Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, Hormdee D, Lu H, Kunze M, Suda T, Koshy G, Kobayashi H, Oda S, Nitta H, Ishikawa I. Roles of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*. 2007;43:65-84.
41. Nakajima T, Ueki-Maruyama K, Oda T, Ohsawa Y, Ito H, Seymour GJ, Yamazaki K. Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *J Dent Res*. 2005 Jul;84(7):639-43.
42. Nath SG, Raveendran R. "What is there in a name?" A literature review on chronic and aggressive periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. 2011 Oct;15(4):318-22.
43. Nowak M, Krämer B, Haupt M, Papapanou PN, Kebschull J, Hoffmann P, Schmidt-Wolf IG, Jepsen S, Brossart P, Perner S, Kebschull M. Activation of invariant NK T cells in periodontitis lesions. *J Immunol*. 2013 Mar 1;190(5):2282-91.
44. Oates TW, Cochran DL. Bone cell interactions and regulation by inflammatory mediators. *Curr Opin Periodontol*. 1996;3:34-44.
45. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*. 1996 Nov;1(1):821-78.
46. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J*. 2009 Sep;54 Suppl 1:S2-10.
47. Okui T, Ito H, Honda T, Amanuma R, Yoshie H, Yamazaki K. Characterization of CD4+ FOXP3+ T-cell clones established from chronic inflammatory lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Feb;23(1):49-54.
48. Okui T, Aoki Y, Ito H, Honda T, Yamazaki K. The presence of IL-17+/FOXP3+ double-positive cells in periodontitis. *J Dent Res*. 2012 Jun;91(6):574-9.
49. Oztürk A, Yildiz L. Expression of transient receptor potential vanilloid receptor 1 and toll-like receptor 4 in aggressive periodontitis and in chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2011 Aug;46(4):475-82.
50. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:9-11.
51. Sabarish R, Rao SR, Lavu V. Natural T Regulatory Cells (n Treg) in the Peripheral Blood of Healthy Subjects and Subjects with Chronic Periodontitis - A Pilot Study. *J Clin Diagn Res*. 2016 Mar;10(3):ZC36-9.
52. Saffar JL, Lasfargues JJ, Cherruau M. Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable. *Periodontol 2000*. 1997 Feb;13:76-90.
53. Saglie FR, Pertuiset JH, Smith CT, Nestor MG, Carranza FA Jr, Newman MG, Rezende MT, Nisengard R. The presence of bacteria in the oral epithelium in periodontal disease. III. Correlation with Langerhans cells. *J Periodontol*. 1987 Jun;58(6):417-22.

-
54. Séguier S, Godeau G, Brousse N. Immunohistological and morphometric analysis of intra-epithelial lymphocytes and Langerhans cells in healthy and diseased human gingival tissues. *Arch Oral Biol*. 2000 Jun;45(6):441-52.
 55. Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol* 2000. 1997 Jun;14:158-72.
 56. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, Hernández M, Gamonal J. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci*. 2015 May-Jun;23(3):329-55.
 57. Smith M, Seymour GJ, Cullinan MP. Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000. 2010 Jun;53:45-54.
 58. Souto GR, Queiroz CM Jr, Costa FO, Mesquita RA. Relationship between chemokines and dendritic cells in human chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2014 Oct;85(10):1416-23.
 59. Stelin S, Ramakrishnan H, Talwar A, Arun KV, Kumar TS. Immunohistological analysis of CD1a langerhans cells and CD57 natural killer cells in healthy and diseased human gingival tissue: A comparative study. *J Indian Soc Periodontol*. 2009 Sep;13(3):150-4.
 60. Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001;12(2):125-35.
 61. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol*. 2005 Nov;76(11 Suppl):2033-41.
 62. Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol*. 2007 Feb;170(2):427-35.
 63. Thorbert-Mros S, Larsson L, Berglundh T. Cellular composition of long-standing gingivitis and periodontitis lesions. *J Periodontal Res*. 2015 Aug;50(4):535-43.
 64. Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa N, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone*. 1999 Nov;25(5):517-23.
 65. Venkatesan G, Uppoor A, Naik DG. Redefining the role of dendritic cells in periodontics. *J Indian Soc Periodontol*. 2013 Nov;17(6):700-5.
 66. Vitales-Noyola M, Martínez-Martínez R, Loyola-Rodríguez JP, Baranda L, Niño-Moreno P, González-Amaro R. Quantitative and functional analysis of CD69(+) T regulatory lymphocytes in patients with periodontal disease. *J Oral Pathol Med*. 2016 Oct 19.

67. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 31;95(7):3597-602.
68. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med*. 2013 Aug 5;15:e7.