



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL

ANA LUIZA DIAS LEITE DE ANDRADE

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE IL-17, TGF- $\beta$ 1 E FOXP3 EM  
GRANULOMAS PERIAPICAIS, CISTOS RADICULARES E CISTOS  
RADICULARES RESIDUAIS**

Natal - RN  
2012

ANA LUIZA DIAS LEITE DE ANDRADE

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE IL-17, TGF- $\beta$ 1 E FOXP3 EM  
GRANULOMAS PERIAPICAIS, CISTOS RADICULARES E CISTOS  
RADICULARES RESIDUAIS**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia Oral.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hébel Cavalcanti Galvão**

Natal - RN  
2012

Catálogo na Fonte. UFRN/ Departamento de Odontologia  
Biblioteca Setorial de Odontologia “Prof<sup>o</sup> Alberto Moreira Campos”.

Andrade, Ana Luiza Dias Leite de.

Expressão imuno-histoquímica de IL-17, TGF- $\beta$ 1 e FOXP3 em granulomas periapicais, cistos radiculares e cistos radiculares residuais / Ana Luiza Dias Leite de Andrade. – Natal, RN, 2011.

127 f. : il.


Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hébel Cavalcanti Galvão.


Dissertação (Mestrado em Patologia Oral) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral.

1. Doenças Periapicais – Dissertação. 2. Citocinas – Dissertação. 3. Linfócito T – Dissertação. 4. Célula Th17 – Dissertação. 5. Imunoistoquímica. – Dissertação.  
I. Galvão, Hébel Cavalcanti. II. Título.

A defesa deste trabalho foi realizada no dia 27 de fevereiro de 2012, em Natal/RN, tendo sido aprovada com conceito "A".

**COMISSÃO EXAMINADORA**

  
Profa. Dra. Marize Raquel Diniz da Rosa  
Universidade Federal da Paraíba

  
Prof. Dr. Antonio de Lisboa Lopes Costa  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

  
Profa. Dra. Hébel Cavalcanti Galvão  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

**"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo.**

**Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta."**

Chico Xavier

**DEDICATÓRIA**

*À Deus por me permitir concretizar este sonho em minha vida e por ter guiado os meus passos na construção dessa vitória.*

*Aos meus pais Lourdinha e Vicente, que me ensinaram tudo o que sou e me apoiaram em todos os momentos que precisei.*

*À minha irmã Ignez pela convivência amorosa e incentivo dedicados.*

*À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com a realização desta conquista...*

*... dedico.*

**"Mestre não é quem sempre ensina,  
mas quem, de repente, aprende".**

João Guimarães Rosa

**AGRADECIMENTO ESPECIAL**

*À minha orientadora **Dr<sup>a</sup> Hébel Cavalcanti Galvão** pela confiança, respeito e carinho depositados. A senhora me recebeu de braços abertos no mestrado e para mim é um exemplo de orientação onde o aluno e o professor participam juntos na construção da pesquisa. Agradeço, ainda, pela sua disponibilidade, se mostrando constantemente solícita a conversar e me ajudar tanto no mestrado como também sempre que precisasse por outros motivos. Obrigada pela amizade, paciência, atenção, pelos conhecimentos transmitidos e pelo convívio agradável durante esses dois anos. Foi um imenso prazer ter sido orientanda da senhora durante esse período!*



**"Existem apenas duas maneiras de ver a vida.  
Uma é pensar que não existem milagres e a outra é que tudo é um milagre".**

Albert Einstein

**AGRADECIMENTOS**

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, razão pela qual não nos deixamos abater diante dos desafios, dúvidas e angústias impostos pelos obstáculos provenientes do cotidiano.

Aos meus pais, **Lourdinha e Vicente**, presentes sempre em seus ensinamentos e exemplos de bondade, honestidade, perseverança e coragem, e que sempre me apoiaram e incentivaram nos momentos em que mais precisei. Agradeço pelo amor incondicional, por todo carinho, atenção e compreensão depositados, principalmente por entenderem os momentos de ausência e pela paciência com a minha contagem de células que parecia ser interminável. Vocês são a minha maior fonte de inspiração e a razão pela qual continuo essa jornada. Obrigada por sempre priorizarem meus estudos!

À minha querida irmã **Ignez** pelo apoio, companheirismo e carinho dispensados. Nossa convivência se tornou mais próxima durante esses dois anos e nos permitiu amadurecer e crescer uma com a outra. Te agradeço pelos momentos de alegria que vivenciamos juntas e pelo entendimento quando tive que priorizar o mestrado.

À minha querida, verdadeira e eterna amiga **Marília Patriota**, pela amizade sólida que só cresce após todos esses anos de convívio. Obrigada pelo carinho sempre depositado, por compreender a minha ausência, pela força diante das dificuldades, pela paciência nos momentos de ansiedade, pela generosidade e disponibilidade em ajudar e por eu sempre ter em você alguém em quem eu possa confiar. Muito obrigada por tudo, amiga!

Aos meus amigos da graduação **Camila Costa, Manuela Carneiro, Tatyanne Falcão, Samara Azevedo e Matheus Almeida**, agradeço imensamente pelo companheirismo e pelos vários momentos de descontração que me permitem recordar com saudade a nossa jornada no curso de Odontologia. Desejo todo o sucesso possível para cada um de vocês, pois tenho plena certeza da qualidade de profissionais que são. **Camila e Manu**, minhas amigas mestres, obrigada pela ajuda mútua e por compartilharem comigo todas as alegrias, dificuldades e experiências que passamos durante esse dois anos. Mesmo estando longe fisicamente, pude me sentir um pouco perto de vocês enquanto conversávamos e parecíamos ainda estudar na mesma turma.

À todo corpo docente do Programa de Pós-graduação em Patologia Oral da UFRN. Ao Drº **Leão Pereira Pinto** pelo exemplo de dedicação e amor ao trabalho. À **Drª Lélia Batista de Souza**, por todos os ensinamentos compartilhados e incentivos para nos tornarmos profissionais de qualidade. À **Drª Roseana de Almeida Freitas** pela enorme competência com a qual coordena o programa e pela sua disponibilidade em nos ajudar em todos os momentos que precisarmos. À **Dra. Lélia Maria Guedes Queiroz**, pela sua simplicidade, generosidade e pelo convívio harmonioso. À **Drª Márcia Cristina da Costa Miguel** pela sua incrível capacidade de transmitir conhecimentos e de nos estimular a sempre adquiri-los. À **Drª Éricka Janine Dantas da Silveira** pela sua paixão pela docência que contagia a todos e nos faz acreditar que com perseverança, iremos atingir os nossos objetivos. Ao **Drº Antônio de Lisboa Lopes Costa** pelos saberes transmitidos e pela amizade com todos os alunos. À **Drª Ana Myriam Costa de Medeiros** pela dedicação e momentos de descontração vividos na clínica. À **Manuel Antônio Gordón-Nuñez**, pela sua amizade, humildade e generosidade, sempre se mostrando solícito a me ajudar nos momentos em que precisei. Obrigada também pelas valiosas contribuições que fez com este trabalho, pois foram muito bem aceitas. Sua participação foi fundamental para construção desta pesquisa.

À professora **Marize Raquel Diniz da Rosa**, minha primeira orientadora e um exemplo de profissional para mim pela dedicação e competência no desempenho de suas funções. Agradeço pelo incentivo que a senhora me forneceu nos anos de monitoria, na elaboração do meu TCC e mais ainda, pelo apoio dado nessa nova empreitada da minha vida. Acredito que grande parte do que me tornei profissionalmente foi tendo a senhora como exemplo.

À **Cassiano Nonaka** pela disponibilidade em ajudar e pelas colaborações com este estudo, tanto nas etapas laboratoriais iniciais como nesta fase final com a realização da análise estatística.

Aos meus amigos da turma do mestrado **Dmitry Sarmiento, Edilmar Moura, Lucileide de Oliveira e Pedro Carlos** pelo companheirismo e convivência diária agradável. Agradeço a vocês pelo incentivo fornecido, pela ajuda depositada e pelo apoio em todos os momentos dessa caminhada em que crescemos juntos. **Dmitry**, obrigada pela paciência principalmente nos momentos de TPM coletiva, pela disponibilidade em ajudar sempre e por se mostrar um amigo verdadeiro com o qual pude contar quando precisei.

Às minhas queridíssimas xuxus **Natália Guimarães, Bárbara Monteiro, Clarissa Demeda, Denise Oliveira e Roseane Vasconcelos**, agradeço de coração. **Natália**, você veio primeiro porque você pode às vezes (só às vezes) até ser a última a saber das coisas, mas você sempre será lembrada por todas nós pela sua tranqüilidade e seu jeito meigo de ser. Me recordo do dia da prova teórica da seleção do mestrado em que pensávamos que não íamos passar e hoje, graças a Deus, estamos as duas concluindo o mestrado. Xuxu, agradeço pelo carinho depositado e por sempre se mostrar solícita a me ouvir nos momentos difíceis. À **Bárbara**, uma fofa e pessoa de coração bom, que não posso falar muito para ela não ficar mais convencida. Mas é tudo brincadeira, você não é convencida e mesmo que fosse verdade, teria motivos de sobra para isso. Acredite no seu potencial que você vai longe, amiga. À **Clarissa**, pelo exemplo de organização (xuxu, um dia eu ainda vou aprender a ser como você e fazer tudo com antecedência!) e respeito para como todos. À **Denise**, minha quase irmã gêmea, agradeço a você por tudo que fez por mim, pelo exemplo de amiga, de pessoa, de profissional e de filha. Às vezes me pergunto como nossa amizade cresceu em tão pouco tempo, e hoje sou grata por ter sido sorteada a apresentar com você o primeiro seminário da disciplina de Estomatologia, pois foi a partir dele que começou nossa amizade e pelo MSN. Te agradeço, ainda, pelo seu companheirismo, bondade, humildade, paciência e cumplicidade tanto nos momentos de alegria como nos de tristeza, que nos permitiram passar por tantos obstáculos juntas. À **Rose**, uma das pessoas mais engraçadas que eu conheço e a principal responsável pelas minhas inúmeras gargalhadas na patologia. Agradeço a você não apenas por todos os momentos de descontração, mas também pela sua generosidade e por se mostrar sempre tão solícita a ajudar. À todas vocês, xuxus, desejo que nossa amizade se perpetue e se consolide ao longo dos anos.

Às minhas irmãs patológicas **Adriana Amorim e Stefânia Ferreira**, pelo convívio agradável e ajuda mútua nos momentos difíceis. Adri, nunca esquecerei das nossas conversas no HUOL enquanto atendíamos os pacientes nefropatas. Ster, você é uma pessoa que transmite alegria e que cativa a todos, obrigada por sua disponibilidade em ajudar e pela paciência nos momentos em que precisei.

Aos demais amigos do Doutorado **Keila, Emeline, Cyntia, Maiara, Cida, Joabe, Felipe, Fernando, Águida, Ana Rafaela, Alessandra, Bruna Rafaela, Marcelo Gadelha, Pedro Paulo, Adriana Câmara, Emília, Rodrigo e Nazareno**, pelo companheirismo, troca de saberes e pelos diversos momentos de descontração e risadas vividos durante esses dois anos de convívio.

*Aos funcionários da Patologia Oral **Lourdinha, Sandrinha, Gracinha, Idelzuite, Hévio, Ricardo e Canindé** por toda ajuda fornecida, pois sem vocês essa pesquisa não seria possível. Agradeço imensamente pelo excelente trabalho executado por todos, pela convivência harmoniosa e pelo carinho depositado. **Lourdinha**, garotxinha, você é uma pessoa que contagia e transmite alegria de viver. Muito obrigada pela consideração, força e carinho sempre dispensados. Você é uma pessoa que mora em meu coração!*

*À CAPES pelo apoio e incentivo financeiro que me permitiram cursar o Mestrado e realizar esta pesquisa.*

**“Para os crentes, Deus está no princípio de todas as coisas.**

**Para os cientistas, no final de toda reflexão”**

Max Planck

**RESUMO**

## RESUMO

Lesões periapicais crônicas são condições inflamatórias dos tecidos perirradiculares consideradas sequelas diretas de processos infecciosos resultantes da necrose pulpar e consequente progressão para a região periapical. A participação da resposta imunológica e da reabsorção óssea na formação destas lesões tem sido bastante investigada, de modo que diversos tipos celulares e citocinas foram apontados como colaboradores deste processo. Nesta perspectiva, o presente estudo objetivou avaliar a expressão imuno-histoquímica da IL-17, TGF- $\beta$ 1 e FoxP3 em granulomas periapicais (GPs), cistos radiculares (CRs) e cistos radiculares residuais (CRRs), buscando um melhor entendimento sobre a etiopatogênese destas periapicopatias. Para tanto, foram selecionados 20 casos de GPs, 20 de CRs e 10 de CRRs para serem submetidos à análise morfológica e imuno-histoquímica para os biomarcadores supracitados, sendo esta última realizada quantitativamente através de escores e percentuais médios de imunomarcagem para a análise da IL-17 e do TGF- $\beta$ 1, enquanto que para o FoxP3 foram contados apenas os linfócitos positivos. Os resultados demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre as imunoexpressões do TGF- $\beta$ 1 e do FoxP3 em relação as lesões periapicais pesquisadas ( $p = 0,002$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente), mas não entre a IL-17 e estas ( $p = 0,355$ ). Além disso, a análise dos linfócitos FoxP3-positivos revelou diferenças estatísticas significativas no que se refere à intensidade do infiltrado inflamatório ( $p = 0,003$ ) e também quanto à espessura do revestimento epitelial ( $p = 0,009$ ). Por fim, observou-se nos casos de GPs, forte correlação positiva entre a quantidade de linfócitos FoxP3-positivos e a imunoexpressão do TGF- $\beta$ 1 ( $r = 0,755$ ;  $p < 0,001$ ), assim como moderada correlação positiva entre as imunoexpressões da IL-17 e do TGF- $\beta$ 1 ( $r = 0,503$ ;  $p = 0,024$ ). Destarte, pode-se concluir que interações entre células Th17 e Treg parecem ser estabelecidas no local da agressão, sugerindo a participação de citocinas tanto pró-inflamatórias como imunorregulatórias na patogenia das lesões periapicais.

**Palavras-chave:** Doenças periapicais; citocinas; linfócitos T reguladores; células Th17; imunoistoquímica.





**ABSTRACT**

## ABSTRACT

Periapical lesions are chronic inflammatory conditions of periradicular tissues considered direct consequences of infectious diseases resulting from pulp necrosis and subsequent progression to periapical region. The participation of the immune response and bone resorption in the formation of these lesions has been investigated, so that different cell types and cytokines have been identified as contributors to this process. In this perspective, this study aimed to evaluate the immunohistochemical expression of IL-17, TGF- $\beta$ 1 and FoxP3 in periapical granulomas (PGs), radicular cysts (RCs) and residual radicular cysts (RRCs), seeking a better understanding of the etiopathogenesis these periapicopatias. To this end, we selected 20 cases of GPs, 20 CRs and 10 RRCs to undergo morphological analysis and immunohistochemistry for biomarkers above, the latter being performed quantitatively using scores and average percentages of immunostaining for the analysis of IL-17 and TGF- $\beta$ 1, while for the FoxP3 were counted only the positive lymphocytes. The results showed statistically significant differences between TGF- $\beta$ 1 and FoxP3 immunoexpressions, in relation to the periapical lesions studied ( $p = 0.002$ ,  $p < 0.001$ , respectively) but not between IL-17 and these ( $p = 0.355$ ). Furthermore, the analysis of lymphocytes FoxP3-positive revealed significant statistical differences in that refers to the intensity of inflammatory infiltrate ( $p = 0.003$ ) and also regarding thickness of the epithelial lining ( $p = 0.009$ ). Finally, it was observed in the case of PGs, strong positive correlation between the amount of FoxP3-positive lymphocytes and the immunohistochemical expression of TGF- $\beta$ 1 ( $r = 0.755$ ,  $p < 0.001$ ), as well as moderate positive correlation between IL-17 and TGF- $\beta$ 1 immunoexpressions ( $r = 0.503$ ,  $p = 0.024$ ). Thus, we can conclude that interactions between Th17 and Treg cells seem to be established at the site of injury, suggesting the involvement of both pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of periapical lesions.

**Key words:** Periapical diseases; cytokines; T-lymphocytes, regulatory; Th17 cells; immunohistochemistry.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática dos domínios estruturais do FoxP3 (CAMPBELL; ZIEGLER, 2007).....	48
<b>Quadro 1</b>	Especificações dos anticorpos utilizados na pesquisa. Natal – RN, 2012.....	61
<b>Gráfico 1</b>	Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para a IL-17 de acordo com o tipo de lesão. Natal – RN, 2012.....	69
<b>Gráfico 2</b>	Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para a IL-17 de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal – RN, 2012.....	70
<b>Gráfico 3</b>	Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para a IL-17 de acordo com a espessura do revestimento epitelial nos CRs e CRRs. Natal – RN, 2012.....	71
<b>Gráfico 4</b>	Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para a IL-17 de acordo com a sintomatologia das lesões. Natal – RN, 2012.....	72
<b>Gráfico 5</b>	Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 de acordo com o tipo de lesão. Natal – RN, 2012.....	73
<b>Gráfico 6</b>	Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal – RN, 2012.....	74
<b>Gráfico 7</b>	Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 de acordo com a espessura do revestimento epitelial nos cistos radiculares e radiculares residuais. Natal – RN, 2012.....	75
<b>Gráfico 8</b>	Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 de acordo com a sintomatologia das lesões. Natal – RN, 2012.....	76
<b>Gráfico 9</b>	Box-plot relativo à quantidade de linfócitos FoxP3-positivos de acordo com o tipo de lesão. Natal – RN, 2012.....	78
<b>Gráfico 10</b>	Box-plot relativo à quantidade de linfócitos FoxP3-positivos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal – RN, 2012.....	79
<b>Gráfico 11</b>	Box-plot relativo à quantidade de linfócitos FoxP3-positivos de acordo com a espessura do revestimento epitelial nos cistos radiculares e radiculares residuais. Natal – RN, 2012.....	80

<b>Gráfico 12</b>	Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o FoxP3 de acordo com a sintomatologia das lesões. Natal – RN, 2012.....	81
<b>Figura 2</b>	Fotomicrografias exibindo os aspectos morfológicos do granuloma periapical (A), cisto radicular (B) e cisto radicular residual (C) (Hematoxilina/Eosina – 200x).....	83
<b>Figura 3</b>	Graus de intensidade do infiltrado inflamatório: GP exibindo infiltrado intenso (A), CR com infiltrado moderado (B) e CRR com infiltrado discreto (C) (H/E – 200x).....	84
<b>Figura 4</b>	Cisto radicular residual exibindo revestimento epitelial pavimentoso estratificado não cetatinizado atrófico (H/E – 200x).....	85
<b>Figura 5</b>	Cisto radicular exibindo revestimento epitelial pavimentoso estratificado não cetatinizado hiperplásico (H/E – 200x).....	85
<b>Figura 6</b>	Expressão imuno-histoquímica de IL-17 em granuloma periapical evidenciada em citoplasma de células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos. Advance (400x).....	86
<b>Figura 7</b>	Expressão imuno-histoquímica de IL-17 em cisto radicular evidenciada em citoplasma de células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos. Advance (400x).....	86
<b>Figura 8</b>	Expressão imuno-histoquímica de IL-17 em cisto radicular residual evidenciada em citoplasma de células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos. Advance (400x).....	87
<b>Figura 9</b>	Expressão imuno-histoquímica de TGF- $\beta$ 1 em granuloma periapical evidenciada em citoplasma de células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos. Advance (400x).....	87
<b>Figura 10</b>	Expressão imuno-histoquímica de TGF- $\beta$ 1 em cisto radicular evidenciada em citoplasma de células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos. Advance (400x).....	88
<b>Figura 11</b>	Expressão imuno-histoquímica de TGF- $\beta$ 1 em cisto radicular residual evidenciada em citoplasma de células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos. Advance (400x).....	88
<b>Figura 12</b>	Expressão imuno-histoquímica do FoxP3 em granulomas periapicais evidenciada no núcleo de linfócitos. Envision (400x).....	89
<b>Figura 13</b>	Expressão imuno-histoquímica do FoxP3 em cistos radiculares	

	evidenciada no núcleo de linfócitos. Envision (400x).....	89
<b>Figura 14</b>	Expressão imuno-histoquímica do FoxP3 em cistos radiculares residuais evidenciada no núcleo de linfócitos. Envision (400x).....	90

## **LISTA DE TABELAS**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Distribuição dos casos de GPs, CRs e CRRs de acordo com o sexo, raça, localização anatômica e sintomatologia. Natal/RN, 2012.....	66
<b>Tabela 2</b>	Distribuição dos casos de GPs, CRs e CRRs de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal/RN, 2012.....	67
<b>Tabela 3</b>	Distribuição dos casos de CRs e CRRs de acordo com a espessura do revestimento epitelial. Natal/RN, 2012.....	68
<b>Tabela 4</b>	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística KW e significância estatística ( <i>p</i> ) para os escores de imunopositividade para a IL-17 relação ao tipo de lesão. Natal – RN, 2012.....	69
<b>Tabela 5</b>	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( <i>p</i> ) para os escores de imunopositividade para a IL-17 em relação à intensidade do infiltrado inflamatório. Natal – RN, 2012.....	70
<b>Tabela 6</b>	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( <i>p</i> ) para os escores de imunopositividade para a IL-17 em relação à espessura do revestimento epitelial nos CRs e CRRs. Natal – RN, 2012.....	71
<b>Tabela 7</b>	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( <i>p</i> ) para os escores de imunopositividade para a IL-17 em relação à sintomatologia das lesões. Natal – RN, 2012.....	72
<b>Tabela 8</b>	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística KW e significância estatística ( <i>p</i> ) para os escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 em relação ao tipo de lesão. Natal – RN, 2012.....	73
<b>Tabela 9</b>	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( <i>p</i> ) para os escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 em relação à intensidade do infiltrado inflamatório. Natal – RN, 2012.....	74



<b>Tabela 10</b>	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( <i>p</i> ) para os escores de imunopositividade para o TGF-β1 em relação à espessura do revestimento epitelial nos CRs e CRRs. Natal – RN, 2012.....	75
<b>Tabela 11</b>	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( <i>p</i> ) para os escores de imunopositividade para o TGF-β1 em relação à sintomatologia das lesões. Natal – RN, 2012.....	76
<b>Tabela 12</b>	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística KW e significância estatística ( <i>p</i> ) para o número de linfócitos FoxP3-positivos em relação ao tipo de lesão. Natal – RN, 2012.....	77
<b>Tabela 13</b>	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( <i>p</i> ) para o número de linfócitos FoxP3-positivos em relação à intensidade do infiltrado inflamatório. Natal – RN, 2012.....	78
<b>Tabela 14</b>	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( <i>p</i> ) para o número de linfócitos FoxP3-positivos em relação à espessura do revestimento epitelial nos cistos radiculares e radiculares residuais. Natal – RN, 2012.....	79
<b>Tabela 15</b>	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( <i>p</i> ) para os escores de imunopositividade para o FoxP3 em relação à sintomatologia das lesões. Natal – RN, 2012.....	80
<b>Tabela 16</b>	Tamanho da amostra, valor estatístico para o coeficiente de correlação de Spearman ( <i>r</i> ) e significância estatística ( <i>p</i> ) para a quantidade de linfócitos FoxP3-positivos em relação às imunorexpressões de IL-17 e TGF- β, de acordo com o tipo de lesão. Natal, RN – 2012.....	82

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>AP</b>	Proteína ativadora (do inglês “ <i>Activator protein</i> ”)
<b>APC</b>	Célula apresentadora de antígenos (do inglês “ <i>Antigen-presenting cell</i> ”)
<b>cAMP</b>	Adenosina monofosfato cíclica (do inglês “ <i>Cyclic adenosine monophosphate</i> ”)
<b>CNS</b>	Sequência de DNA não-codificada conservada (do inglês “ <i>Conserved non-coding DNA sequence</i> ”)
<b>CD</b>	Unidade de diferenciação (do inglês “ <i>Cluster of differentiation</i> ”)
<b>CR</b>	Cisto radicular
<b>CRR</b>	Cisto radicular residual
<b>CTLA-4</b>	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (do inglês “ <i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i> ”)
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidérmico (do inglês <i>Epidermal growth factor</i> )
<b>ELISA</b>	Teste de imunoabsorção enzimática (do inglês “ <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ”)
<b>FoxP3</b>	Fator de transcrição <i>forkhead Box P3</i>
<b>GATA-3</b>	Fator de transcrição para célula Th2
<b>GITR</b>	Receptor TNF induzido por glicocorticóide (do inglês “ <i>Glucocorticoid-induced tumour-necrosis-factor-receptor</i> ”)
<b>GP</b>	Granuloma periapical
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>HLA</b>	Antígeno de leucócitos humanos (do inglês “ <i>Human leukocyte antigen</i> ”)
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-17R</b>	Receptor da IL-17
<b>IPEX</b>	Síndrome da desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia ligada ao X (do inglês “ <i>Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked</i> ”)
<b>KGF</b>	Fator de crescimento de ceratinócitos (do inglês “ <i>Keratinocyte growth factor</i> ”)
<b>LAP</b>	Peptídeo associado à latência (do inglês “ <i>Latency-associated peptide</i> ”)
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MHC</b>	Complexo de histocompatibilidade principal (do inglês “ <i>Major</i> ”)

*histocompatibility complex*")

<b>NFAT</b>	Fator nuclear de células T ativadas (do inglês "Nuclear factor of activated T cells")
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear kappa B (do inglês " <i>Nuclear factor-kappa B</i> ")
<b>NK</b>	Célula <i>natural killer</i>
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>RANK</b>	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
<b>RANKL</b>	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
<b>RORγt</b>	Receptor órfão relacionado à retinoide γt (do inglês " <i>Retinoic acid-related orphan receptor γt</i> ")
<b>STAT</b>	Transdutor de sinal e ativador de transcrição (do inglês " <i>Signal transducer and activator of transcription</i> ")
<b>T-bet</b>	Fator de transcrição para célula Th1
<b>TCR</b>	Receptor de célula T (do inglês " <i>T cell receptor</i> ")
<b>Teff</b>	Célula T efetora
<b>TGF</b>	Fator transformador de crescimento (do inglês " <i>Transforming growth factor</i> ")
<b>TGF-βR</b>	Receptor do fator transformador de crescimento-β
<b>Th</b>	Células T auxiliar (do inglês " <i>T helper</i> ")
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral (do inglês " <i>Tumor necrosis factor</i> ")
<b>TNFR</b>	Receptor do fator de necrose tumoral
<b>Treg</b>	Célula T regulatória



## SUMÁRIO

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	31
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	34
2.1 ASPECTOS GERAIS DAS LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS	34
2.1.1 Granuloma Periapical	34
2.1.2 Cisto Radicular	35
2.1.3 Cisto Radicular Residual	40
2.2 PATOGENIA DAS LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS	42
2.2.1 Células Th17	45
2.2.2 Células Tregs	47
2.2.3 Diferenciação Th17/Treg	51
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	56
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	58
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	58
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	58
4.3 POPULAÇÃO	58
4.4 AMOSTRA	58
4.4.1 Critérios de Inclusão da Amostra	58
4.4.2 Critérios de Exclusão da Amostra	59
4.5 COLETA DOS DADOS CLÍNICOS	59
4.6 ESTUDO MORFOLÓGICO	60
4.7 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	60
4.8 ANÁLISE DO PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO	62
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
<b>5 RESULTADOS</b>	66
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	66
5.2 RESULTADOS MORFOLÓGICOS	67
5.3 RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS	68

<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	92
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	106
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	108
<b>APÊNDICES</b> .....	120
<b>ANEXOS</b> .....	127

# INTRODUÇÃO



## 1 INTRODUÇÃO

Em condições de normalidade, a polpa dentária se mantém saudável e protegida dos microrganismos orais pelo arcabouço formado pelo esmalte e pela dentina. No entanto, quando exposta à bactérias e seus subprodutos, reações inflamatórias inespecíficas e reações imunológicas específicas podem ser desencadeadas nos tecidos perirradiculares (TROWBRIDGE, 1990; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). As principais vias de contaminação pulpar são exposições dos túbulos dentinários, exposição pulpar direta, forames laterais e apicais, e através de bactérias disseminadas no sangue (TAKAHASHI et al, 1998). A intensidade da resposta inflamatória do tecido pulpar localizado abaixo de uma área de injúria, como por exemplo, de um processo carioso irá depender da profundidade da invasão bacteriana e das alterações da permeabilidade dentinária (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004).

Inicialmente, a resposta imune do hospedeiro à infecção bacteriana à polpa e tecidos periapicais envolve o afluxo de fagócitos e a produção de citocinas inflamatórias características da imunidade inata. Com a progressão da doença para uma fase crônica, observa-se a migração de elementos celulares da imunidade adaptativa, incluindo várias subpopulações de células T (ALSHWAIMI et al, 2009). Desta forma, lesões periapicais crônicas são desenvolvidas como consequência da resposta imune aos antígenos microbianos e da incapacidade dos mecanismos de defesa do hospedeiro em debelar a infecção bacteriana. (MARTON; KISS, 2000; NAIR, 2006).

Nesta fase crônica do processo inflamatório, caso não receba tratamento adequado, a lesão periapical pode permanecer e dar origem a um granuloma periapical (GP), um cisto radicular (CR) ou tecido cicatricial (RICUCCI; MANNOCCI, 2006; SCHULZ et al, 2009). O GP corresponde a uma massa de tecido de granulação associada ao ápice de um dente sem vitalidade pulpar (MELO et al, 2003), enquanto que o CR refere-se a uma lesão periapical que se desenvolve a partir de um GP e que se caracteriza pela presença de uma cavidade patológica revestida por epitélio devido a proliferação de restos epiteliais de Malassez (NAIR et al, 1998). Além disso, quando o tecido inflamatório periapical não é completamente curetado durante a exodontia de um elemento dentário acometido por um CR, este poderá persistir e um cisto radicular residual (CRR) poderá ser desenvolvido. Assim, GPs, CRs e

CRRs representam estágios distintos de um mesmo processo inflamatório (NEVILLE et al, 2009).

A participação da resposta imune e da reabsorção óssea na formação de lesões periapicais crônicas tem sido bastante estudada. Entretanto, a resposta imune celular e a participação de cada citocina na modulação da inflamação e reabsorção óssea ainda necessitam esclarecimentos futuros (MARÇAL et al, 2010).

Células Th17 e T regulatórias (Tregs) correspondem a tipos de linfócitos T que desempenham funções fundamentais na homeostase da resposta imunológica (CHEN et al, 2011). As células Th17 secretam um conjunto particular de citocinas, incluindo a interleucina (IL)-17, com função protetora contra determinadas infecções bacterianas, além de participarem das respostas patogênicas em doenças autoimunes (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Por sua vez, as células Tregs possuem como fator de transcrição mestre o *forkhead Box P3* (FoxP3) e são capazes de suprimir a proliferação e função de diversos tipos celulares. Entretanto, a diferenciação de células T virgens (*naives*) em cada uma dessas linhagens depende principalmente dos níveis do fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (CHEN et al, 2011).

Diante do exposto, a presente pesquisa objetiva avaliar e comparar a expressão imuno-histoquímica da IL-17, TGF- $\beta$ 1 e FoxP3 em GPs, CRs e CRRs , buscando-se que a realização da mesma possa contribuir para um melhor entendimento sobre a etiopatogênese das lesões periapicais crônicas estudadas.

# REVISÃO DE LITERATURA

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS DAS LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS

#### 2.1.1 Granuloma Periapical

O GP corresponde a uma periapicopatia geralmente de longa duração que se desenvolve após a morte do tecido pulpar devido a estímulos físicos, químicos e/ou bacterianos de baixa intensidade, estando intimamente relacionados com lesões cariosas (MELO et al, 2003). Podem se originar após a estabilização de um abscesso periapical ou como uma alteração periapical inicial. No entanto, como são lesões dinâmicas, os GPs podem se transformar em CRs ou desenvolver exacerbações agudas com a formação de abscessos (NEVILLE et al, 2009).

Frequentemente, os GPs representam a alteração de natureza inflamatória mais comumente encontrada nos ossos gnáticos. Beconsall-Ryan et al (2010) e Neville et al (2009) relataram que os GPs corresponderiam a 59,7% e 75% das lesões inflamatórias analisadas, respectivamente.

Em estudo realizado por Melo et al (2003), os GPs foram observados mais frequentemente em pacientes do sexo feminino, entre 20 e 30 anos de idade e localizados preferencialmente na maxila. Geralmente apresentam-se como lesões assintomáticas, sendo comumente descobertas em radiografias de rotina cujo aspecto radiográfico é de uma lesão radiolúcida que varia de redonda a oval, de tamanho variável, bem ou mal definida e que exhibe perda da lâmina dura apical do elemento dentário envolvido (NEVILLE et al, 2009).

Microscopicamente o GP consiste em tecido de granulação inflamado circundado por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, que se caracteriza pela presença de infiltrado inflamatório linfocítico variável, geralmente associado a neutrófilos, plasmócitos, histiócitos e eventuais mastócitos e eosinófilos (ROCHA et al, 2007; NEVILLE et al, 2009). Em lesões que apresentam um número acentuado de plasmócitos podem ser observados também glóbulos eosinofílicos de gamaglobulina denominados de corpúsculos de Russell. Cristais de colesterol e células gigantes multinucleadas associadas são achados histológicos que podem ser ainda identificados. Desta forma, apesar de sua denominação se remeter a um tecido de

granulação, os GPs não representam uma reação granulomatosa verdadeira (REGEZZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008; NEVILLE et al, 2009).

Além disso, ilhotas de epitélio pavimentoso estratificado provenientes dos restos epiteliais de Malassez derivados da bainha epitelial de Hertwig que permaneceram na região periapical após o término da odontogênese podem ser observados em alguns GPs, sendo tais lesões denominadas de granulomas epitelizados (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004; ROCHA et al, 2007; NEVILLE et al, 2009). Desta forma, consistem em um estágio de transição entre o GP e o CR, formado por tecido de granulação com proliferação epitelial, mas ausente de cavidade patológica (NOBUHARA; DEL RIO, 1993; RICUCCI; MANNOCCI, 2006).

A principal modalidade de tratamento indicada para os GPs é a terapia endodôntica conservadora, sendo seu sucesso baseado na eliminação dos microrganismos invasores através da desinfecção da região periapical, câmara pulpar e sistema de canais radiculares, além do selamento dos mesmos por meio da obturação do canal. Entretanto, é indispensável que se faça o acompanhamento do elemento dentário acometido, de modo que é indicada a preservação clínica e radiográfica por um período correspondente a dois anos (MELO et al, 2003; AZAMBUJA et al, 2006; NEVILLE et al, 2009). Contudo, caso o dente não possa ser restaurado e conseqüentemente, preservado, a extração do mesmo seguida pela curetagem do tecido inflamatório apical deve ser realizada (NEVILLE et al, 2009).

### **2.1.2 Cisto Radicular**

Segundo a Organização Mundial de Saúde, os cistos localizados na região maxilofacial se classificam em odontogênicos e não-odontogênicos. Os primeiros, por sua vez, se subdividem em cistos de desenvolvimento e inflamatórios, sendo os principais representantes deste último grupo, os CRs (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992).

Os CRs (cisto periapical, periodontal apical ou perirradicular) são considerados lesões de natureza inflamatória que se desenvolvem a partir de um GP preexistente (REGEZZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008; NEVILLE et al, 2009). Nesta perspectiva, embora os mecanismos envolvidos no processo de crescimento e expansão das lesões periapicais ainda não sejam totalmente conhecidos, um CR é considerado como uma seqüência direta do GP, embora um GP não evolua necessariamente para um CR (NAIR, 1998).

De acordo com a literatura pesquisada, representam as lesões císticas mais comumente encontradas nos maxilares, compreendendo de 38,8% a 72,5% de todos os cistos odontogênicos diagnosticados nestes estudos (LEDESMA-MONTES et al, 2000; MOSQUEDA-TAYLOR et al, 2002; JONES et al, 2006; GROSSMANN et al, 2007; OCHSENIUS et al, 2007; PROCKT et al, 2008). Entre a população infantil, no entanto, geralmente são mais raros, como observado por Bodner et al (2002) e Iatrou et al (2009), em cujas pesquisas os CRs representaram 13,3% e 10,6%, respectivamente, do total de lesões diagnosticadas. Deste modo, afetam indivíduos de diferentes faixas etárias, sendo mais prevalentes entre a terceira e sexta décadas de vida, e raros na primeira década (REGEZZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008).

Quanto à distribuição entre os gêneros, foi observada divergência nos resultados encontrados em alguns estudos. Prockt et al (2008) não identificaram diferenças estatisticamente significativas entre os sexos. No entanto, o sexo feminino foi o mais acometido em pesquisa realizada por Raitz et al (2000), já que, segundo os autores, as mulheres possuem cronologia de erupção dentária mais precoce quando comparada com a observada nos homens. Em contraste, outros estudos indicaram o sexo masculino como o de maior prevalência (JONES et al, 2006; OCHSENIUS et al, 2007) e este fato foi justificado por Shear e Speight (2011), pela maior negligência dos indivíduos do sexo masculino, principalmente com a higiene oral dos incisivos anteriores superiores e também pela maior probabilidade de sofrerem traumas nesta região. No que se refere a sua localização anatômica preferencial, a maioria acomete a região anterior de maxila, seguida da posterior de maxila, de mandíbula e por fim, anterior de mandíbula (REGEZZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008).

Semelhantemente ao observado em GPs, os CRs geralmente são assintomáticos, exceto quando há exacerbação inflamatória aguda ou em casos de lesões de grandes proporções. De forma análoga, essas duas lesões são consideradas indistinguíveis quando apenas seus aspectos radiográficos são considerados, apresentando-se o CR também como uma radiolucidez redonda a oval, de tamanho variado, na qual uma margem radiopaca pode ser observada perifericamente (REGEZZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008; NEVILLE et al, 2009).

Histologicamente, o CR corresponde a uma lesão inflamatória crônica caracterizada pela presença de uma cavidade patológica revestida parcial ou totalmente por epitélio pavimentoso estratificado, geralmente não ceratinizado e de espessura variável (NAIR, 1998). A cápsula de tecido conjuntivo fibroso subjacente possui quantidades variadas de células inflamatórias (TSAI et al, 2004). Calcificações nodulares denominadas corpúsculos de

Rushton, calcificações distróficas, cristais de colesterol com células gigantes multinucleadas associadas e corpos hialinos representados por pequenas poças de material eosinofílico com periferia ondulada de colágeno, podendo ser circundados por células gigantes multinucleadas e/ou conter células inflamatórias; podem ser achados ocasionalmente observados (REGEZZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008; NEVILLE et al, 2009).

Os CRs podem ser classificados em duas categorias distintas como apontado por Simon (1980). As lesões que apresentavam cavidades completamente delimitadas pelo revestimento epitelial sem comunicação com o canal radicular foram chamadas de cistos verdadeiros. Já aquelas cuja porção apical do dente projetava-se para o interior do lúmen cístico foram designadas de cistos "baía" (NAIR, 2007).

A formação dos CRs tem sido descrita como decorrente de três estágios principais (SHEAR; SPEIGHT, 2011). Na primeira fase, chamada de iniciação, restos epiteliais que se apresentavam quiescentes proliferam provavelmente sob influência de endotoxinas bacterianas, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento liberados durante a inflamação periradicular (GAO; FLAITZ; MACKENZIE, 1996; MEGHJI et al, 1996; LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007). Caso sejam estimulados a proliferar, os restos epiteliais se comportam como células-tronco com potencial restrito de diferenciação, sendo a formação dos CRs desencadeada provavelmente pela fusão de cordões de células epiteliais proliferadas para formar uma massa esférica tridimensional (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007). Geralmente se considera que o epitélio cístico seja derivado de restos epiteliais de Malassez presentes no ligamento periodontal. No entanto, outras fontes provavelmente envolvidas são o epitélio crevicular, o revestimento sinusal e o revestimento epitelial dos trajetos fistulosos (NEVILLE et al, 2009).

Estudos com biologia molecular e celular tentaram responder a diversas questões relacionadas com a formação cística e estimulação dos restos epiteliais de Malassez a se proliferarem (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007). Inicialmente, Brunette (1984) demonstrou que a elevação nos níveis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) causada por prostaglandinas (PGs) E2 estimulou o crescimento de restos epiteliais localizados no ligamento periodontal. Em pesquisas posteriores, foi relatado que a IL-1 e a IL-6 possuíam a capacidade de estimular a proliferação de células epiteliais (GROSSMAN et al, 1989; CHEDID et al, 1994). No entanto, Gao et al (1996) sugeriram que o fator de crescimento de ceratinócitos (KGF), produzido por fibroblastos estromais, atua especialmente na estimulação do crescimento e diferenciação epitelial dos restos epiteliais de Malassez. Em experimento realizado por estes autores, observou-se que citocinas pró-inflamatórias poderiam estimular

indiretamente a proliferação e crescimento de restos celulares epiteliais pela indução da expressão do KGF em fibroblastos estromais (GAO; FLAITS; MACKENZIE, 1996).

Estudos indicam também a atuação do fator de crescimento epidérmico (EGF), que é expresso em células epiteliais do ligamento periodontal normal e em cistos odontogênicos (IRWIN; SCHOR; FERGUSON, 1991; LI; BROWNE; MATHEWS, 1993). Desta forma, foi sugerido que a PGE<sub>2</sub>, IL-1, IL-6, o fator de necrose tumoral (TNF) e TGF- $\alpha$ , um potente mitógeno de células epiteliais, poderiam modular a atividade bioquímica de receptores de EGF ou regular a expressão de seus genes, melhorando conseqüentemente a afinidade da ligação ligante-receptor e estimulando a proliferação de restos epiteliais celulares (IRWIN; SCHOR; FERGUSON, 1991; LI; BROWNE; MATHEWS, 1993; CHANG et al, 1996).

Suzuki et al, (2002) sugeriram ainda a participação de outras duas moléculas no processo de ativação e proliferação celular durante o desenvolvimento de CRs: a enzima óxido nítrico sintase, considerada um regulador do processo inflamatório, e proteínas do choque térmico induzidas em vários tipos de estresse e que desempenham um papel fundamental na proteção celular contra os danos provocados pelos mesmos. Os resultados demonstraram que ambas se apresentavam significativamente mais expressas no revestimento epitelial do que nos restos epiteliais de Malassez. Os autores, então, propuseram que estas moléculas estariam envolvidas no processo inflamatório e que a óxido nítrico sintase atuaria provavelmente na proliferação das células epiteliais, enquanto que as proteínas do choque térmico as protegeriam da inflamação.

Dois possíveis concepções foram formuladas na tentativa de esclarecer a formação da cavidade cística durante o segundo estágio da patogênese dos CRs, denominado fase de formação cística (NAIR et al, 2008). Tais possibilidades são reconhecidas de modo que ambas podem operar independentemente entre si. A primeira delas é baseada no conceito de necrose central, no qual as células localizadas centralmente na massa epitelial proliferativa de um GP ficariam sem sua fonte de nutrição, sendo submetidas à morte e degeneração das células centrais (SHEAR; SPEIGHT, 2011). As células epiteliais localizadas periféricamente em torno destas microcavidades contendo células epiteliais degeneradas, leucócitos e exsudatos teciduais, coalescem para formar a cavidade revestida por epitélio (MUGLALI et al, 2008). A segunda concepção consiste na teoria do abscesso, baseada no pressuposto de que o epitélio prolifera e recobre a superfície exposta do tecido conjuntivo de um foco inflamatório agudo (abscesso) ou a cavidade poderá ser formada ainda devido à fragmentação do tecido conjuntivo por atividade enzimática proteolítica (SUMMERS, 1974).



O terceiro e último estágio é conhecido como fase de crescimento e expansão cística que ocorrem em virtude de diferenças na pressão osmótica. A descamação das células epiteliais para o lúmen cístico e consequente aumento do conteúdo de proteínas, proporciona o deslocamento de líquido proveniente do tecido conjuntivo através do revestimento epitelial para o interior do cisto, na tentativa de equilibrar a pressão osmótica. (REGEZZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008; NEVILLE et al, 2009). O estroma, então, reage produzindo quantidades variáveis de fibras colágenas e organizando-as para formar a cápsula cística fibrosa. Concomitante a estes mecanismos, observa-se reabsorção óssea local após liberação de colagenase e PGs por fatores estimuladores de fibroblastos capsulares e osteoclastos associados a células inflamatórias crônicas. Como resultado, observa-se o crescimento da cavidade cística que geralmente ocorre de forma lenta (WARD et al, 2004).

No que se refere às modalidades de terapêuticas indicadas para os casos de CRs, tratamentos endodônticos cirúrgicos e não-cirúrgicos são procedimentos essenciais na remoção dos microrganismos invasores, sendo os componentes estruturais das lesões periapicais dependentes do balanço entre fatores microbianos e a resposta do hospedeiro (HAMA et al, 2006). Tais tratamentos consistem basicamente na remoção tanto mecânica quanto química de substâncias irritantes presentes nos canais radiculares infectados, para que em seguida sejam obturados com a finalidade de eliminar ou reduzir os microrganismos invasores (TAKAHASHI et al, 1998).

Após a terapia endodôntica, a redução na liberação de mediadores inflamatórios, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, podem cessar a proliferação das células dos cordões epiteliais dos GPs, assim como do revestimento epitelial cístico. Além disso, a ativação da apoptose (ou morte celular programada) através da perda de fatores de sobrevivência ou pela recepção de sinais de morte durante a cicatrização periapical, também proporcionam a regressão na proliferação das células epiteliais (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007).

Apesar de seu diagnóstico definitivo ser realizado tradicionalmente apenas com o exame histopatológico, nos casos de lesões periapicais cujo tratamento planejado é o não-cirúrgico, esta análise seria impraticável. Desta forma, Aggarwal et al (2008) propuseram a utilização da tomografia computadorizada e ultrassom com citometria de Doppler para o diagnóstico diferencial entre GPs e CRs. Em pesquisa realizada por tais autores, todos os 12 casos avaliados apresentaram diagnósticos na tomografia computadorizada e ultrassom coincidentes com os emitidos após o exame histopatológico.

Existem controvérsias sobre o potencial de cura dos cistos inflamatórios apicais após a terapia endodôntica não-cirúrgica (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007). A permanência de lesões periapicais após realização do tratamento endodôntico, ocorre geralmente quando a infecção não é completamente eliminada (NAIR et al, 1990). Insucessos no tratamento endodôntico também podem ser decorrentes da complexidade anatômica do sistema de canais radiculares com canais acessórios, ramificações e anastomoses que, muitas vezes, são incapazes de serem acessados e, conseqüentemente, limpos e preenchidos pelas técnicas convencionais (PERRINI et al, 1998).

### **2.1.3 Cisto Radicular Residual**

Por definição, o CRR corresponde a uma lesão que se inicia com um dente não-vital que permanece sem tratamento tempo suficiente para desenvolver uma patologia periapical crônica, como um CR. Entretanto, o elemento dentário acometido pode eventualmente ser extraído com pouca relevância para a lesão periapical que permanecerá no tecido ósseo como um CRR. Tal lesão poderá, ao longo dos anos, regredir, se estabilizar ou aumentar de tamanho (DIMITROULIS; CURTIN, 1998) e seu diagnóstico é estabelecido mediante a união das características radiográficas e histopatológicas (BOFFANO; GALLESIO, 2010).

Dentre as lesões periapicais crônicas, os CRRs são as mais incomuns, com prevalência variando de 0% a 11,2% e discreta predileção pelo gênero masculino (LEDESMA-MONTES et al, 2000; MOSQUEDA-TAYLOR et al, 2002; JONES et al, 2006; GROSSMANN et al, 2007; OCHSENIUS et al, 2007; PROCKT et al, 2008). De acordo com a literatura pesquisada, a localização anatômica mais frequente é a região anterior de maxila seguida pela posterior de mandíbula (JONES et al, 2006; OCHSENIUS et al, 2007).

Bodner et al (2011) realizaram um estudo retrospectivo de 27 lesões císticas localizadas em áreas edêntulas dos ossos maxilares. A média de idade encontrada foi de 60 anos, variando de 46 a 74 anos, a proporção de indivíduos do sexo masculino:feminino foi de 4,4:1 e a maxila foi a região mais comumente afetada. Quanto ao tipo histológico, 20 casos foram diagnosticados como CRRs, 3 como cistos dentígeros, 3 como ceratocistos odontogênicos (tumor odontogênico ceratocístico) e 1 caso foi classificado como cisto do ducto nasopalatino. Os pacientes foram tratados por marsupialização, enucleação ou enucleação com enxerto ósseo.

Assim como os GPs e CRs, os CRRs são geralmente lesões de comportamento inócuo, sendo muitas vezes descobertos em radiografias de rotina (DIMITROULIS; CURTIN, 1998). No entanto, podem atingir grandes proporções, causando expansão óssea e até fraturas patológicas. Ao exame radiográfico, aparecem como uma radiolucidez unilocular bem definida e localizada em região sem qualquer associação com elementos dentários (BOFFANO; GALLESIO, 2010).

Muglali et al (2008) avaliaram os níveis de IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e quimiocinas nos fluidos de CRs e CRRs através do teste ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Os resultados demonstraram que ambas as lesões continham as citocinas e quimiocinas pesquisadas, sendo tais concentrações significativamente maiores nos CRs quando comparadas com as presentes nos CRRs e os níveis de IL-1 $\alpha$  foram os maiores em ambos os fluidos. Considerando que estas moléculas estão envolvidas no processo de expansão cística, os autores deduziram duas implicações baseadas nos resultados encontrados: se um CR permanecer inadvertidamente após a extração do dente, certo grau de inflamação poderá contribuir com a expansão cística; e, embora possuam a mesma origem, os CRs apresentam maior potencial de ampliarem de tamanho do que os CRRs.

Quanto ao seu aspecto histopatológico, os CRRs apresentam características semelhantes às observadas em CRs comuns. No entanto, como o agente causador foi removido, tais lesões podem se tornar progressivamente menos inflamadas, de modo que sua cápsula pode ser composta por tecido colagenoso fibroso não inflamado. Assim, o revestimento epitelial pode ser delgado e regular, mimetizando o encontrado em cistos de desenvolvimento como o cisto dentífero ou o cisto periodontal lateral (SHEAR; SPEIGHT, 2011).

O baixo potencial de proliferação dos CRRs foi demonstrado em alguns estudos. Suzuki et al (2001) observaram uma menor imunorreatividade para estas lesões à marcadores de proliferação celular, bem como uma quantidade de células de Langerhans significativamente menor e discreta intensidade do infiltrado inflamatório quando comparados aos resultados observados para os CRs. Segundo tais autores, além de suas implicações nas reações imunes locais, as células de Langerhans podem estar também associadas com a proliferação e/ou maturação epitelial. Corroborando estes achados, Suzuki et al (2002) relataram uma menor imunexpressão da enzima óxido nítrico sintase e de proteínas do choque térmico nos casos de CRRs, estando ambas relacionadas com a proliferação das células epiteliais do revestimento cístico.

Alguns casos de transformação maligna de CRRs foram relatados na literatura, de modo que carcinomas de células escamosas foram originados no epitélio de revestimento cístico. Embora rara, é considerada uma entidade reconhecida cujo diagnóstico pode ser estabelecido apenas mediante análise histopatológica (SWINSON; JERJES; THOMAS, 2005; MUGLALI; SUMER, 2008). A literatura estima que a incidência de alterações malignas em cistos odontogênicos esteja entre 0,13% e 2%, sendo duas vezes mais comum no sexo masculino e quatro vezes mais prevalente na mandíbula do que na maxila. O prognóstico geralmente é pobre apresentando tendência a agressão local e invasão perineural (SWINSON; JERJES; THOMAS, 2005).

O tratamento mais indicado para os CRRs é a enucleação cirúrgica da lesão (DIMITROULIS; CURTIN, 1998). Contudo, caso não seja tratado corretamente, o crescimento contínuo do CRR pode provocar significativa reabsorção óssea e enfraquecimento da mandíbula e maxila. No entanto, a completa reparação do osso é comumente observada quando a lesão é tratada adequadamente (REGEZZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008).

## 2.2 PATOGENIA DAS LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS

A câmara pulpar e os condutos radiculares contendo a polpa necrótica decorrente da infecção microbiana, representam espaços “mortos” que consistem em um ambiente propício para a proliferação bacteriana e degradação dos componentes protéicos dos fluidos corporais, já que não há circulação vascular. Inúmeros mediadores inflamatórios são, então, estimulados por uma variedade de células com a finalidade de impedir a invasão de patógenos nos canais radiculares infectados durante um período de tempo relativamente longo. No entanto, as respostas do hospedeiro podem ser, paradoxalmente, responsáveis por grande parte do dano tecidual (TAKAHASHI et al, 1998).

Destarte, uma grande variedade de reações imunológicas podem ser desencadeadas com a invasão dos microrganismos e seus produtos (JIANG et al, 1998). Com a persistência do estímulo antigênico, a resposta imune do hospedeiro que inicialmente apresentava um caráter protetor, é conduzida à processos destrutivos responsáveis pela lise dos tecidos, provocando tanto reações inflamatórias inespecíficas quanto antígeno-específicas. Deste modo, a liberação de enzimas histolíticas, toxinas e outros produtos do metabolismo bacteriano consistem nos primeiros elementos de agressão direta ao periodonto, produzindo posteriormente uma reação inflamatória com sua difusão através do forame apical.

Mecanismos de agressão indireta pela ativação residual de enzimas proteolíticas ou respostas imunopatológicas podem também ser desencadeados (ROCHA et al, 2007).

Uma vez iniciada a invasão bacteriana, observa-se a tentativa de combate dos microrganismos por macrófagos teciduais residentes e pelo sistema complemento ativado pela via alternativa. Os macrófagos teciduais possuem receptores que reconhecem os componentes da superfície bacteriana, como receptores de manose, de glicana e de CD14 que se ligam ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Após serem ativados, os macrófagos tem sua capacidade fagocítica aumentada, assim como sua habilidade de apresentar antígenos aos linfócitos e exercer uma pronunciada atividade biossintética liberando uma grande variedade de mediadores, incluindo citocinas como a IL-1, IL-6, IL-8 e o TNF- $\alpha$ , além de mediadores lipídicos como PGs e leucotrienos, enzimas lisossomais, radicais oxigenados e nitrogenados (HÖFLING; GONÇALVES; SALMON, 2006).

O sistema complemento consiste em um sistema composto por proteínas plasmáticas com importante efeito citolítico e opsonizador, o qual é ativado nas periapicopatias por componentes da superfície bacteriana, como o LPS, peptidoglicano e ácido lipoteicóico. Produtos gerados com sua ativação, como os fragmentos C3a e C5a, atuam como anafilotoxinas, promovendo a liberação de histamina por mastócitos e outros mediadores inflamatórios, além de representarem fatores quimiotáticos para neutrófilos e macrófagos (TORABINEJAD, 1994; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004; JANEWAY et al, 2007).

Respostas imunes mediadas reguladas por mediadores endógenos como prostanóides, cininas e neuropeptídeos são, então, desencadeadas incluindo, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de leucócitos (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). Dentre estes, ocorre o recrutamento principalmente de neutrófilos para o local da agressão, onde tais elementos celulares realizam a fagocitose e lise bacteriana com a finalidade de debelar a infecção (TORABINEJAD, 1994).

Com a permanência dos antígenos no local da infecção e a persistência da agressão, estabelece-se um processo inflamatório crônico. Tal processo é caracterizado por reações imunológicas antígeno-específicas representadas por uma resposta celular modulada basicamente por linfócitos T, macrófagos e células natural killer (NK) que interagem entre si e com outras citocinas secretadas, bem como por uma resposta humoral mediada por linfócitos B, plasmócitos e anticorpos (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004; JANEWAY et al, 2007).

Dentre estes tipos celulares que migram para o local da agressão, a maioria dos estudos envolvendo lesões periapicais indica uma maior concentração de linfócitos T no infiltrado inflamatório das mesmas (RODINI; LARA, 2001). Akamine et al (1994) propuseram que este fato pode ser decorrente do envolvimento destas células tanto na iniciação como no desenvolvimento das periapicopatias, enquanto que a resposta imune humoral parece estar relacionada principalmente com o processo de cicatrização.

Duas populações funcionalmente distintas de linfócitos T foram melhor caracterizadas e incluem as células T auxiliares (*helper*) CD4<sup>+</sup> e os linfócitos T citolíticos ou citotóxicos CD8<sup>+</sup>. As primeiras, em resposta a presença antigênica, secretam citocinas que possuem como funções principais a estimulação da proliferação e diferenciação de linfócitos T, além da ativação de outros tipos celulares como células B, macrófagos e outros leucócitos. Em contraste, os linfócitos citotóxicos eliminam células produtoras de antígenos estranhos, como as células infectadas por vírus e outros microrganismos intracelulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Em lesões periapicais, Rodini e Lara (2001) observaram uma maior quantidade de linfócitos CD8<sup>+</sup> em CRs do que em GPs, sugerindo que estas células exercem provavelmente funções reguladoras ou citotóxicas na resposta imune celular, as quais pode levar à estabilização destas periapicopatias.

Células T CD4<sup>+</sup> *naives* podem ser diferenciadas em uma grande variedade de linhagens de células T efetoras, incluindo células T *helper* (Th) 1, Th2, T *helper* foliculares, Th9, Th17, assim como células Tregs e seus subconjuntos, compreendendo células Tregs naturais FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (nTreg), células Tregs induzidas FoxP3<sup>+</sup> ou FoxP3<sup>-</sup> (iTreg) e células Th3 (CHEN et al, 2011). Células nTreg se desenvolvem e adquirem o fenótipo supressor no timo, enquanto que as iTreg são induzidas periféricamente fora deste órgão mediante apresentação de antígenos (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009). Ambas, nTreg e iTreg, possuem a capacidade de suprimir a função de células T efetoras (Teff), mantendo a homeostase imunológica do hospedeiro (CHEN et al, 2011).

Assim como em outras doenças inflamatórias, dois padrões principais de respostas imunológicas podem ser desenvolvidos em lesões periapicais (FUKADA et al, 2009). Respostas imunes Th1 mediadas pelo interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , estão envolvidas com a progressão da lesão e destruição óssea (COLIĆ et al, 2009b). Mecanismos de imunossupressão, por sua vez, são modulados pelo TGF- $\beta$  e citocinas Th2 (IL-4, IL-5, e IL-10) que estimulam a imunidade humoral e restringem os mecanismos inflamatórios/imunes (AKAMINE et al, 1994; KAWASHIMA; STASHENKO, 1999).

O balanço das respostas Th1/Th2 também pode ser regulado por fatores de transcrição (SZABO et al, 2000). Respostas imunes Th1 parecem ser induzidas pelo T-bet, expresso em células T, células NK, células B, monócitos/macrófagos e células dendríticas (SZABO et al, 2000; LIGHVANI et al, 2001). Em contraste, o GATA-3 consiste em um fator de transcrição altamente expresso nas células T e que promove a diferenciação Th2 e inibe a Th1 (LEIDEN, 1993; MERIKA; ORKIN, 1993; ZHENG; FLAVELL, 1997).

Fukada et al (2009) realizaram uma pesquisa objetivando avaliar a expressão gênica de fatores de transcrição e citocinas relacionadas com as respostas Th1 (T-bet e IFN- $\gamma$ ), Th2 (GATA-3, IL-10 e IL-4) e Treg (FoxP3 e TGF- $\beta$ ), bem como de fatores envolvidos na quimiotaxia e ativação de osteoclastos em GPs e CRs através de reação em cadeia da polimerase. Os resultados demonstraram que os CRs exibiram uma maior expressão de GATA-3, enquanto que os GPs expressaram mais T-bet, FoxP3 e IL-10. A expressão de IFN- $\gamma$ , IL-4 e TGF- $\beta$  foi semelhante em ambas as lesões. Quanto à atividade osteoclástica, os resultados demonstraram maior predominância nos GPs, a qual se correlacionou com a resposta Th1. No entanto, a concomitante expressão dos marcadores de células Tregs sugerem uma possível supressão da resposta Th1, enquanto que nos CRs evidenciou-se uma maior resposta Th2. Os autores concluíram que as células Tregs parecem modular criticamente o balanço imunorregulatório e atividade osteoclástica nas lesões periapicais.

Deste modo, além das respostas Th1 e Th2 já estabelecidas, estudos indicam também a participação de outros tipos celulares na patogênese das lesões periapicais, de modo que a presença de células Tregs, bem como das células Th17 mais recentemente descritas, tem sido investigada em tais lesões (COLIĆ et al, 2009a; COLIĆ et al, 2009b; FUKADA et al, 2009; XIONG; WEI; PENG, 2009).

### **2.2.1 Células Th17**

As células Th17 correspondem a uma subpopulação de células T CD4<sup>+</sup> que possuem como principal produto de secreção a IL-17 e por isso receberam esta denominação. A IL-17 consiste em uma citocina pró-inflamatória que exerce potentes efeitos em diversos tipos celulares da imunidade inata, particularmente em granulócitos, sendo considerada uma ponte molecular entre os sistemas imunes inato e adquirido (GAFFEN et al, 2006; YU; GAFFEN, 2008). Além disso, pesquisas realizadas apontaram um membro da super família de receptores de hormônios nucleares, o receptor órfão relacionado à retinoide  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t), como o principal

fator de transcrição envolvido na diferenciação da linhagem de células Th17 (IVANOV et al, 2006).

Estudos com sequenciamento em larga escala dos genomas humano e de outros vertebrados, revelaram a presença de genes que codificam proteínas adicionais claramente relacionadas com a IL-17. Assim, uma nova família de citocinas conhecida, de um modo geral, como IL-17, foi definida, sendo composta por pelo menos seis membros no genoma humano (IL-17A a IL-17F). Os experimentos com a família IL-17 e seus receptores cognatos, demonstraram que estas moléculas não apresentam similaridade de sequência com nenhuma outra família de proteínas anteriormente descritas. Desta forma, representam um sistema de sinalização distinto que parece ter sido altamente conservado na evolução dos vertebrados (AGGARWAL; GURNEY, 2002).

A IL-17 é secretada como uma glicoproteína homodimérica dissulfeto-ligada composta por 155 aminoácidos (aa) e que possui peso molecular dímero de 30-35 kDa (FOSSIEZ et al, 1996). Esta citocina é sintetizada por células T ativadas e de memória e atua estimulando células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e macrófagos a produzirem outras citocinas como TNF, IL-1, IL-6, IL-8, fator estimulador de colônias de granulócitos, PGE2 e quimiocinas, as quais promovem o recrutamento de neutrófilos (FOSSIEZ et al, 1996; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Desta forma, a IL-17 medeia seus efeitos pró-inflamatórios através do seu receptor (IL-17R) que está ubiquitosamente expresso em diversos tipos celulares (AGGARWAL; GURNEY, 2002).

Células Th17 foram inicialmente identificadas como potentes contribuintes de distúrbios autoimunes e de várias reações inflamatórias, incluindo artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, psoríase e respostas imunológicas de rejeição a enxertos (DONG, 2006; BETTELLI et al, 2008). Estas células participam de doenças autoimunes através da secreção de citocinas inflamatórias que incluem a IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (CHEN et al, 2011).

Potentes ações inflamatórias têm sido associadas para vários membros da família IL-17, sugerindo que estas proteínas podem ter papéis importantes em processos inflamatórios (AGGARWAL; GURNEY, 2002). A IL-17 pode induzir a resposta inflamatória, fornecer suporte a resposta imune Th1 e estimular a reabsorção óssea osteoclástica em combinação com o receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) e seu ligante (RANKL). Desta forma, sua participação na etiopatogênese da doença periodontal foi apontada, a qual poderia estar relacionada com a modulação da resposta imune Th1 e desenvolvimento de reações inflamatórias via mediadores gengivais fibroblastos-derivados (TAKAHASHI et al, 2005).



Destarte, o possível envolvimento desta citocina na patogenia de lesões periapicais, particularmente na resposta inflamatória e nos processos de reabsorção do osso alveolar tem sido também sugerido (XIONG; WEI; PENG, 2009).

Sua função em lesões periapicais foi investigada por Colić et al (2007), cujos resultados demonstraram que os níveis de IL-17, bem como a proporção de neutrófilos foram significativamente maiores nas lesões sintomáticas. A produção de IL-17 foi maior em sobrenadantes de culturas de células mononucleares isoladas de lesões periapicais com predominância de células T e observou-se correlação entre a concentração de IL-17 e a proporção de células CD3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>. Verificou-se ainda correlação positiva entre os níveis de IL-17 e IL-8 entre as lesões sintomáticas, sendo a produção desta última citocina aumentada tanto nas células mononucleares de lesões periapicais como no sangue periférico tratados com IL-17. Desta forma, tais resultados indicam que a IL-17, através da estimulação da produção da IL-8, pode desempenhar um papel fundamental na exacerbação da inflamação nas lesões periapicais crônicas.

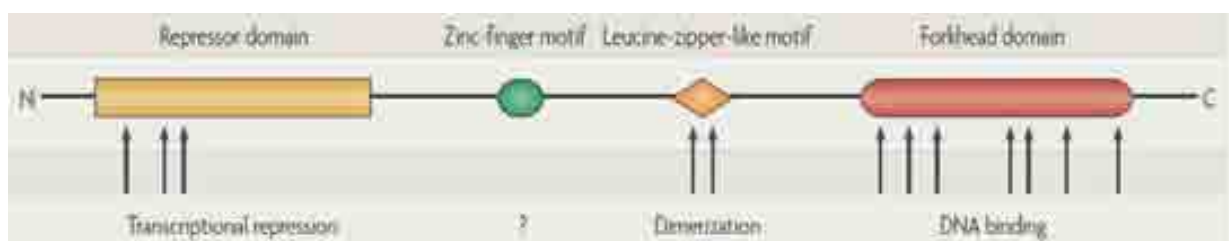
Em estudo realizado por Oseko et al (2009), com objetivo de investigar o papel da IL-17A em lesões periapicais em ratos, observou-se que os animais tipo selvagens IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup>, desenvolveram lesões periapicais após infecção com *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*, enquanto que em ratos IL-17A<sup>-/-</sup>, o mesmo não aconteceu. Os autores sugeriram, então, que esta citocina e não o IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$ , desempenha uma função importante na formação de lesões periapicais.

Xiong, Wei e Peng (2009) investigaram a localização imuno-histoquímica da IL-17 durante o desenvolvimento de lesões periapicais induzidas em ratos. Do dia inicial ao último (dia 28), o número de células imunopositivas para a IL-17 e neutrófilos se elevou gradativamente, atingindo seu pico máximo no dia 28. Em contraste, a quantidade de osteoclastos subiu substancialmente até o dia 14, para, em seguida, diminuir gradualmente até o dia 28. Diante deste resultados, os autores concluíram que a IL-17 pode estar envolvida tanto nas respostas inflamatórias quanto no processo de reabsorção óssea dos tecidos periapicais, assim como estar associada com a patogênese das periapicopatias

### 2.2.2 Células Tregs

As células Tregs constituem 5-10% do total de células T CD4<sup>+</sup> (HOLM et al, 2004), consistindo em uma pequena população de linfócitos T que co-expressam a subunidade- $\alpha$  do receptor da IL-2 (CD25) e que são de fundamental importância para o controle da auto-reatividade de células T *in vivo* e da regulação da resposta imune à infecção (SAKAGUCHI et al, 1995; ASANO et al, 1996; MCGUIRK; MILLS, 2002). A expressão do fator de transcrição FoxP3 é considerada necessária e suficiente para seu fenótipo de regulação, sendo o mesmo concebido como o regulador mestre desta linhagem de células T (FONTENOT; RUDENSKY, 2005; RONCADOR et al, 2005). O FoxP3 é um membro da subfamília P de fatores de transcrição *forkhead Box* o qual apresenta um domínio de ligação ao DNA *forkhead/winged-helix* altamente conservado e que por isso recebeu esta denominação (CARLSSON; MAHLAPUU, 2002). Seu gene codificante foi mapeado no cromossomo Xp11.23 (BENNETT et al, 2001).

Estruturalmente, o FoxP3 possui quatro subdomínios, incluindo um domínio repressor na região N-terminal (aminoácidos 1–193) rico em resíduos de prolina e fundamental para interações co-repressoras que suprimem a ativação da transcrição pelo fator nuclear de células T ativadas (NFAT); um domínio *zinc finger* (200–223 aa) com função desconhecida; um domínio zíper de leucina (240–261 aa) importante para homo/hetero-oligomerização; e um domínio *forkhead* C-terminal (338–421 aa) essencial para ligação com o DNA e localização nuclear subcelular (Figura 1) (CAMPBELL; ZIEGLER, 2007; CHEN et al, 2011). Estudos demonstraram que a transcrição de mais de 700 genes é controlada direta ou indiretamente pelo FoxP3 em ratos. Contudo, a maioria dos mecanismos fundamentais sobre como o FoxP3 medeia a transcrição de sítios específicos de promotores permanece desconhecida (MARSON et al, 2007; ZHENG et al, 2007; SAKAGUCHI et al, 2008).



**Figura 1.** Representação esquemática dos domínios estruturais do FoxP3 (CAMPBELL; ZIEGLER, 2007).

Zheng et al (2010) propuseram que elementos de sequência de DNA não-codificadas conservadas (CNS) localizados no locus do FoxP3 codificam a informação que define o

tamanho, composição e estabilidade da população de células Tregs, de modo que foram descritos três elementos CNS para o FoxP3. O CNS1 (acentuador 1) contém o elemento responsivo ao TGF- $\beta$ -NFAT e é considerado redundante para diferenciação celular nTreg, embora possua uma função de destaque na geração de células iTreg em tecidos linfóides associados ao intestino. O CNS2 (acentuador 2), apesar de ser considerado dispensável para a indução do FoxP3, é necessário para expressão do FoxP3 na progênie de células Tregs em divisão. Deste modo, o recrutamento do FoxP3 para este elemento facilita a manutenção hereditária do estado ativo do locus do FoxP3 e, portanto, a estabilidade da linhagem Treg. Por fim, o CNS3 (acentuador 3), desempenha papel importante na geração de células Tregs no timo e na periferia e possui sítios de ligação c-Rel.

Mutações no gene do FoxP3 foram identificadas como causadoras de uma síndrome fatal conhecida como síndrome da desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia ligada ao X (IPEX) que afeta humanos e ratos mutados. Semelhantemente, esses dois grupos desenvolvem hiperproliferação linfocitária e várias doenças autoimunes órgão-específicas que, conseqüentemente, levam à morte dos animais afetados ainda no primeiro mês de vida (BRUNKOW et al, 2001). Além disso, deleções do FoxP3 em células maduras promovem a perda de sua função supressora *in vivo*. Destarte, a expressão do FoxP3 estável consiste em um pré-requisito essencial para manutenção do programa transcricional e funcional estabelecidos durante o desenvolvimento das células Tregs (WILLIAMS; RUDENSKY, 2007).

Outras moléculas de superfície não específicas, mas que também estão expressas em células Tregs e podem auxiliar em sua identificação são o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), receptor TNF induzido por glicocorticóide (GITR), receptor TNF (TNFR)-2 e antígeno de leucócitos humanos (HLA)-DR. Dentre estas moléculas, o CTLA-4 é expresso constitutivamente em linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e acredita-se que seu bloqueio pode afetar a função da célula Treg (READ et al, 2006; GUPTA; SHANG; SUN, 2008).

Em células T CD4<sup>+</sup> convencionais, a ligação do receptor de células T (TCR) com o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II da célula apresentadora de antígeno (APC), bem como a interação da molécula coestimulatória CD28 da célula T com a B7 da APC, promovem a ativação de vias de sinalização que resultam na translocação para o núcleo do NFAT, do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e da proteína ativadora (AP)-1, com subsequente transcrição do gene da IL-2 (CAMPBELL; ZIEGLER, 2007). A IL-2 estimula a proliferação e diferenciação dos linfócitos T e B e das células NK, assim é considerada

necessária para a sobrevivência e função das células Tregs (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Em contraste, as células Tregs respondem de maneira diferente à estimulação do TCR (CAMPBELL; ZIEGLER, 2007). Após a ligação do antígeno com o TCR e consequente ativação da célula T, o FoxP3 forma um complexo com o NFAT/AP-1 e induz certos fatores inflamatórios expressos em células T convencionais pela ligação com as regiões promotoras dos genes alvo do FoxP3, contribuindo assim para a ativação de células T e sua diferenciação em células Teff. Uma vez que tenha interagido com o NFAT, o FoxP3 pode reprimir a expressão da IL-2 e conferir atividade supressora às células T normais (CHEN et al, 2011). Além da não produção da IL-2, ocorre também inibição da síntese de outras citocinas como a IL-4 e IFN- $\alpha$ , bem como de outras moléculas incluindo o TNF e sua família de receptores (JONULEIT et al, 2001; BAECHER-ALLAN; VIGLIETTA; HAFLER, 2004; ALLAN et al, 2005).

Os mecanismos de ação através dos quais as células Tregs desempenham sua função supressora ainda não foram totalmente elucidados. Entretanto, pelo menos três mecanismos supressores foram apontados: o contato direto célula-célula, a secreção local de citocinas inibitórias e a competição local por fatores de crescimento. No primeiro deles, as células Tregs podem suprimir as células-alvo através da interação direta dos pares receptores-ligantes das células-alvo e Tregs; mediante o fornecimento de fatores supressivos via junções comunicantes, incluindo o cAMP; citólise direta; citocinas supressoras ligadas à membrana, como o TGF- $\beta$ ; e/ou indiretamente, através da modulação da APC a partir do contato célula-célula, possivelmente através de sinalização inversa via CTLA-4 na célula Treg e B7 nas células dendríticas. As células Tregs podem ainda secretar fatores supressivos solúveis, como a IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 ou induzir as APCs a secretarem tais fatores que exercem ações inibitórias sobre células Teff ou APCs. Por fim, células Tregs podem competir por algumas citocinas que sinalizam via receptores que contêm uma cadeia  $\gamma$  comum (IL-2, IL-4 e IL-7) ou competir pela co-estimulação da APC através da expressão constitutiva de CTLA-4 (SCHEFFOLD; MURPHY; HÖFER, 2007; SOJKA; HUANG; FOWELL, 2008).

Células Tregs FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> possuem a capacidade de suprimir a proliferação e função de diversos tipos celulares como células Teff, linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e osteoblastos (CHEN et al, 2011). Assim, diversos estudos demonstraram a participação e importância de tais elementos celulares na prevenção do desenvolvimento de doenças autoimunes (BAECHER-ALLAN; HAFLER, 2006; SAKAGUCHI et al, 2006), na indução de tolerância em transplantes (XIA et al, 2009) e na imunidade tumoral, já que sua

maior frequência está fortemente relacionada com a progressão do tumor (KOSMACZEWSKA et al, 2008). Além disso, células Tregs foram identificadas também em infecções humanas sistêmicas e em tecidos acometidos por doença periodontal (NAKAJIMA et al, 2005). Alguns estudos investigaram também a participação deste tipo celular na patogênese das lesões periapicais (ALSHWAIMI et al, 2009; COLIĆ et al, 2009b; FUKADA et al, 2009).

Colić et al (2009b) realizaram um estudo buscando caracterizar as células Tregs presentes em lesões periapicais através de microscopia confocal, citometria de fluxo, ensaios funcionais e culturas de células. Os resultados demonstraram que as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> expressaram IL-10 e TGF- $\beta$  e sua frequência foi significativamente maior do que no sangue periférico, bem como correlacionada com os níveis destas citocinas em sobrenadantes de células mononucleares. A inibição da proliferação de células T *in vitro* ocorreu, em parte pela produção da IL-10. Diante destes achados, os autores sugeriram que as células Tregs podem desempenhar funções reguladoras no controle dos processos locais imune-inflamatórios nas lesões periapicais.

Em estudo desenvolvido por Alshwaimi et al (2009) com camundongos transgênicos, os autores avaliaram se as células Tregs são induzidas em lesões periapicais por infecção da polpa dentária. Para tanto, foi utilizada a hibridização *in situ* para localizar as células T FoxP3<sup>+</sup> no dia 21 do experimento após a exposição de dentes primeiros molares às bactérias do ambiente oral. Foi verificado que tais elementos celulares estiveram presentes principalmente na periferia das lesões analisadas. Além disso, através de citometria de fluxo, observou-se um aumento progressivo no número de células Tregs FOXP3<sup>+</sup> entre os dias 7 e 14 (0,69% do infiltrado inflamatório) e no dia 21 após a infecção (0,94% do infiltrado). Desta forma, os autores concluíram que as células Tregs são induzidas a se infiltrarem em lesões periapicais pela infecção pulpar e aumentam de número com o decorrer do tempo.

### **2.2.3 Diferenciação Th17/Treg**

A diferenciação de células T *naives* nas linhagens Th17 ou Treg ocorre mediante os níveis de expressão de algumas citocinas, sendo o TGF- $\beta$  considerado a principal delas (CHEN et al, 2011). O TGF- $\beta$  corresponde a uma citocina pleiotrópica com múltiplas funções regulatórias no sistema imune (LETTERIO; ROBERTS, 1998). Inicialmente, o TGF- $\beta$  atua como quimioatraente de monócitos e linfócitos para em seguida, exercer potentes

efeitos supressores na diferenciação de linfócitos T e B (WAHL, 1994). Além disso, inibe a produção de IL-1, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , possuindo atividades antagônicas a estas citocinas (DANIN et al, 2003). O TGF- $\beta$  é produzido por células Tregs e células T estimuladas por antígenos, fagócitos mononucleares ativadas por LPS e outros tipos celulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

A superfamília TGF- $\beta$  compreende o conjunto de proteínas TGF- $\beta$ s, proteínas morfogenéticas ósseas, ativinas e proteínas relacionadas. Estas proteínas desempenham importantes funções na regulação da função das células e conseqüentemente no desenvolvimento corporal, através de seus efeitos sobre a diferenciação, proliferação e migração celulares (DERYNK; ZHANG, 2003). Em mamíferos, dentre as proteínas TGF- $\beta$ , foram reconhecidas três isoformas codificadas por genes distintos, sendo geralmente designadas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3, de modo que as células pertencentes ao sistema imunológico sintetizam principalmente a primeira isoforma (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Inicialmente, o TGF- $\beta$  é secretado em uma forma inativa como uma molécula precursora pré-pró-TGF- $\beta$ , sendo essa pró-proteína dimérica chamada de peptídeo associado à latência (LAP). O complexo LAP/TGF- $\beta$  formado, então, se liga à uma proteína de 125 a 160 kDa conhecida como proteína de ligação ao TGF- $\beta$  latente e este complexo é secretado pelas células, estando vinculado ao colágeno e outras proteínas da matriz tecidual (YOSHIMURA; WAKABAYASHI; MORI, 2010).

No que se refere às vias de sinalização mediadas pelo TGF- $\beta$ , proteínas Smad correspondem a efetores intracelulares destas vias, as quais podem ser Smad-dependentes ou Smad-independentes (DERYNK; ZHANG, 2003). Estudos sugerem que o TGF- $\beta$  pode induzir a expressão do FoxP3 através de uma via Smad-dependente (HAIQI; YONG; YI, 2011). Embora seja considerada uma via inerentemente simples, as interações combinatórias no receptor heteromérico e complexos Smad, além da cooperação com sequências específicas de fatores de transcrição, permitem versatilidade e diversificação às respostas da família TGF- $\beta$  (DERYNK; ZHANG, 2003).

Na via Smad-dependente, o TGF- $\beta$  se liga ao seu receptor (TGF- $\beta$ R), o qual ativa principalmente fatores de transcrição Smad, incluindo três proteínas estruturalmente semelhantes: dois receptores associados Smads (Smad2 e Smad3), e um Smad comum (Smad4). O TGF- $\beta$ R, então, fosforila diretamente e ativa o Smad2 ou Smad3 e se heterodimeriza com Smad4 (DERYNK; ZHANG, 2003; YANG et al, 2008). O complexo ativado Smad se desloca para o núcleo e, conjuntamente com outros co-fatores nucleares, regulam a transcrição de genes-alvo (TAKIMOTO et al, 2010).

A IL-17 e o TGF- $\beta$  embora não exerçam inibição mútua possuem efeitos moduladores opostos no processo inflamatório (MANEL et al, 2008). O TGF- $\beta$  é considerado um potente modulador da resposta imune, enquanto que a IL-17 induz a inflamação, já que possui a capacidade de reativar o processo inflamatório. Desta forma, o equilíbrio na expressão de fatores de transcrição como o FoxP3 e o perfil da resposta imune (Th17 ou Treg) será determinado a partir dos níveis de TGF- $\beta$  e da presença ou ausência de citocinas pró-inflamatórias (ZHU; PAUL, 2008). Estudos demonstraram que níveis altos de TGF- $\beta$  estimulam a cooperativa ativação do Smad3 e do NFAT, promovendo a expressão do FoxP3 e consequente diferenciação Treg (TONE et al, 2008).

Corroborando esta concepção, outras pesquisas demonstraram que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> que se apresentavam deficientes desta sinalização pelo TGF- $\beta$ , não poderiam ser convertidas em células Tregs FoxP3<sup>+</sup> tanto *in vitro* como *in vivo* (LIU et al, 2008). Desta forma, pesquisas indicam que o TGF- $\beta$  é necessário para orquestrar a imunidade mediada por células T, embora não esteja completamente elucidado se efeitos variados mediados por esta citocina nas células T são também dependentes da sinalização Smad (TAKIMOTO et al, 2010). Contudo, apesar da participação do TGF- $\beta$  como indutor de células Tregs ter sido comprovada em modelos murinos, em humanos a conversão de células T FoxP3<sup>+</sup> com fenótipo e função de células Tregs parece ser mais complexa, sendo sua expressão considerada insuficiente para conferir o fenótipo deste tipo celular (HAIQI et al, 2011).

Em contraste ao observado para diferenciação da linhagem de células Tregs, baixas concentrações do TGF- $\beta$  juntamente com a presença da IL-6 e de outras citocinas, desencadeiam a ativação coordenada do Smad3 e do transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) 3, que por sua vez, induzem o ROR $\gamma$ t necessário para desenvolvimento da linhagem Th17 (VELDHOEN et al, 2006).

Além da presença do TGF- $\beta$  e de citocinas como a IL-6 no microambiente tecidual, a diferenciação e manutenção de células Th17 requer ainda a participação da IL-23 (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). A IL-23 consiste em uma citocina heterodimérica constituída por uma subunidade p40, a qual divide com a IL-12, e por uma subunidade p19 IL-23-específica. A IL-23 é produzida por células dendríticas ativadas e atua em células T de memória, promovendo a elevação da secreção da IL-17 (AGGARWAL et al, 2003).

Assim, na presença de IL-6 e do TGF- $\beta$ , a célula T CD4<sup>+</sup> *naive* se diferencia em Th17, já que na ausência de IL-4 e IL-12 (citocinas relacionadas com as respostas Th2 e Th1, respectivamente), expressam o receptor para a IL-23, ao invés do receptor para a IL-12 relacionado com a diferenciação Th1. Desta forma, o comprometimento com a linhagem

Th17 está sob controle do ROR $\gamma$ t, o qual é induzido nessas condições e coordena a expressão do receptor da IL-23 (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Em estudo realizado por Zhou et al (2007), verificou-se que camundongos deficientes em IL-6 exibiram expressão deficiente tanto do ROR $\gamma$ t e da IL-17, quanto da subunidade específica da IL-23 do receptor heterodimérico da IL-23. Entretanto, quando os camundongos apresentavam-se deficientes em ROR $\gamma$ t, observou-se uma indução normal de IL-21 em resposta a IL-6, indicando que o ROR $\gamma$ t não possui uma função obrigatória na regulação da expressão desta citocina. Isto permite que ambas IL-21, que funciona em um feedback positivo autócrino, e células dendríticas derivadas da IL-23, atuem em sinergismo com o TGF- $\beta$  para induzir a expressão da IL-17, já que tanto a IL-21 quanto a IL-23 induzem a expressão do ROR $\gamma$ t. Os autores concluíram que a IL-6 orquestra uma série de vias de sinalização citocina-dependentes que em conjunto com o TGF- $\beta$ , induz a diferenciação Th17 dependente do ROR $\gamma$ t.

Quanto às lesões periapicais, Danin et al (2000) analisaram a presença das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  em 25 GPs e CRs utilizando o teste ELISA. Os resultados demonstram que o TGF- $\beta$  foi observado em 21 casos de GPs e CRs, mas não em lesões com tecido cicatricial, enquanto que o TNF- $\alpha$  foi detectado em apenas 2 amostras. Além disso, o tamanho da lesão periapical foi correlacionada significativamente com os níveis de TGF- $\beta$  por miligrama de tecido, mas não com os de TNF. Desta forma, os autores afirmaram ser incerto se isto ocorre devido ao aumento no número de células produtoras de TGF- $\beta$  ou à maior estimulação das células com o tamanho da lesão.

Marçal et al (2010) analisaram a natureza do infiltrado inflamatório, presença de mastócitos e a expressão in situ de IL-17, TGF- $\beta$ , FoxP3 e quimiocinas em GPs e CRs. Os resultados demonstraram que o infiltrado inflamatório presente foi predominantemente mononuclear, mas em lesões que apresentaram formação de fístulas, o infiltrado misto foi considerado mais frequente, assim como a expressão imuno-histoquímica de IL-17. Desta forma, observou-se que lesões periapicais crônicas podem enfrentar um processo de reagudização, o qual está correlacionado com o aumento do número de leucócitos, predominantemente neutrófilos. Além disso, a quantidade de mastócitos foi maior em GPs e a imunoexpressão de IL-17 e TGF- $\beta$  observada foi significativamente maior em GPs do que nos CRs.



**PROPOSIÇÃO**

### **3 PROPOSIÇÃO**

O presente estudo objetivou avaliar e comparar a expressão imuno-histoquímica da IL-17, TGF- $\beta$ 1 e FoxP3 em GPs, CRs e CRRs, correlacionando-a com o tipo de lesão, com a sintomatologia das mesmas, intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo/cápsula, bem como com a espessura do revestimento epitelial nas lesões císticas. Desta forma, buscou-se que a realização desta pesquisa auxiliasse para um melhor entendimento sobre a etiopatogênese das lesões periapicais crônicas estudadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEP/UFRN), de acordo com a resolução 196/96 do CNS, sendo aprovado segundo parecer nº 330/2011.

### **4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO**

A presente pesquisa foi caracterizada como um estudo descritivo, retrospectivo e correlacional entre as características clínico-morfológicas e a expressão imuno-histoquímica de IL-17, TGF- $\beta$ 1 e FoxP3 em GPs, CRs e CRRs.

### **4.3 POPULAÇÃO**

A população deste experimento foi formada pelo conjunto de casos de GPs, CRs e CRRs diagnosticados no período de 1997 a 2010 pertencentes aos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

### **4.4 AMOSTRA**

A amostra foi constituída por 50 espécimes fixados em formol a 10% e incluídos em blocos de parafina, obtidos a partir dos registros no serviço de Patologia Oral da UFRN. Destes, 20 casos foram diagnosticados como GPs, 20 como CRs e 10 casos como CRRs.

#### **4.4.1 Critérios de Inclusão da Amostra**

- Foram incluídos no estudo espécimes diagnosticados histopatologicamente como GPs, CRs e CRRs e que exibissem aspectos histopatológicos bem definidos pré-estabelecidos. Para os GPs, foram selecionados apenas os casos que se apresentassem ausentes de qualquer remanescente de epitélio odontogênico disperso no tecido conjuntivo constituinte da lesão. Para as lesões císticas, foram incluídos somente os espécimes que exibissem uma cavidade patológica revestida total ou parcialmente por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado, o qual apresentasse subjacente ao mesmo uma quantidade suficiente de cápsula fibrosa para realização das avaliações morfológica e imuno-histoquímica.
- Foram selecionados apenas os espécimes que possuíssem material biológico suficiente nos blocos de parafina para o desenvolvimento da pesquisa.

#### **4.4.2 Critérios de Exclusão da Amostra**

- Foram excluídos do estudo os espécimes com quantidade insuficiente de material biológico nos blocos parafinados, bem como aqueles que exibissem características histopatológicas consideradas incapazes para se estabelecer análise imuno-histoquímica comparativa.

#### **4.5 COLETA DOS DADOS CLÍNICOS**

Os dados referentes às características demográficas e aspectos clínicos dos pacientes foram coletados através de consulta às fichas clínicas de biópsia que acompanham o material para exame anátomo-patológico. Posteriormente, estas informações foram anotadas em uma ficha específica elaborada para o estudo (Apêndice A). No que concerne à avaliação da sintomatologia das lesões, assim como proposto por outros autores, os casos do presente experimento foram classificados em sintomáticos ou assintomáticos de acordo com a presença ou ausência, respectivamente, de dor, moderado aumento de volume ou qualquer outro sintoma associado com a infecção aguda (COLIĆ et al, 2007; COLIĆ et al, 2009a; COLIĆ et al, 2009b; GAZIVODA et al, 2009).

#### 4.6 ESTUDO MORFOLÓGICO

Para o desenvolvimento do estudo morfológico, foi realizada uma avaliação dos aspectos histomorfológicos dos casos selecionados em microscopia de luz nos aumentos de 40x, 100x e 400x, com cortes de 5 µm de espessura e corados pela técnica da hematoxilina e eosina (HE). A intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo/cápsula, bem como o tipo de revestimento epitelial nas lesões císticas foram os aspectos histopatológicos analisados. As avaliações foram estabelecidas por um único avaliador e os dados transcritos para uma ficha previamente elaborada para o estudo (Apêndice B).

A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada sob aumento de 400x de acordo com critérios adaptados do estudo de Tsai et al (2004). Segundo metodologia proposta por tais autores, a partir da porção central dos GPs e da luminal das lesões císticas em direção à periferia, foram considerados 3 campos microscópicos consecutivos. Os espécimes cujo infiltrado inflamatório se apresentasse restrito ao primeiro campo microscópico, foram classificadas como grau I (leve infiltrado); as lesões com células inflamatórias presentes até o segundo campo microscópico foram definidas como de grau II (moderado infiltrado); e as lesões que exibissem infiltrado inflamatório até o terceiro campo microscópico, foram categorizadas como de grau III (intenso infiltrado).

Para os CRs e CRRs, a espessura do revestimento epitelial foi analisada de acordo com metodologia proposta por Moreira et al (2000). Nesta perspectiva, foram considerados atróficos os cistos que apresentassem em sua maior extensão camada epitelial constituída por 2 a 10 camadas de células de espessura e hiperplásicos os espécimes revestidos por epitélio com espessura variável, possuindo mais de 10 camadas de células.

#### 4.7 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*ADVANCE<sup>TM</sup> HRP*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), utilizando anticorpos policlonais anti-IL-17 e

anti-TGF- $\beta$ 1 e ao sistema Envision<sup>®</sup> (Dako Co., Carpinteria, CA, USA) com anticorpos policlonais anti-FoxP3 (Quadro 1).

Especificidade	Clone	Nº catálogo	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
<b>IL-17</b>	H-132	sc-7927	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Citrato, pH 6,0 Pascal, 121°C, 3 min.	60 minutos
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	V	sc-146	Santa Cruz Biotechnology	1:700	Citrato, pH 6,0 Pascal, 121°C, 3 min.	Overnight
<b>FoxP3</b>	H-190	sc-28705	Santa Cruz Biotechnology	1:150	Citrato, pH 6,0 Pascal, 121°C, 3 min.	Overnight

**Quadro 1.** Especificações dos anticorpos utilizados na pesquisa. Natal – RN, 2012.

Como controle negativo os anticorpos foram substituídos por albumina de soro bovino a 1% (BSA - bovine serum albumin). A técnica utilizada no presente experimento seguiu o protocolo descrito abaixo:

⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, ambos por 10 minutos à temperatura ambiente;

⇒ Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:

- Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
- Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
- Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
- Álcool etílico 80°GL (5 minutos);

⇒ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos)

⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);

⇒ Recuperação antigênica (Quadro 1);

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);

⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);

⇒ Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);

- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);
- ⇒ Duas passagens em solução tampão TRIS-HCl (tris-hidroximetil-aminometano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpos primários, em solução diluente (*Antibody diluent with background reducing components*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário (*ADVANCE<sup>TM</sup> HRP Link*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) anti-IL-17 e anti-TGF- $\beta$ 1 ou polimerizado a peroxidase (*Envision<sup>®</sup>* Dako Co., Carpinteria, CA, USA) anti-FoxP3, à temperatura ambiente (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*ADVANCE<sup>TM</sup> HRP Enzyme*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) anti-IL-17 e anti-TGF- $\beta$ 1 e do complexo avidina/biotina, diluído em TRIS gelado (A+B) para anticorpos anti-FoxP3 à temperatura ambiente (30 minutos)
- ⇒ Lavagem em solução tampão TRIS-HCl, pH 7,4 para os anticorpos anti-FoxP3;
- ⇒ Duas passagens em solução tampão TRIS-HCL pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+ Substrate*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (10 minutos);
- ⇒ Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
  - Álcool etílico 80°GL (2 minutos);
  - Álcool etílico 95°GL (2 minutos);
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ⇒ Duas passagens em xilol (2 minutos cada);
- ⇒ Montagem em resina *PermOUNT<sup>®</sup>* (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

#### 4.8 ANÁLISE DO PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO



A análise da expressão imuno-histoquímica da IL-17, TGF- $\beta$ 1 e FoxP3 em GPs, CRs e CRRs foi fundamentada na positividade da marcação, sendo consideradas positivas todas as células que apresentassem pigmentos intracitoplasmáticos e/ou nucleares de coloração acastanhada. Para tanto, esta análise foi realizada quantitativamente por um único observador e os dados foram anotados em fichas elaboradas previamente para o estudo (Apêndices C e D).

As avaliações das imunoexpressões dos biomarcadores pesquisados foi estabelecida mediante a análise de 5 campos microscópicos representativos e aleatórios em aumento de 400x após a identificação das áreas com maior quantidade de células imunorreativas em aumento de 100x. Em seguida, cada campo histológico selecionado foi fotografado através de um microscópio de luz OLYMPUS<sup>®</sup> com máquina fotográfica digital OLYMPUS<sup>®</sup> acoplada. As imagens capturadas foram, então, transferidas para o computador através do sistema OLYMPUS<sup>®</sup> *Master* v1.41 EX, sendo as células contadas com o auxílio do *software* IMAGE J<sup>®</sup> (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

A expressão imuno-histoquímica da IL-17 e do TGF- $\beta$ 1 foi determinada a partir da contagem de todas as células presentes em cada campo microscópico, onde se estabeleceu o percentual de células positivas em relação ao número total de células encontradas em cada campo microscópico avaliado. A partir dos dados obtidos através do percentual médio calculado, foram atribuídos escores levando-se em consideração a metodologia estabelecida por Leonardi et al (2003) com modificações no sistema de escores: escore 1 (menos de 25% de células positivas), 2 (positividade em 26 a 50% das células), 3 (positividade em 51 a 75% das células) e 4 (imunomarcação superior a 76% das células).

Para avaliação da imunoexpressão do FoxP3, foram quantificados apenas os linfócitos FoxP3-positivos e posteriormente, determinou-se a média de células marcadas nos 5 campos microscópicos observados.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com a análise imuno-histoquímica foram digitados em planilha eletrônica Excel (*Microsoft Office 2007*<sup>®</sup>) e posteriormente exportados para o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA), no qual foram realizadas as análises estatísticas.

Em relação aos escores de imunopositividade para a IL-17 e TGF- $\beta$ 1, variáveis categóricas ordinais, a comparação entre GPs, CRs e CRRs foi realizada por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Para a análise de possíveis diferenças nos escores de imunopositividade para IL-17 e TGF- $\beta$ 1 em relação à intensidade do infiltrado inflamatório nas lesões e à espessura do revestimento epitelial nos CRs e CRRs, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Especificamente para avaliação do infiltrado inflamatório, os casos com infiltrado leve e moderado foram agrupados e comparados com os casos exibindo infiltrado inflamatório intenso.

Os dados obtidos com a quantificação dos linfócitos FoxP3-positivos, variável quantitativa discreta, foram submetidos à análise pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, a comparação da quantidade de células Tregs nos GPs, CRs e CRRs foi realizada por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Para a análise de possíveis diferenças na quantidade de linfócitos FoxP3-positivos em relação à intensidade do infiltrado inflamatório nas lesões e à espessura do revestimento epitelial nos CRs e CRRs, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Da mesma forma como foi mencionada para a IL-17 e TGF- $\beta$ 1, especificamente para avaliação do infiltrado inflamatório, os casos com infiltrado leve e moderado foram agrupados e comparados com os casos exibindo infiltrado inflamatório intenso.

Em cada um dos grupos, foram analisadas possíveis correlações entre a quantidade de linfócitos FoxP3-positivos e as imunoexpressões de IL-17 e TGF- $\beta$ 1. Para isso, utilizou-se o teste de correlação de Spearman.

Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, o nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra da presente pesquisa foi intencional e constituída por 50 casos, dos quais 20 (40,0%) foram diagnosticados histopatologicamente como GPs, 20 (40,0%) como CRs e 10 (20,0%) como CRRs. A média de idade para os casos de GPs foi de  $33,8 \pm 12,3$  anos, variando de 15 a 59 anos; para os casos de CRs foi de  $28,4 \pm 11,7$  anos, variando de 13 a 52 anos; e para os casos de CRRs foi de  $51,0 \pm 9,3$  anos, variando de 38 a 67 anos. Os resultados referentes a cada uma das lesões podem ser visualizados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Distribuição dos casos de GPs, CRs e CRRs de acordo com o sexo, raça, localização anatômica e sintomatologia. Natal/RN, 2012.

Variáveis		Lesão periapical		
		GP	CR	CRR
		n (%)	n (%)	n (%)
Sexo	Feminino	13 (65,0)	15 (75,0)	5 (50,0)
	Masculino	7 (35,0)	5 (25,0)	5 (50,0)
	Total	20 (100,0)	20 (100,0)	10 (100,0)
Cor da pele	Leucoderma	4 (28,6)	9 (47,4)	1 (16,7)
	Melanoderma	3 (21,4)	3 (15,8)	2 (33,3)
	Feoderma	7 (50,0)	7 (36,8)	3 (50,0)
	Total	14 (100,0)	19 (100,0)	6 (100,0)
Localização anatômica	Maxila anterior	6 (30,0)	10 (52,6)	5 (71,4)
	Maxila posterior	8 (40,0)	2 (10,5)	0 (0,0)
	Mandíbula anterior	0 (0,0)	1 (5,3)	1 (14,3)
	Mandíbula posterior	6 (30,0)	6 (31,6)	1 (14,3)
	Total	20 (100,0)	19 (100,0)	7 (100,0)
Sintomatologia	Sintomática	6 (46,2)	11 (68,8)	4 (50,0)
	Assintomática	7 (53,8)	5 (31,3)	4 (50,0)
	Total	13 (100,0)	16 (100,0)	8 (100,0)

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

## 5.2 RESULTADOS MORFOLÓGICOS

A análise histopatológica dos espécimes diagnosticados como GPs revelaram a presença de tecido conjuntivo circundado por cápsula fibrosa e constituído por infiltrado inflamatório predominantemente crônico, além de fibroblastos, fascículos nervosos e vasos sanguíneos de calibres variados (Figura 2-A). Os casos de CRs caracterizaram-se pela presença de uma cavidade patológica revestida por epitélio do tipo pavimentoso estratificado não ceratinizado, o qual exibia áreas de degeneração hidrópica, espongirose, exocitose e por vezes projeções arciformes. Na cápsula, observou-se a presença de tecido conjuntivo composto por fibras colágenas arranjadas principalmente de forma densa e permeadas por infiltrado inflamatório de intensidade variável, fibroblastos, fascículos nervosos e vasos sanguíneos (Figura 2-B). Os espécimes de CRRs exibiram aspecto microscópico semelhante ao mencionado para os casos de CRs, no entanto, a interface epitélio-conjuntivo apresentou-se mais frequentemente plana nestas lesões (Figura 2-C). Corpúsculos de Russel, macrófagos espumosos e imagens negativas de cristais de colesterol com células gigantes multinucleadas associadas foram achados encontrados em alguns casos das três lesões estudadas.

A análise da intensidade do infiltrado inflamatório revelou, para os GPs, predomínio de lesões com infiltrado intenso (n = 18; 90,0%) (Figura 3-A), seguidas por lesões com infiltrado moderado (n = 2; 10,0%). De forma análoga, os CRs revelaram maior frequência de casos com infiltrado inflamatório intenso (n = 13; 65,0%), seguidos por casos com infiltrado moderado (n = 7; 35,0%) (Figura 3-B). No grupo dos CRRs, a maioria dos casos apresentou infiltrado moderado (n = 6; 60,0%), com frequências menores para lesões com infiltrado leve (n = 3; 30,0%) (Figura 3-C) e intenso (n = 1; 10,0%).

**Tabela 2.** Distribuição dos casos de GPs, CRs e CRRs de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal/RN, 2012.

Tipo de lesão periapical	Intensidade do infiltrado inflamatório			TOTAL n (%)
	Leve n (%)	Moderado n (%)	Intenso n (%)	
Granuloma periapical	0 (0,0)	2 (10,0)	18 (90,0)	20 (100,0)
Cisto radicular	0 (0,0)	7 (35,0)	13 (65,0)	20 (100,0)
Cisto radicular residual	3 (30,0)	6 (60,0)	1 (10,0)	10 (100,0)

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

A análise da espessura do revestimento epitelial nas lesões císticas revelou maior frequência de lesões com epitélio atrófico (n = 8; 80,0%) (Figura 4) em comparação com as lesões com epitélio hiperplásico (n = 2; 20,0%) no grupo dos CRRs. Nos CRs, constatou-se uma distribuição similar de casos com epitélio atrófico (n = 10; 50,0%) e hiperplásico (n = 10; 50,0%) (Figura 5) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Distribuição dos casos de CRs e CRRs de acordo com a espessura do revestimento epitelial. Natal/RN, 2012.

Tipo de lesão cística	Espessura do revestimento epitelial		TOTAL n (%)
	Atrófico	Hiperplásico	
	n (%)	n (%)	
Cisto radicular	10 (50,0)	10 (50,0)	20 (100,0)
Cisto radicular residual	8 (80,0)	2 (20,0)	10 (100,0)

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

### 5.3 RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

- **Análise da imunoexpressão da IL-17**

A expressão imuno-histoquímica da IL-17 apresentou um padrão de marcação predominantemente citoplasmática nas células do tecido conjuntivo/cápsula das lesões pesquisadas. Esta marcação foi observada em células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos), fibroblastos e células endoteliais. Em 100% dos casos do presente estudo foi observada imunorreatividade para a IL-17.

A análise da imunoexpressão da IL-17 revelou, para o grupo dos GPs, predomínio do escore 3 (n = 15; 75,0%), seguido pelos escores 4 (n = 4; 20,0%) e 2 (n = 1; 5,0%) (Figura 6). De forma similar, no grupo dos CRs, a maioria dos casos foi classificada com o escore 3 (n = 11; 55,0%), com frequências menores para os escores 4 (n = 7; 35,0%) e 2 (n = 2; 10,0%) (Figura 7). Para os CRRs, constatou-se maior frequência de casos com escore 3 (n = 5; 50,0%), seguido dos escores 2 (n = 3; 30,0%) e 4 (n = 2; 20,0%) (Figura 8). O teste não-

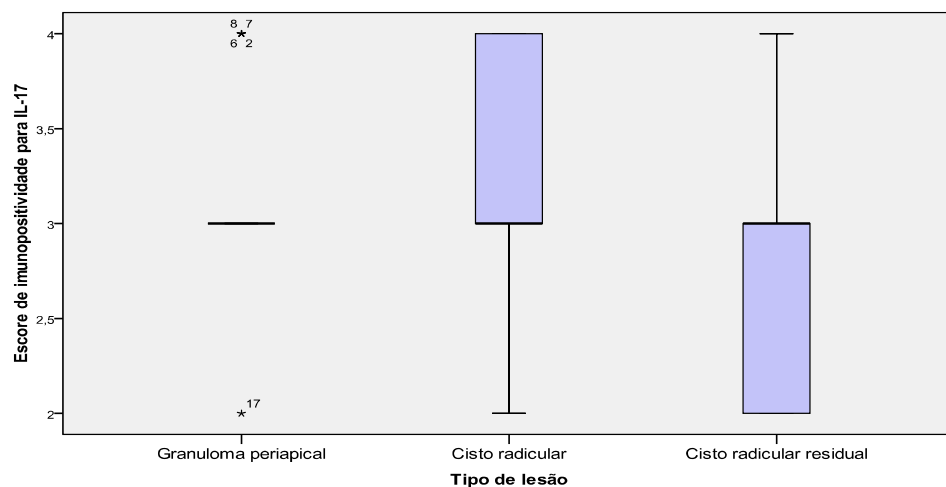
paramétrico de Kruskal-Wallis revelou ausência de diferença estatisticamente significativa nos escores de imunopositividade para a IL-17 entre GPs, CRs e CRRs ( $p = 0,355$ ) (Tabela 4) (Gráfico 1).

**Tabela 4.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística KW e significância estatística ( $p$ ) para os escores de imunopositividade para a IL-17 relação ao tipo de lesão. Natal – RN, 2012.

Tipo de lesão	N	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	KW	$p$
GP	20	3,00	3,00 – 3,00	25,48	2,070	0,355
CR	20	3,00	3,00 – 4,00	27,85		
CRR	10	3,00	2,00 – 3,25	20,85		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Legenda: GP – Granuloma periapical; CR – Cisto radicular; CRR – Cisto radicular residual.



**Gráfico 1.** Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para a IL-17 de acordo com o tipo de lesão. Natal – RN, 2012.

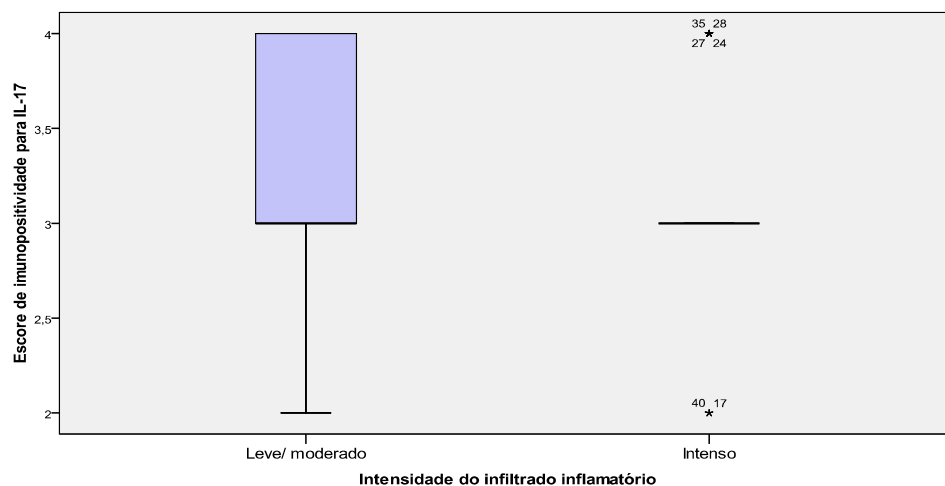
No tocante à análise da imunopositividade para a IL-17 quanto à intensidade do infiltrado inflamatório, observou-se, para as lesões com infiltrado leve ( $n = 3$ ), maior frequência do escore 2 ( $n = 2$ ; 66,7%), seguido do escore 3 ( $n = 1$ ; 33,3%). Nas lesões com infiltrado moderado ( $n = 15$ ), houve maior frequência do escore 3 ( $n = 8$ ; 53,3%), seguido dos escores 4 ( $n = 6$ ; 40,0%) e 2 ( $n = 1$ ; 6,7%). Em lesões com infiltrado intenso ( $n = 32$ ), a

maioria dos casos foi classificada como escore 3 ( $n = 22$ ; 68,8%), com frequências menores para os escores 4 ( $n = 7$ ; 21,9%) e 2 ( $n = 3$ ; 9,4%). O teste não-paramétrico de Mann-Whitney revelou ausência de diferença estatisticamente significativa nos escores de imunopositividade para a IL-17 entre lesões com infiltrado inflamatório leve/moderado e lesões com infiltrado intenso ( $p = 0,585$ ) (Tabela 5) (Gráfico 2).

**Tabela 5.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para os escores de imunopositividade para a IL-17 em relação à intensidade do infiltrado inflamatório. Natal – RN, 2012.

Infiltrado inflamatório	N	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	$p$
Leve/ moderado	18	3,00	3,00-4,00	27,00	486,00	261,00	0,585
Intenso	32	3,00	3,00-3,00	24,66	789,00		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.



**Gráfico 2.** Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para a IL-17 de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal – RN, 2012.

A análise da imunopositividade para a IL-17 em relação à espessura do revestimento epitelial dos CRs e CRRs revelou, para os casos com epitélio atrófico ( $n = 18$ ), distribuição relativamente similar entre os escores 3 ( $n = 7$ ; 38,9%), 4 ( $n = 6$ ; 33,3%) e 2 ( $n = 5$ ; 27,8%). Nas lesões com epitélio hiperplásico ( $n = 12$ ), houve predomínio do escore 3 ( $n = 9$ ; 75,0%),

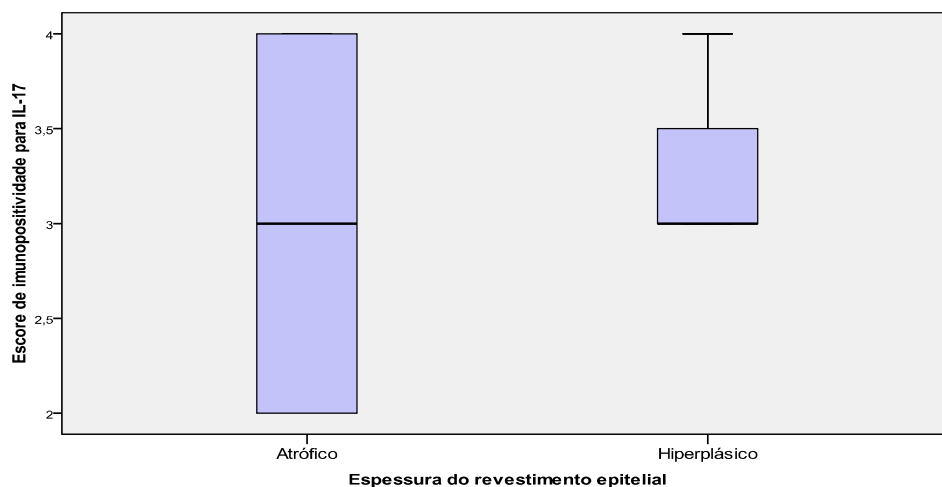


seguido do escore 4 ( $n = 3$ ; 25,0%). O teste não-paramétrico de Mann-Whitney revelou ausência de diferença estatisticamente significativa nos escores de imunopositividade para a IL-17 entre cistos com epitélio atrófico e com epitélio hiperplásico ( $p = 0,899$ ) (Tabela 6) (Gráfico 3).

**Tabela 6.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para os escores de imunopositividade para a IL-17 em relação à espessura do revestimento epitelial nos CRs e CRRs. Natal – RN, 2012.

<b>Espessura epitelial</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub></b>	<b>Média dos postos</b>	<b>Soma dos postos</b>	<b>U</b>	<b><math>p</math></b>
Atrófico	18	3,00	2,00-4,00	15,67	282,00	105,00	0,899
Hiperplásico	12	3,00	3,00-3,75	15,25	183,00		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.



**Gráfico 3.** Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para a IL-17 de acordo com a espessura do revestimento epitelial nos CRs e CRRs. Natal – RN, 2012.

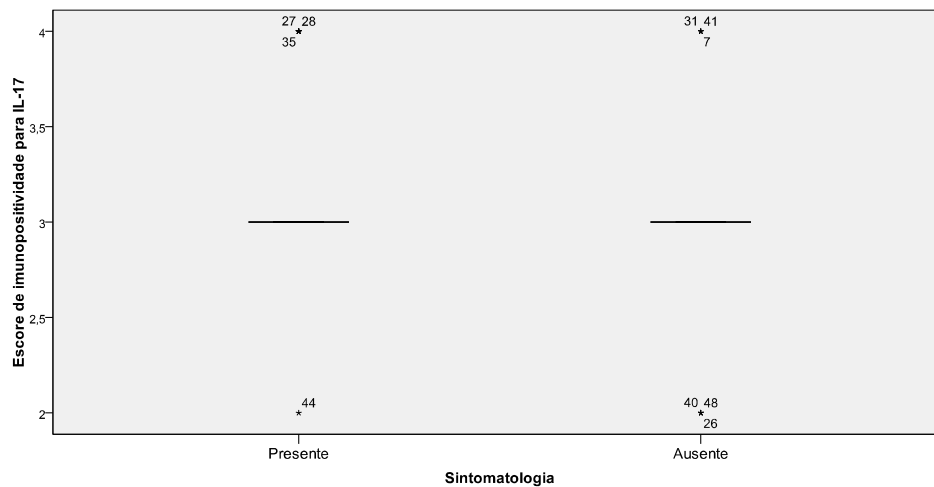
No que se refere a análise da imunopositividade para a IL-17 em relação à sintomatologia das lesões, observou-se, para os casos sintomáticos ( $n = 21$ ), predomínio do escore 3 ( $n = 15$ ; 71,4%), seguido dos escores 4 ( $n = 5$ ; 23,8%) e 2 ( $n = 1$ ; 4,8%). De forma análoga, nas lesões assintomáticas ( $n = 16$ ), houve predomínio do escore 3 ( $n = 10$ ; 62,5%), seguido dos escores 4 ( $n = 3$ ; 18,8%) e 2 ( $n = 3$ ; 18,8%). O teste não-paramétrico de Mann-

Whitney revelou ausência de diferença estatisticamente significativa nos escores de imunopositividade para a IL-17 entre lesões sintomáticas e assintomáticas ( $p = 0,334$ ) (Tabela 7) (Gráfico 4).

**Tabela 7.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para os escores de imunopositividade para a IL-17 em relação à sintomatologia das lesões. Natal – RN, 2012.

Sintomatologia	N	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	$p$
Ausente	16	3,00	3,00-3,00	17,38	278,00	142,00	0,334
Presente	21	3,00	3,00-3,50	20,24	425,00		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.



**Gráfico 4.** Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para a IL-17 de acordo com a sintomatologia das lesões. Natal – RN, 2012.

- **Análise da imunoexpressão do TGF- $\beta$ 1**

A expressão imuno-histoquímica do TGF- $\beta$ 1 localizou-se predominantemente no citoplasma das células do tecido conjuntivo/cápsula das lesões pesquisadas. Esta marcação foi observada em células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos),

fibroblastos e células endoteliais. Em 100% dos casos de GP e CR foi evidenciada imunorreatividade para o TGF- $\beta$ 1 e em 90% (9 casos) de CRRs.

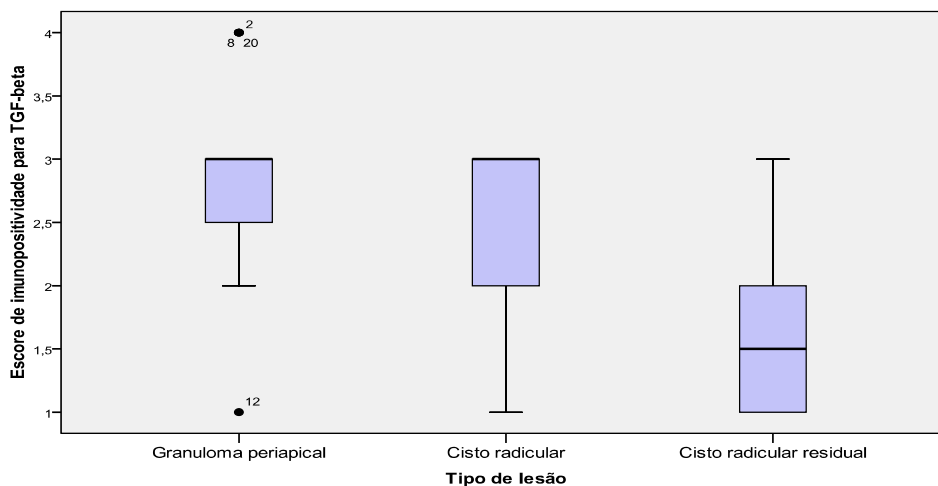
A análise da imunoposição do TGF- $\beta$ 1 revelou, para o grupo dos GPs, predomínio do escore 3 (n = 11; 55,0%), seguido dos escores 4 (n = 4; 20,0%), 2 (n = 4; 20,0%) e 1 (n = 1; 5,0%) (Figura 9). Nos CRs, a maioria dos casos foi classificada com o escore 3 (n = 14; 70,0%), com frequências menores para os escores 2 (n = 5; 25,0%) e 1 (n = 1; 5,0%) (Figura 10). Para os CRRs, constatou-se maior frequência do escore 1 (n = 5; 50,0%), seguido dos escores 2 (n = 3; 30,0%) e 3 (n = 2; 20,0%) (Figura 11). O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis revelou diferença estatisticamente significativa nos escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 entre os grupos analisados, com os CRRs exibindo mediana inferior em comparação com os CRs e GPs ( $p = 0,002$ ) (Tabela 8) (Gráfico 5).

**Tabela 8.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística KW e significância estatística ( $p$ ) para os escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 em relação ao tipo de lesão. Natal – RN, 2012.

Tipo de lesão	N	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	KW	$p$
GP	20	3,00	2,25 – 3,00	30,75	12,709	0,002
CR	20	3,00	2,00 – 3,00	26,68		
CRR	10	1,50	1,00 – 2,25	12,65		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Legenda: GP – Granuloma periapical; CR – Cisto radicular; CRR – Cisto radicular residual.



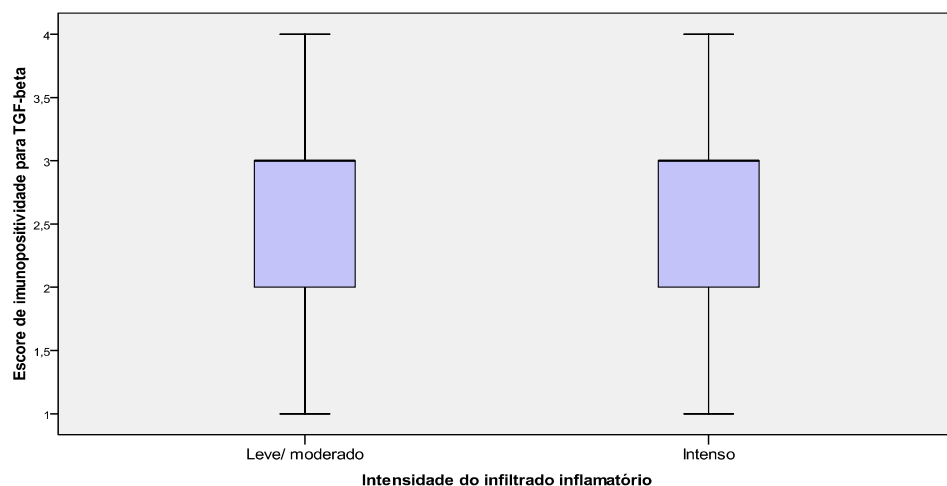
**Gráfico 5.** Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 de acordo com o tipo de lesão. Natal – RN, 2012.

Com relação à análise da imunoposição do TGF- $\beta$ 1 quanto à intensidade do infiltrado inflamatório, observou-se, para as lesões com infiltrado leve ( $n = 3$ ), maior frequência do escore 1 ( $n = 2$ ; 66,7%), seguido do escore 3 ( $n = 1$ ; 33,3%). Nas lesões com infiltrado moderado ( $n = 15$ ), houve predomínio do escore 3 ( $n = 8$ ; 53,3%), com frequências menores para os escores 2 ( $n = 4$ ; 26,7%), 1 ( $n = 2$ ; 13,3%) e 4 ( $n = 1$ ; 6,7%). Em lesões com infiltrado intenso ( $n = 32$ ), a maioria dos casos foi classificada com o escore 3 ( $n = 18$ ; 56,3%), com frequências menores para os escores 2 ( $n = 8$ ; 25,0%), 1 ( $n = 3$ ; 9,4%) e 4 ( $n = 3$ ; 9,4%). O teste não-paramétrico de Mann-Whitney revelou ausência de diferença estatisticamente significativa nos escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 entre lesões com infiltrado inflamatório leve/moderado e lesões com infiltrado intenso ( $p = 0,332$ ) (Tabela 9) (Gráfico 6).

**Tabela 9.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para os escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 em relação à intensidade do infiltrado inflamatório. Natal – RN, 2012.

Infiltrado inflamatório	N	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	$p$
Leve/ moderado	18	3,00	1,75-3,00	22,83	411,00	240,00	0,332
Intenso	32	3,00	2,00-3,00	27,00	864,00		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.



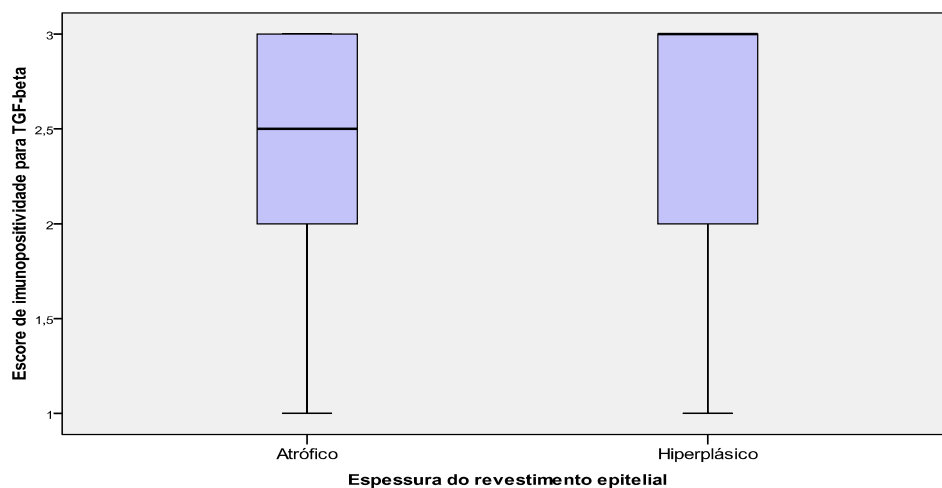
**Gráfico 6.** Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal – RN, 2012.

A análise da imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 em relação à espessura do revestimento epitelial das lesões císticas revelou, para os casos com epitélio atrófico ( $n = 18$ ), maior frequência do escore 3 ( $n = 9$ ; 50,0%), seguido dos escores 2 ( $n = 5$ ; 27,8%) e 1 ( $n = 4$ ; 22,2%). De forma similar, nas lesões com epitélio hiperplásico ( $n = 12$ ), houve predomínio do escore 3 ( $n = 7$ ; 58,3%), seguido dos escores 2 ( $n = 3$ ; 25,0%) e 1 ( $n = 2$ ; 16,7%). O teste não-paramétrico de Mann-Whitney revelou ausência de diferença estatisticamente significativa nos escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 entre cistos com epitélio atrófico e com epitélio hiperplásico ( $p = 0,626$ ) (Tabela 9) (Gráfico 7).

**Tabela 10.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para os escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 em relação à espessura do revestimento epitelial nos CRs e CRRs. Natal – RN, 2012.

<b>Espessura epitelial</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub></b>	<b>Média dos postos</b>	<b>Soma dos postos</b>	<b>U</b>	<b><i>p</i></b>
Atrófico	18	2,50	1,75-3,00	14,86	267,50	96,50	0,626
Hiperplásico	12	3,00	2,00-3,00	16,46	197,50		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.



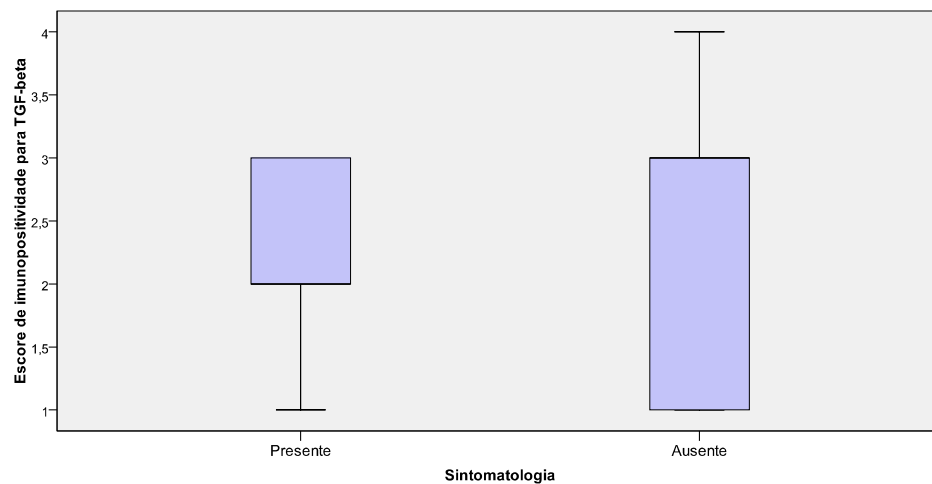
**Gráfico 7.** Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 de acordo com a espessura do revestimento epitelial nos cistos radiculares e radiculares residuais. Natal – RN, 2012.

No que tange a análise da imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 em relação à sintomatologia das lesões, verificou-se, para os casos sintomáticos ( $n = 21$ ), predomínio do escore 3 ( $n = 10$ ; 47,6%), seguido dos escores 2 ( $n = 9$ ; 42,9%) e 1 ( $n = 1$ ; 9,5%). Nas lesões assintomáticas ( $n = 16$ ), houve predomínio do escore 3 ( $n = 10$ ; 50,0%), seguido dos escores 1 ( $n = 6$ ; 30,0%), 2 ( $n = 2$ ; 10,0%) e 4 ( $n = 2$ ; 10,0%). O teste não-paramétrico de Mann-Whitney revelou ausência de diferença estatisticamente significativa nos escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 entre lesões sintomáticas e assintomáticas ( $p = 0,443$ ) (Tabela 11) (Gráfico 8).

**Tabela 11.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para os escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 em relação à sintomatologia das lesões. Natal – RN, 2012.

Sintomatologia	N	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	$p$
Ausente	16	3,00	1,00-3,00	20,44	327,00	145,00	0,443
Presente	21	2,00	2,00-3,00	17,90	376,00		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.



**Gráfico 8.** Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o TGF- $\beta$ 1 de acordo com a sintomatologia das lesões. Natal – RN, 2012.

- **Análise da imunoposição do FoxP3**

A expressão imuno-histoquímica do FoxP3 apresentou um padrão de marcação com localização nuclear nos linfócitos positivos, de modo que apenas os linfócitos imunomarcados dispersos no tecido conjuntivo/cápsula foram contabilizados. Dentre os espécimes analisados no presente estudo, 95% dos GPs e CRs (19 casos de cada lesão), bem como 70% dos CRRs (7 casos) apresentaram imunorreatividade para o FoxP3.

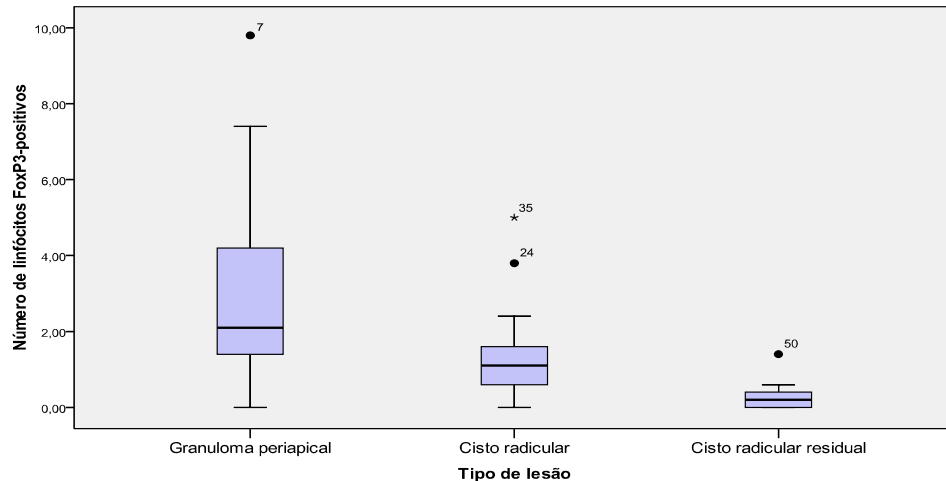
No que se refere à análise dos linfócitos imunopositivos para o FoxP3 verificou-se, para os GPs, valores médios que variaram de 0,00 a 9,80, com uma média de  $3,05 \pm 2,49$  células imunomarcadas (Figura 12). Nos CRs, os valores médios de linfócitos FoxP3-positivos variaram de 0,00 a 5,00, com uma média de  $1,36 \pm 1,20$  células imunomarcadas (Figura 13). Nos CRRs, as médias de linfócitos positivos para o FoxP3 variaram de 0,00 a 1,40, com uma média de  $0,32 \pm 0,42$  células imunomarcadas (Figura 14). O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com os GPs exibindo maior mediana de linfócitos FoxP3-positivos em comparação com os CRs e CRRs ( $p < 0,001$ ) (Tabela 10). Os CRs, por sua vez, apresentaram maior mediana de células positivas para o FoxP3 em relação aos CRRs ( $p < 0,001$ ) (Tabela 12) (Gráfico 9).

**Tabela 12.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística KW e significância estatística ( $p$ ) para o número de linfócitos FoxP3-positivos em relação ao tipo de lesão. Natal – RN, 2012.

<b>Tipo de lesão</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub></b>	<b>Média dos postos</b>	<b>KW</b>	<b><math>p</math></b>
GP	20	2,10	1,40 – 4,30	34,25	18,768	< 0,001
CR	20	1,10	0,60 – 1,60	24,53		
CRR	10	0,20	0,00 – 0,45	9,95		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Legenda: GP – Granuloma periapical; CR – Cisto radicular; CRR – Cisto radicular residual.



**Gráfico 9.** Box-plot relativo à quantidade de linfócitos FoxP3-positivos de acordo com o tipo de lesão. Natal – RN, 2012.

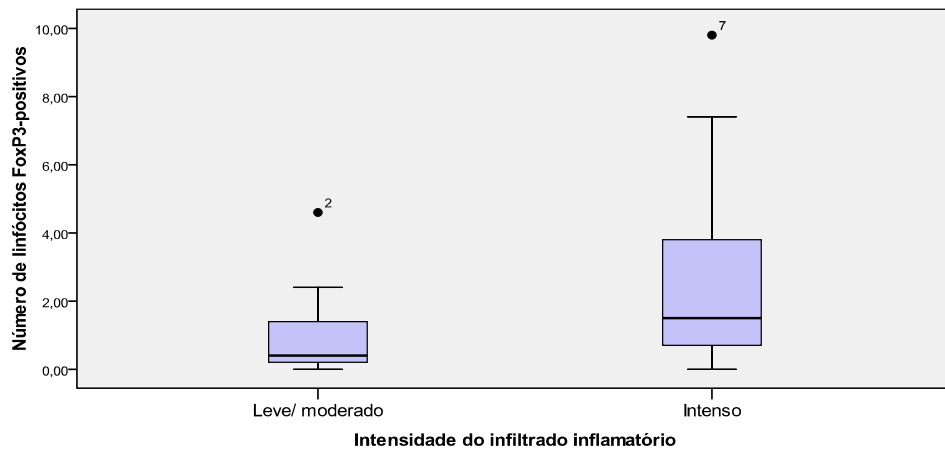
A análise dos linfócitos FoxP3-positivos em relação à intensidade do infiltrado inflamatório revelou, para as lesões com infiltrado leve ( $n = 3$ ), valores médios que variaram de 0,00 a 0,20, com uma média de  $0,13 \pm 0,11$  linfócitos imunomarcados. Nas lesões com infiltrado moderado ( $n = 15$ ), os valores médios de linfócitos FoxP3-positivos variaram de 0,00 a 4,60, com uma média de  $1,04 \pm 1,22$  células imunomarcadas. Em lesões com infiltrado intenso ( $n = 32$ ), as médias de linfócitos positivos para o FoxP3 variaram de 0,00 a 9,80, com uma média de  $2,35 \pm 2,25$  células imunomarcadas. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney revelou mediana de linfócitos FoxP3-positivos significativamente maior nas lesões com infiltrado inflamatório intenso em comparação com as lesões com infiltrado leve/ moderado ( $p = 0,003$ ) (Tabela 13) (Gráfico 10).

**Tabela 13.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para o número de linfócitos FoxP3-positivos em relação à intensidade do infiltrado inflamatório. Natal – RN, 2012.

<b>Infiltrado inflamatório</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub></b>	<b>Média dos postos</b>	<b>Soma dos postos</b>	<b>U</b>	<b><i>p</i></b>
Leve/ moderado	18	0,40	0,15-1,45	17,31	311,50	140,50	0,003
Intenso	32	1,50	0,65-3,80	30,11	963,50		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.





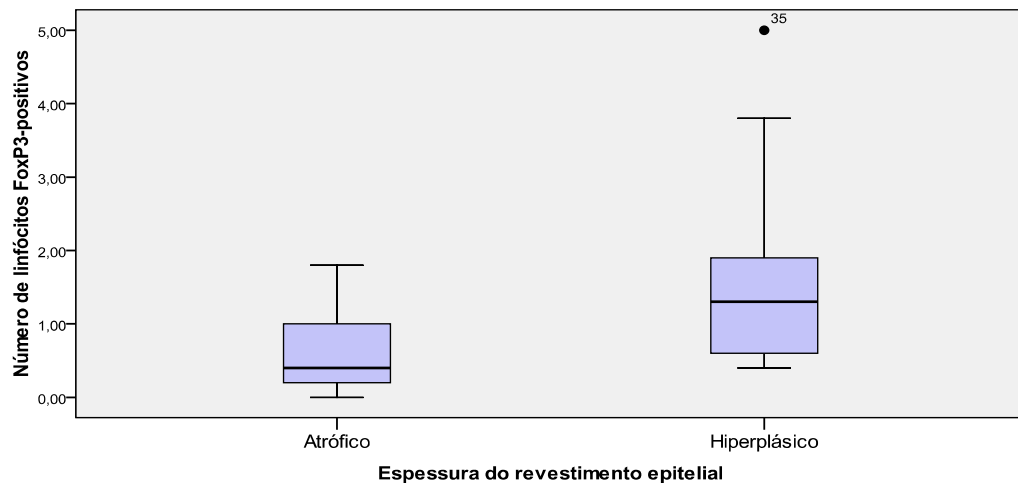
**Gráfico 10.** Box-plot relativo à quantidade de linfócitos FoxP3-positivos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Natal – RN, 2012.

Em relação à espessura do revestimento epitelial dos CRs e CRRs, casos com epitélio atrófico ( $n = 18$ ) apresentaram valores médios de linfócitos imunopositivos para o FoxP3 que variaram de 0,00 a 1,80, com uma média de  $0,58 \pm 0,59$  linfócitos imunomarcados. Nas lesões com epitélio hiperplásico ( $n = 12$ ), os valores médios de células imunopositivas para o FoxP3 variaram de 0,40 a 5,00, com uma média de  $1,65 \pm 1,42$  linfócitos imunomarcados. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney revelou mediana de linfócitos FoxP3-positivos significativamente maior nos cistos com epitélio hiperplásico em comparação com os cistos apresentando epitélio atrófico ( $p = 0,009$ ) (Tabela 12) (Gráfico 9).

**Tabela 14.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para o número de linfócitos FoxP3-positivos em relação à espessura do revestimento epitelial nos cistos radiculares e radiculares residuais. Natal – RN, 2012.

Espessura epitelial	N	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	$p$
Atrófico	18	0,40	0,15-1,00	12,11	218,00	47,00	0,009
Hiperplásico	12	1,30	0,60-2,15	20,58	247,00		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.



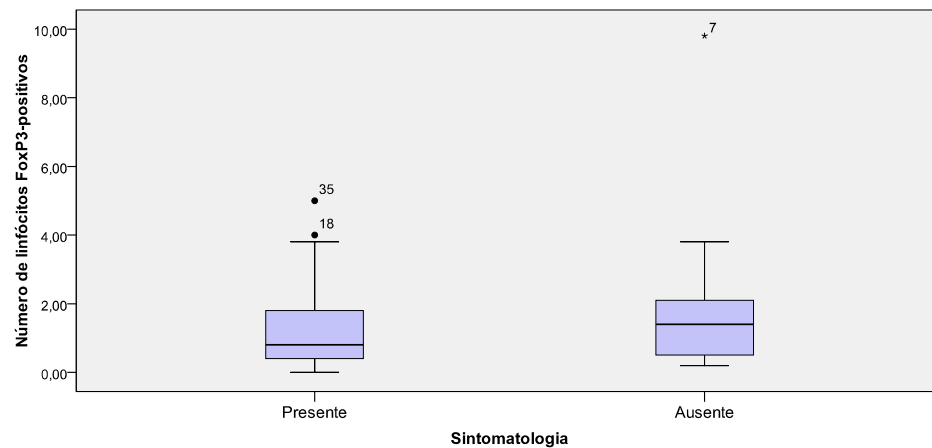
**Gráfico 11.** Box-plot relativo à quantidade de linfócitos FoxP3-positivos de acordo com a espessura do revestimento epitelial nos cistos radiculares e radiculares residuais. Natal – RN, 2012.

No tocante a análise da imunopositividade para o FoxP3 quanto à sintomatologia das lesões, observou-se que os casos sintomáticos ( $n = 21$ ) apresentaram valores médios de linfócitos imunopositivos para o FoxP3 que variaram de 0,00 a 5,00, com uma média de  $1,31 \pm 1,39$  células imunomarcadas. Nas lesões assintomáticas ( $n = 16$ ) os valores médios de células imunopositivas para o FoxP3 variaram de 0,20 a 9,80, com uma média de  $1,96 \pm 2,36$  linfócitos imunomarcados. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney revelou ausência de diferença estatisticamente significativa nos escores de imunopositividade para o FoxP3 entre lesões sintomáticas e assintomáticas ( $p = 0,325$ ) (Tabela 15) (Gráfico 12).

**Tabela 15.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para os escores de imunopositividade para o FoxP3 em relação à sintomatologia das lesões. Natal – RN, 2012.

Sintomatologia	N	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	$p$
Ausente	16	1,40	0,45-2,25	21,00	336,00	136,00	0,325
Presente	21	0,80	0,30-1,90	17,48	367,00		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.



**Gráfico 12.** Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o FoxP3 de acordo com a sintomatologia das lesões. Natal – RN, 2012.

### **Correlação da quantidade de linfócitos FoxP3-positivos com a imunexpressão da IL-17 e do TGF- $\beta$ 1**

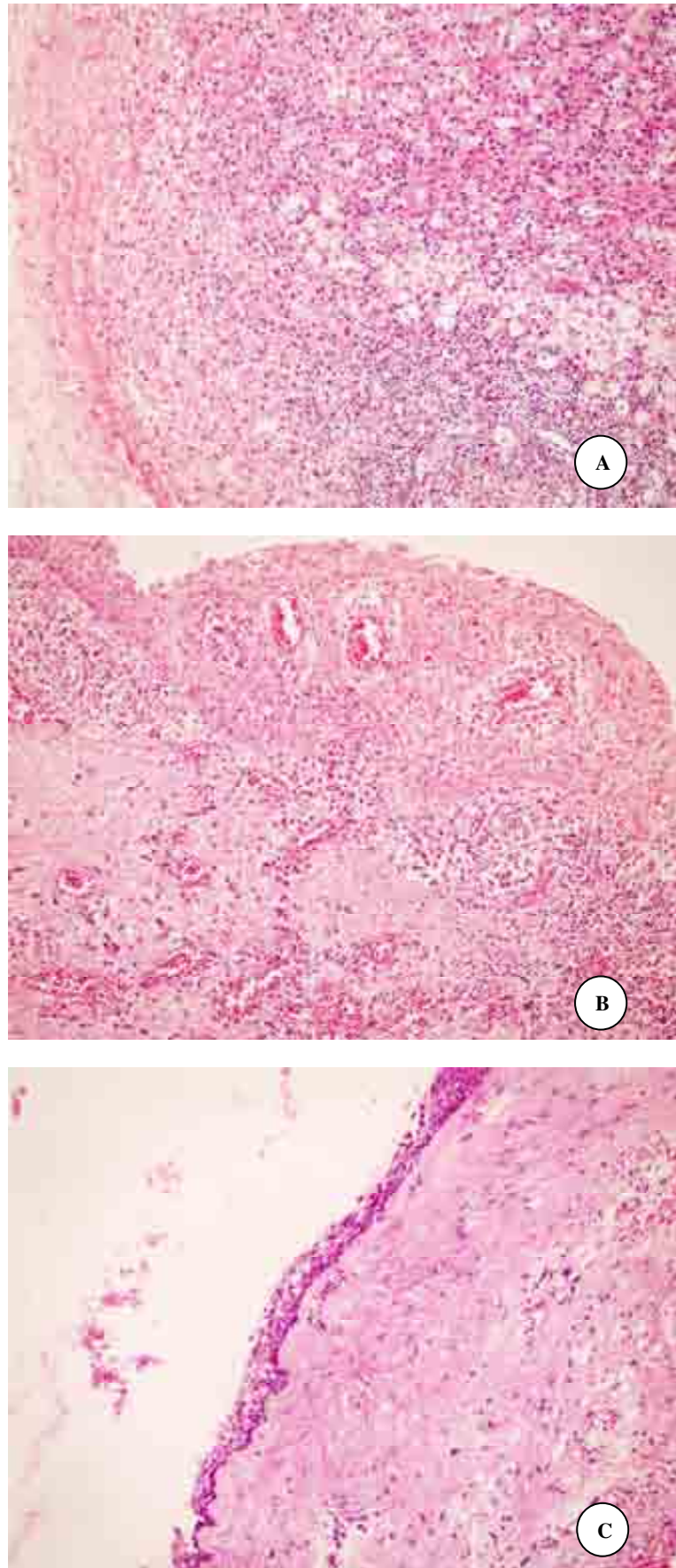
Foram analisadas possíveis correlações entre a quantidade de linfócitos positivos para o FoxP3 e as imunexpressões de IL-17 e TGF- $\beta$ 1. Nos GPs, o teste de correlação de Spearman demonstrou haver forte correlação positiva entre a quantidade de linfócitos FoxP3-positivos e a imunexpressão de TGF- $\beta$ 1 ( $r = 0,755$ ;  $p < 0,001$ ). Para os CRs e CRRs, o teste de correlação de Spearman revelou não existir correlação estatisticamente significativa entre a quantidade de linfócitos FoxP3-positivos e as imunexpressões de IL-17 e TGF- $\beta$ 1 (Tabela 16).

**Tabela 16.** Tamanho da amostra, valor estatístico para o coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) e significância estatística ( $p$ ) para a quantidade de linfócitos FoxP3-positivos em relação às imunoexpressões de IL-17 e TGF- $\beta$ , de acordo com o tipo de lesão. Natal, RN – 2012.

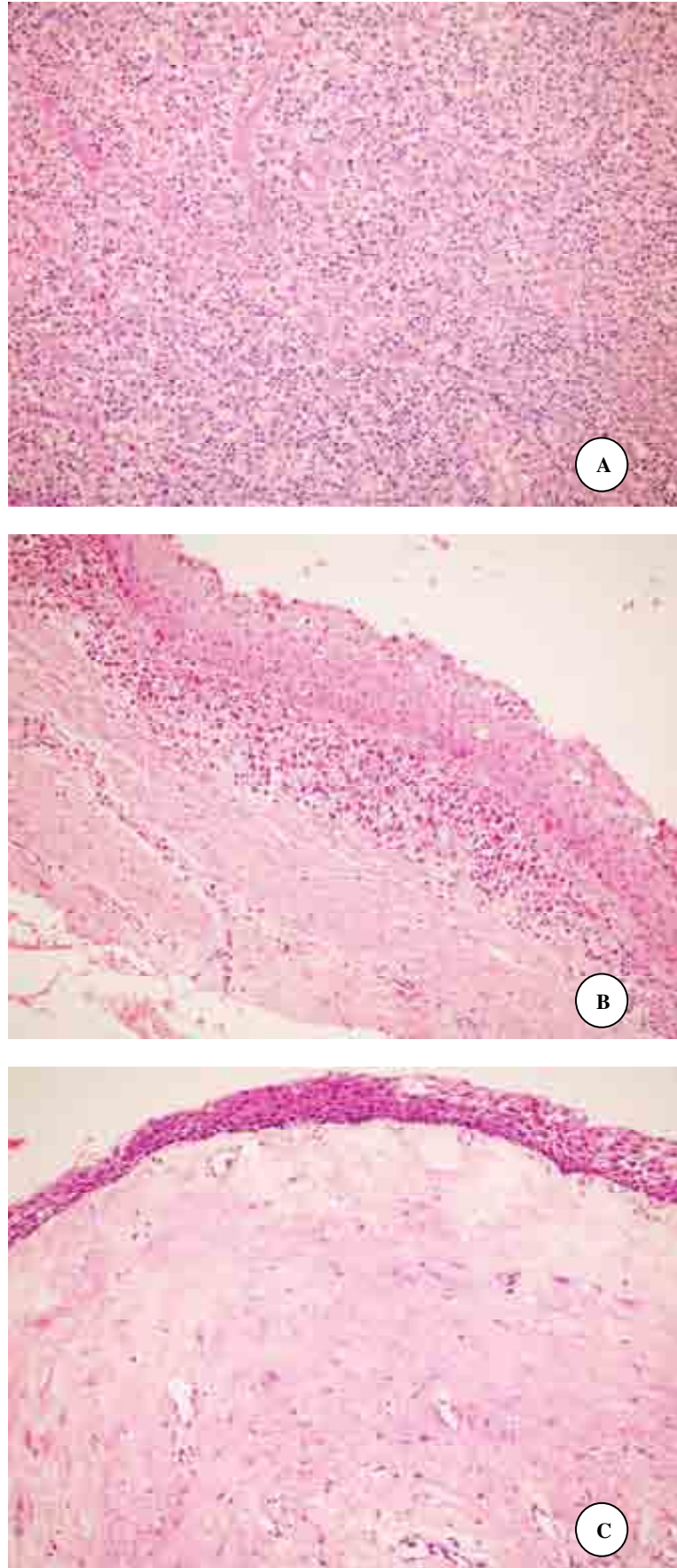
<b>Tipo de lesão</b>	<b>n</b>	<b>R</b>	<b>p</b>
Granuloma periapical			
FoxP3 x IL-17	20	0,361	0,118
FoxP3 x TGF- $\beta$ 1	20	0,755	<b>&lt; 0,001</b>
Cisto radicular			
FoxP3 x IL-17	20	0,094	0,694
FoxP3 x TGF- $\beta$ 1	20	0,079	0,740
Cisto radicular residual			
FoxP3 x IL-17	10	0,361	0,305
FoxP3 x TGF- $\beta$ 1	10	- 0,506	0,136

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

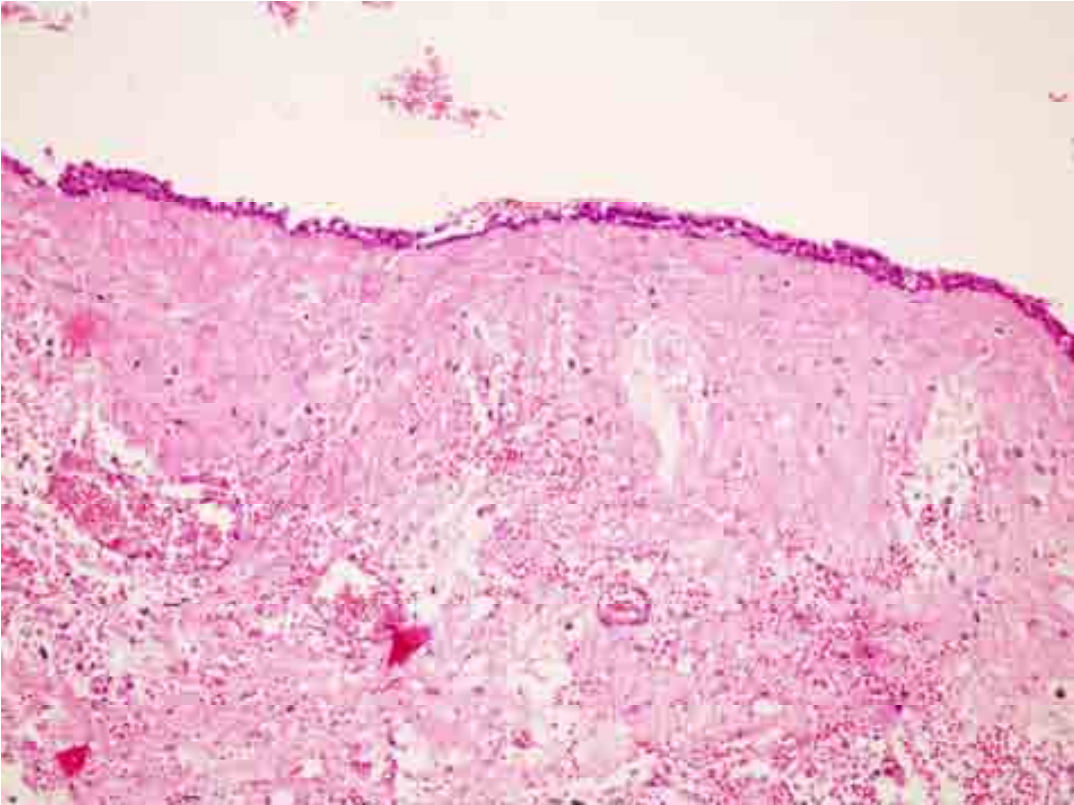
Foram avaliadas, ainda, possíveis correlações entre as imunoexpressões da IL-17 e TGF- $\beta$ 1. Nos GPs, o teste de correlação de Spearman revelou haver moderada correlação positiva entre as imunoexpressões de IL-17 e TGF- $\beta$ 1 ( $r = 0,503$ ;  $p = 0,024$ ). Em relação aos demais grupos, o teste de correlação de Spearman demonstrou ausência de correlação estatisticamente significativa entre as imunoexpressões de IL-17 e TGF- $\beta$ 1, tanto nos CRs ( $r = 0,307$ ;  $p = 0,188$ ) quanto nos CRRs ( $r = 0,475$ ;  $p = 0,165$ ).



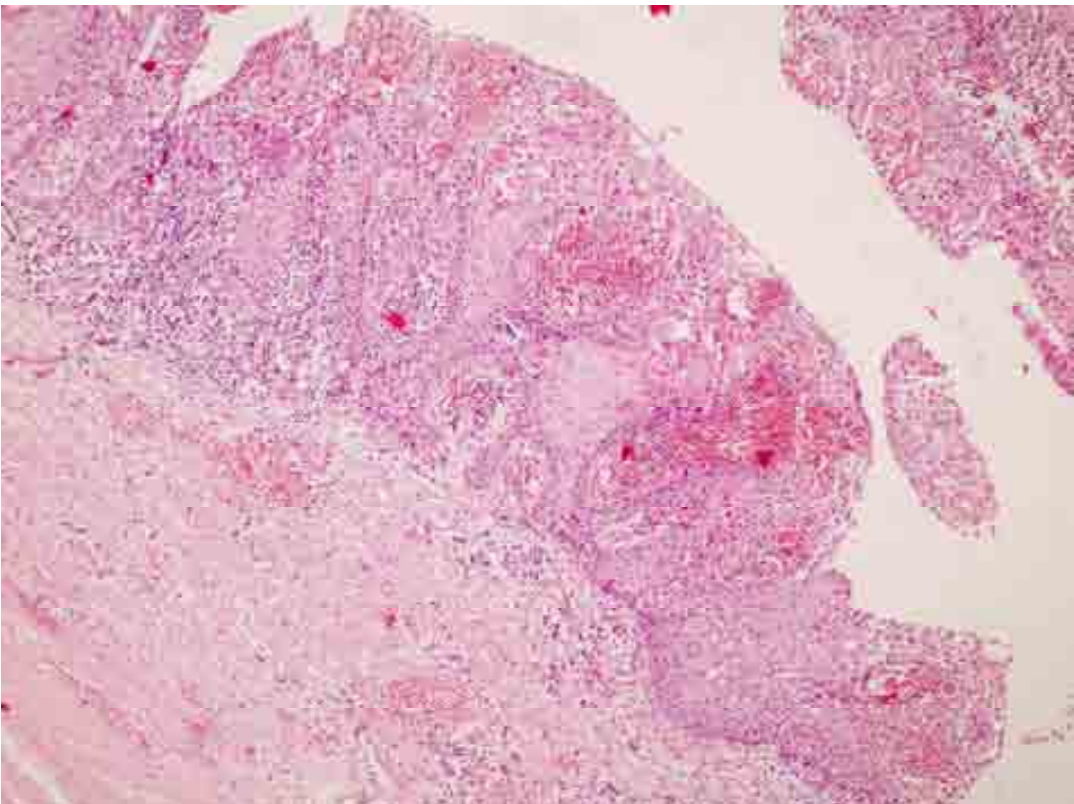
**Figura 2.** Fotomicrografias exibindo os aspectos morfológicos do granuloma periapical (A), cisto radicular (B) e cisto radicular residual (C) (Hematoxilina/Eosina – 200x).



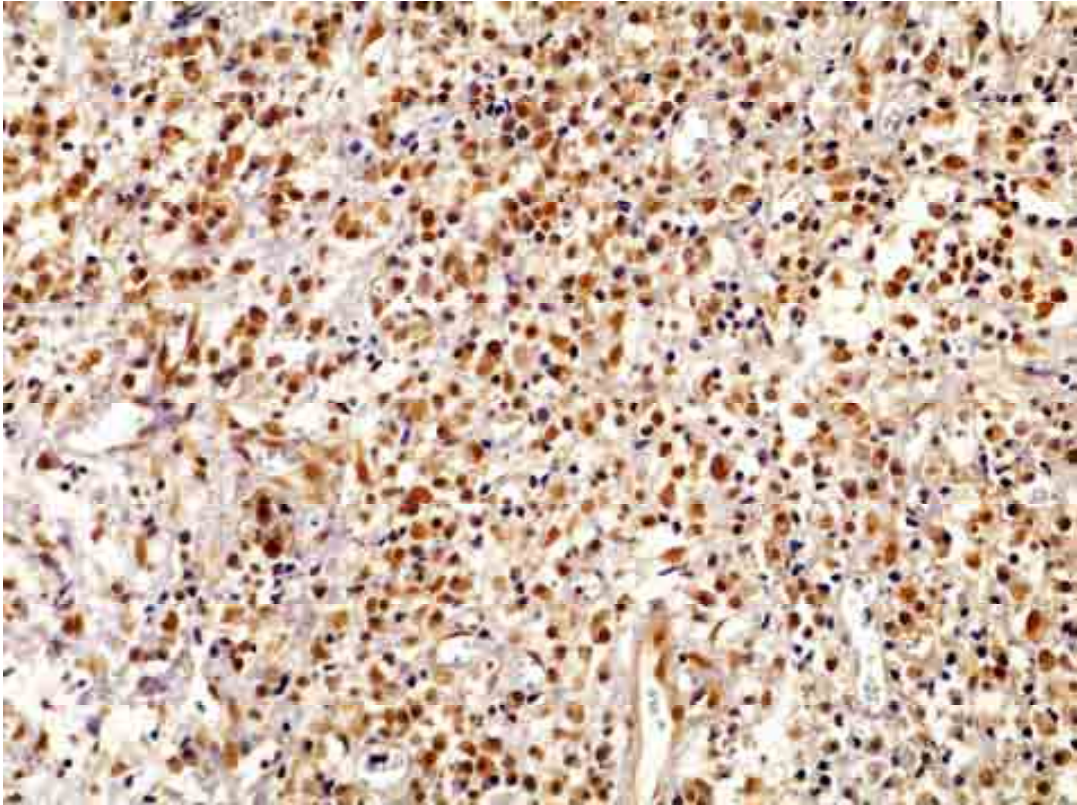
**Figura 3.** Graus de intensidade do infiltrado inflamatório: GP exibindo infiltrado intenso (A), CR com infiltrado moderado (B) e CRR com infiltrado discreto (C) (H/E – 200x).



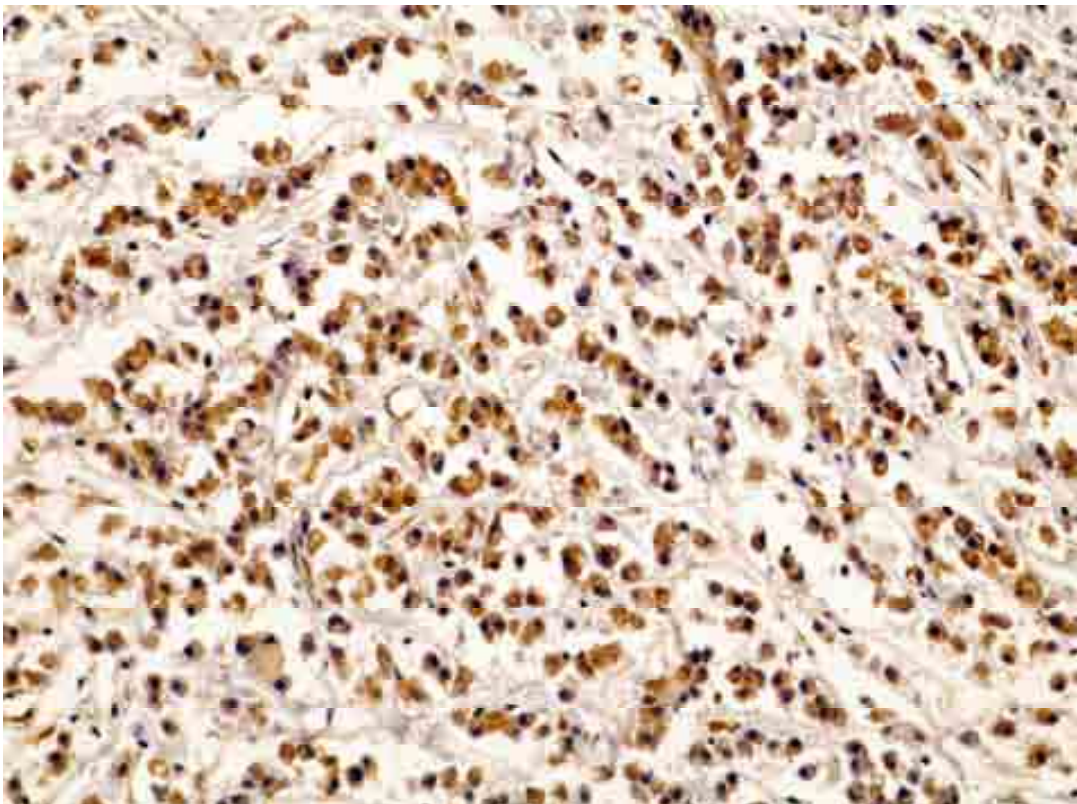
**Figura 4.** Cisto radicular residual exibindo revestimento epitelial pavimentoso estratificado não cetatinizado atrófico (H/E – 200x).



**Figura 5.** Cisto radicular exibindo revestimento epitelial pavimentoso estratificado não cetatinizado hiperplásico (H/E – 200x).

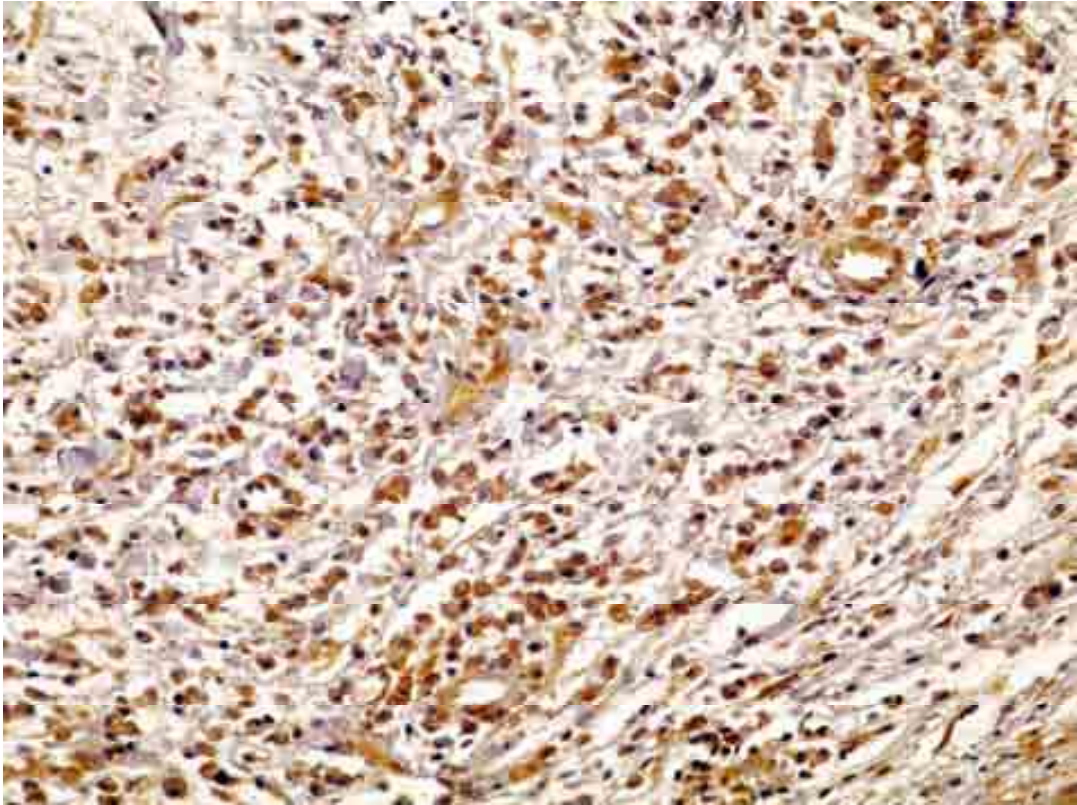


**Figura 6.** Expressão imuno-histoquímica de IL-17 em granuloma periapical evidenciada em citoplasma de células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos. Advance (400x).

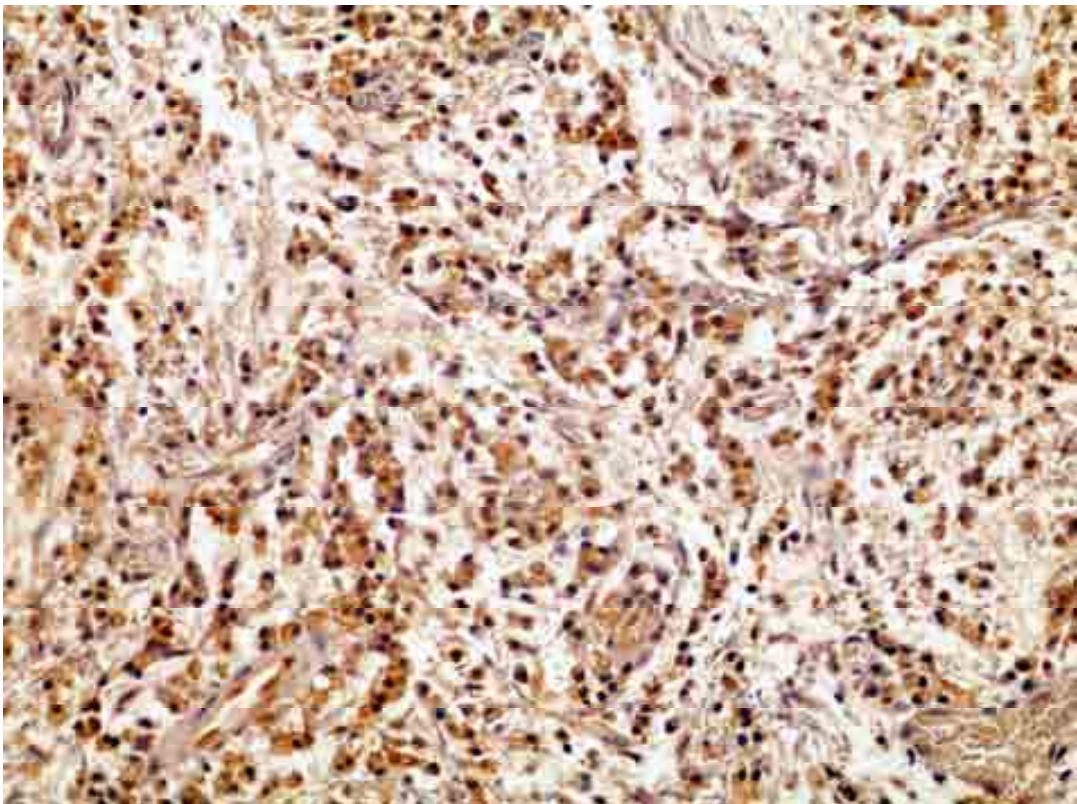


**Figura 7.** Expressão imuno-histoquímica de IL-17 em cisto radicular evidenciada em citoplasma de células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos. Advance (400x).

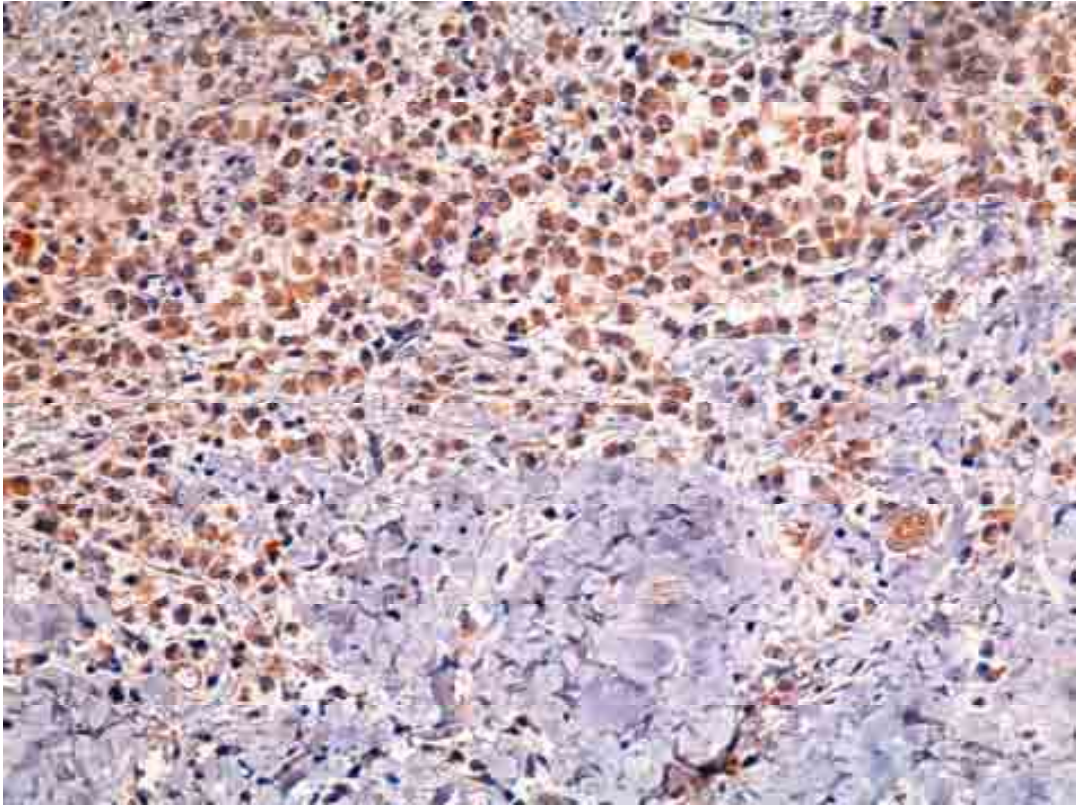




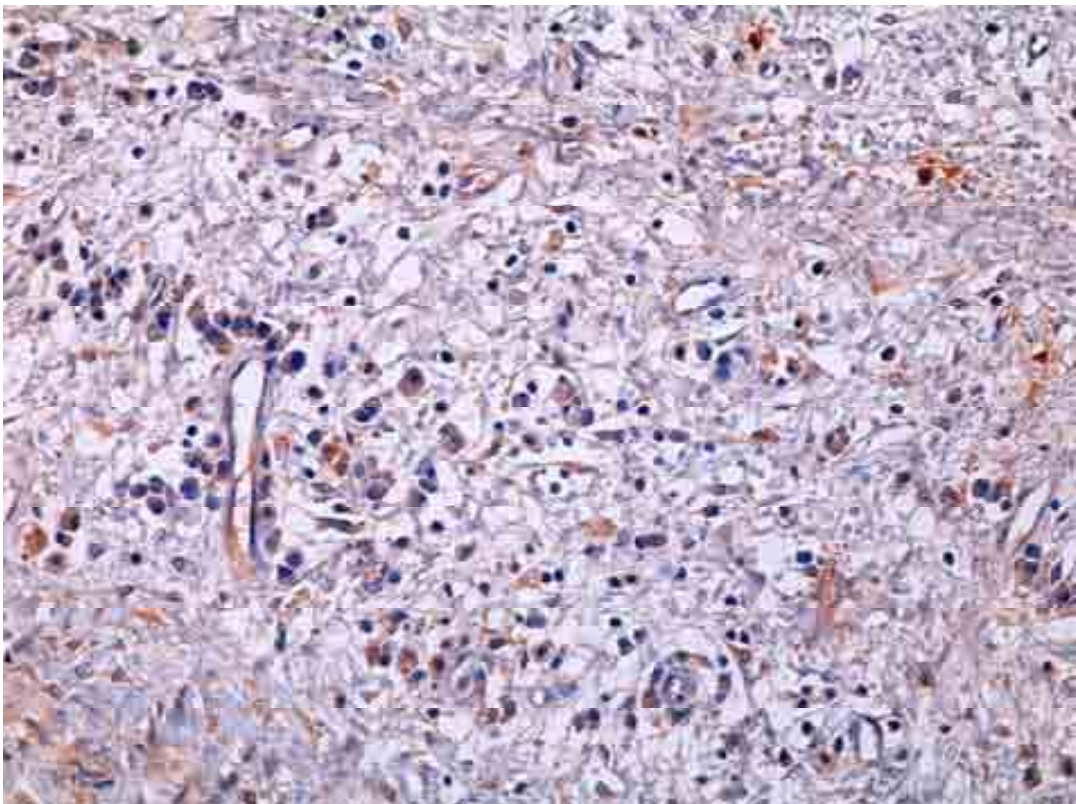
**Figura 8.** Expressão imuno-histoquímica de IL-17 em cisto radicular residual evidenciada em citoplasma de células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos. Advance (400x).



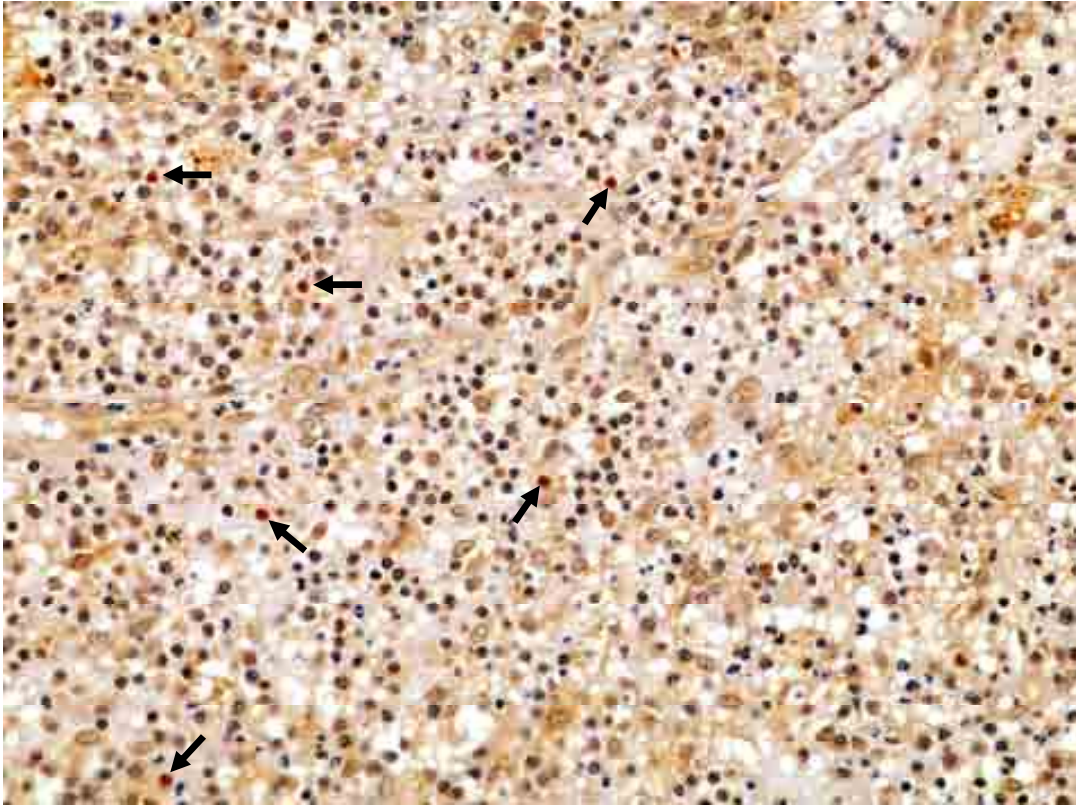
**Figura 9.** Expressão imuno-histoquímica de TGF-β1 em granuloma periapical evidenciada em citoplasma de células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos. Advance (400x).



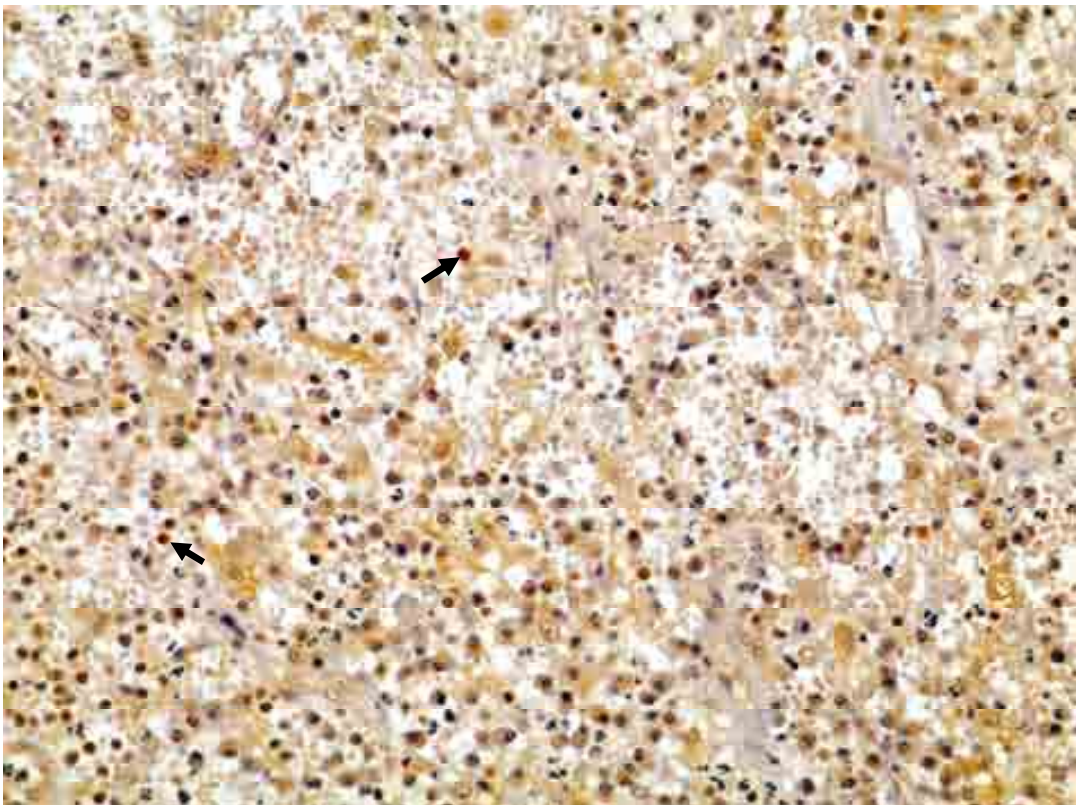
**Figura 10.** Expressão imuno-histoquímica de TGF- $\beta$ 1 em cisto radicular evidenciada em citoplasma de células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos. Advance (400x).



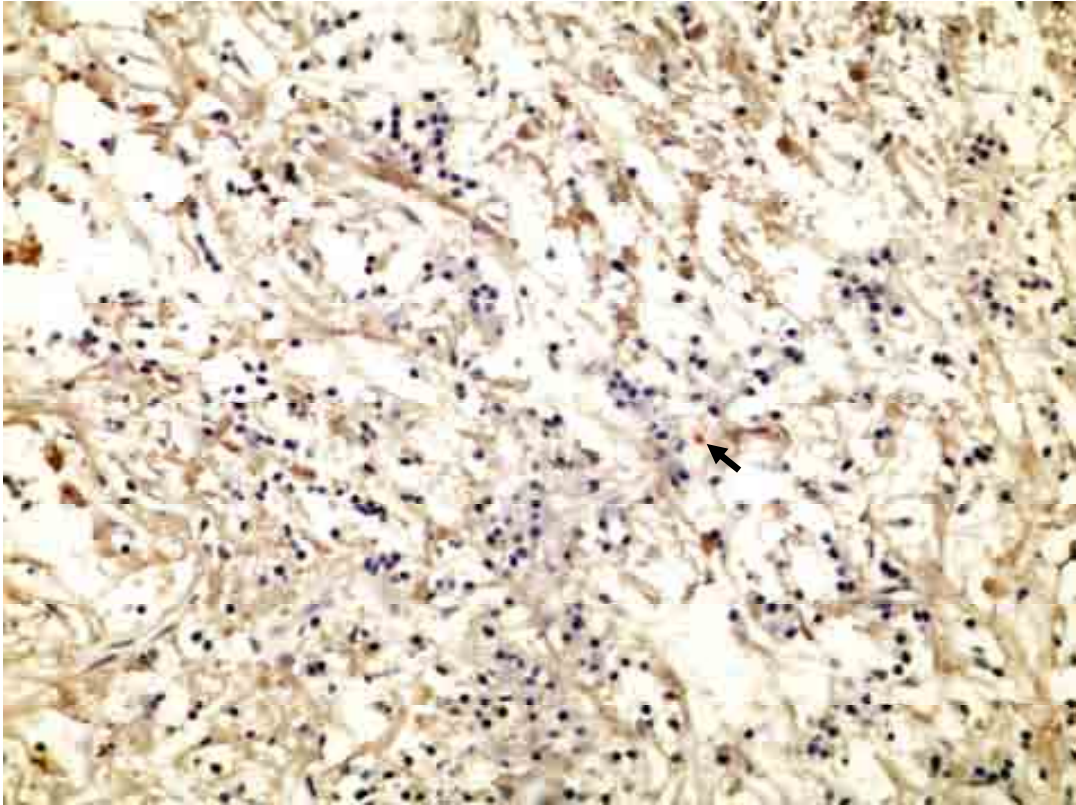
**Figura 11.** Expressão imuno-histoquímica de TGF- $\beta$ 1 em cisto radicular residual evidenciada em citoplasma de células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos. Advance (400x).



**Figura 12.** Expressão imuno-histoquímica do FoxP3 em granulomas periapicais evidenciada no núcleo de linfócitos. Envision (400x).



**Figura 13.** Expressão imuno-histoquímica do FoxP3 em cistos radiculares evidenciada no núcleo de linfócitos. Envision (400x).



**Figura 14.** Expressão imuno-histoquímica do FoxP3 em cistos radiculares residuais evidenciada no núcleo de linfócitos. Envision (400x).

**DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

Lesões periapicais correspondem a condições inflamatórias dos tecidos perirradiculares que são consideradas sequelas diretas de processos infecciosos resultantes da necrose pulpar e conseqüente progressão para a região periapical (ROCHA et al, 2007). Posteriormente, estímulos bacterianos promovem a ativação de mecanismos de defesa tanto da imunidade inata quanto da adquirida, provocando eventos vasculares e celulares, como a liberação pelas células-alvo de mediadores intercelulares, anticorpos humorais e moléculas efetoras para os tecidos periapicais (MEGHJI et al, 1996; NAIR, 1997; MARTON; KISS, 2000). Como conseqüência destes processos, da persistência dos agentes antigênicos e da inabilidade dos mecanismos de defesa do hospedeiro em debelar a infecção, lesões periapicais podem ser desenvolvidas (NAIR, 2006; SCHULZ et al, 2009).

Os GPs representam uma reação de natureza inflamatória crônica desencadeada pela agressão bacteriana na região perirradicular e que se caracteriza pela presença de infiltrado inflamatório constituído principalmente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, além de células polimorfonucleares (NAIR; PAJAROLA; SCHROEDER, 1996; NAIR, 1997; NEVILLE et al, 2009). Como efeito da continuidade do estímulo antigênico e das respostas inflamatórias e imunológicas associadas, restos epiteliais de Malassez derivados de remanescentes da bainha epitelial de Hertwig são estimulados a proliferarem, resultando na formação de uma cavidade cística e desenvolvimento de um CR (MUGLALI et al, 2008; NONAKA et al, 2008). Apesar da intensa investigação e dos avanços já estabelecidos, os mecanismos moleculares envolvidos na formação do tecido de granulação e no crescimento e expansão das lesões periapicais ainda não foram completamente esclarecidos (LEONARDI et al, 2003).

Por se tratarem de estágios diferentes de evolução de um mesmo processo inflamatório, pequenas ilhotas ou brotos de epitélio estratificado pavimentoso originários de restos epiteliais de Malassez podem ser observados em GPs. Tais células epiteliais permaneceram na região do ligamento periodontal após o término da odontogênese e caracterizam o chamado GP epitelizado, considerado uma etapa transitória na transformação de GPs em CRs (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS; LOPES, 2004; NEVILLE et al, 2009). Para evitar possíveis distorções nos resultados, foram excluídos da amostra da presente pesquisa os

casos de GPs que apresentavam qualquer remanescente de epitélio odontogênico disperso no tecido conjuntivo constituinte da lesão. Para os casos de CRs e CRRs, foram incluídos apenas os espécimes que exibissem uma cavidade patológica revestida total ou parcialmente por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado, o qual apresenta subjacente ao mesmo uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso.

GPs e CRs representam lesões osteolíticas muito comuns das regiões oral e perioral, de modo que o estudo das mesmas adquire particular importância na prática odontológica devido a sua alta frequência clínica (LEONARDI et al, 2003; ROCHA et al, 2007). Entretanto, além destas lesões periapicais crônicas mais usualmente encontradas, são descritos também os chamados CRRs. Acredita-se que tais lesões controversas se desenvolvam a partir de remanescentes de CRs que permaneceram após a extração do elemento dentário acometido (WALTON et al, 1996; REGEZZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008).

No entanto, a existência desta entidade patológica foi questionada por Walton (1996), pois para ele faltam casos clínicos longitudinalmente acompanhados que demonstrem que a patologia apical (associada com polpa necrótica) não foi resolvida mesmo com a remoção do irritante após a extração. Além disso, segundo tal autor, na melhor das hipóteses as radiografias exibem lesões radiolúcidas em áreas edêntulas com uma suposição evidente que representam CRs persistentes e biópsias de lesões semelhantes foram diagnosticadas aparentemente por exclusão.

Apesar de serem histopatologicamente semelhantes, CRs e CRRs apresentam possivelmente propriedades bioquímicas diferentes, já que o principal foco de estimulação está ausente nos CRRs. No entanto, quando comparado com outros cistos odontogênicos, pouca atenção tem sido conferida ao CRR, de modo que os trabalhos envolvendo tal entidade patológica ainda permanecem escassos na literatura (MUGLALI et al, 2008).

Por se tratarem de lesões de caráter inflamatório, todos os casos da presente pesquisa foram classificados morfológicamente quanto à intensidade do infiltrado inflamatório para que posteriormente esses dados fossem correlacionados com a imunexpressão das moléculas estudadas. Nesta perspectiva, observou-se que os casos de GPs e CRs examinados apresentaram infiltrado inflamatório intenso (90,0% e 65,0%, respectivamente) ou moderado (10,0% e 35,0%, respectivamente). Por sua vez, a maioria dos casos de CRRs exibiu infiltrado moderado (60,0%), seguido por frequências menores de lesões com infiltrado leve (30,0%) e intenso (10,0%). Estes dados estão de acordo com o que foi relatado em outras pesquisas, embora o número de casos de CRRs classificados como moderadamente inflamados, tenha

sido superior no presente estudo (SUZUKI et al, 2001; TSAI et al, 2004; SUZUKI et al, 2005; SANTOS et al, 2007; NONAKA et al, 2008).

A maior intensidade do infiltrado inflamatório em GPs em relação aos CRs, pode ser decorrente da própria natureza inflamatória e atividade metabólica da lesão, já que representam o estágio inicial do processo infeccioso e por isso, sugere-se que estas lesões possuam uma resposta inflamatória mais intensa em virtude da sua maior atividade. Em relação aos CRRs, presume-se que os principais estímulos antigênicos não estejam mais presentes devido à remoção do agente causador da infecção. Por este motivo, estas lesões são geralmente menos inflamadas quando comparadas com as demais lesões periapicais (MUGLALI et al, 2008).

Os espécimes de CRs e CRRs foram, ainda, avaliados quanto à espessura do revestimento epitelial, pois, segundo alguns autores, o estado do epitélio tem sido sugerido como um parâmetro histológico confiável de atividade biológica e/ou inatividade do crescimento cístico (MOREIRA et al, 2000). Assim como a doença periodontal, as periapicopatias parecem ter padrões cíclicos de evolução, exibindo períodos de atividade intercalados com períodos de quiescência. Como a divisão dos ceratinócitos deve ocorrer durante o crescimento cístico, supõe-se que a espessura do revestimento epitelial poderia indicar a atividade biológica das lesões císticas, de modo que as lesões com epitélio hiperplásico seriam mais ativas do que aquelas revestidas por epitélio atrófico. Desta forma, pesquisas demonstram uma maior proporção de células Th2 em cistos com epitélio hiperplásico, podendo as mesmas estarem relacionadas com o processo de crescimento destas lesões (CURY et al, 1998).

Além disso, a expressão de citocinas e quimiocinas tem sido demonstrada como fortalecida pelas endotoxinas bacterianas (JIANG et al, 1998). Tais endotoxinas foram relatadas como estimulantes da proliferação de ceratinócitos, direta e indiretamente pela estimulação da síntese de citocinas (MEGHJI et al, 1996). Nesta perspectiva, este sistema foi apontado como importante para manter o crescimento epitelial do cisto principalmente após o estabelecimento da cápsula (MUGLALI et al, 2008).

Neste sentido, a análise da espessura do revestimento epitelial nas lesões císticas revelou uma distribuição igualitária de casos de CRs com epitélio atrófico (50,0%) e hiperplásico (50,0%). Esta mesma proporção foi relatada em estudo realizado por Santos et al (2007). Por sua vez, nos CRRs, constatou-se maior frequência de lesões com epitélio atrófico (80,0%) em comparação com as lesões com epitélio hiperplásico (20,0%). Estes achados confirmam as características histopatológicas anteriormente relatadas para os CRRs de que



estas lesões são, em geral, menos inflamadas e possuem epitélio com espessura mais delgada quando comparados com os CRs comuns. Por estas razões, CRRs foram descritos como lesões que apresentam baixo potencial de proliferação epitelial quando comparados com os CRs (SUZUKI et al, 2001).

Apesar de se tratarem de lesões com comportamento clínico comumente indolente, as lesões periapicais podem se apresentar sintomáticas. Tumefação e crescimento expansivo dos ossos maxilares, sintomatologia dolorosa, mobilidade e deslocamento dentários podem ser manifestações observadas em alguns pacientes (NEVILLE et al, 2009). Dentre as 37 lesões que possuíam tais informações disponíveis nas fichas clínicas de biópsia, 21 casos (56,8%) apresentaram sintomatologia presente e 16 casos (43,2%) exibiram ausência de alterações clínicas ou dor. Estes resultados corroboram o verificado em outros estudos, nos quais as lesões sintomáticas também foram mais prevalentes (COLIĆ et al, 2007; COLIĆ et al, 2009a; COLIĆ et al, 2009b; GAZIVODA et al, 2009; BODNER et al, 2011).

Em relação aos seus aspectos imunopatológicos, as lesões periapicais se caracterizam pela exsudação de diversos elementos celulares pertencentes ao sistema imunológico para a região afetada, bem como pela produção de mediadores inflamatórios como as citocinas. Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, macrófagos, mastócitos, eosinófilos, plasmócitos, bem como diversas citocinas foram identificados em quantidades variáveis em modelos experimentais e lesões periapicais humanas (CURY et al, 1998; KABASHIMA et al, 1998; LIN et al, 2000; COLIĆ et al, 2007; MARÇAL et al, 2010).

Dentre os diversos tipos celulares que migram para os tecidos perirradiculares na tentativa de debelar a infecção, a reação inflamatória periapical é estabelecida principalmente por linfócitos T através de respostas Th1, Th2, Th17 e Treg e esta polarização pode modular a progressão da doença e expressão de citocinas que induzem a reabsorção óssea (QUEIROZ-JUNIOR et al, 2010). No entanto, como afirmado por Colić et al (2007), pouco se sabe sobre como é regulado o conjunto de citocinas participantes dos diferentes níveis de desenvolvimento e manutenção de processos inflamatórios crônicos e como o perfil destas citocinas está correlacionado com a composição do infiltrado inflamatório e a apresentação clínica das lesões.

Na superfície das mucosas, células Th17 protegem o hospedeiro contra a infecção, enquanto que células Tregs controlam as respostas imunes e a inflamação desencadeada pela microflora residente (ZHOU et al, 2008). Destarte, a proposta deste estudo foi avaliar a expressão imunohistoquímica das citocinas IL-17 e TGF- $\beta$ 1, bem como do FoxP3, considerado o fator de transcrição mestre da linhagem de células Tregs em GPs, CRs e CRRs.

A IL-17 consiste em uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por células Th17 e que pode induzir respostas inflamatórias, fornecer suporte às respostas imunes (Th1) e estimular a reabsorção óssea, quando atua sinergicamente com o RANK e RANKL. Como estas funções biológicas são de fundamental importância para a etiopatogenia tanto da doença periodontal como das lesões periapicais crônicas, a participação desta citocina foi investigada e comprovada em ambas as lesões (TAKAHASHI et al, 2005; OSEKO et al, 2009; XIONG; WEI; PENG, 2009).

Em estudos realizados com modelos experimentais e humanos, a presença da IL-17 foi associada com a exacerbação da resposta inflamatória, com um elevado número de neutrófilos e reabsorção óssea (COLIĆ et al, 2007; XIONG; WEI; PENG, 2009). Especula-se que a IL-17 pode exercer efeitos tanto de proteção quanto de destruição ósseas na iniciação e desenvolvimento das lesões periapicais. Esta citocina poderia ser um dos fatores responsáveis por estimular a expressão de efetores inflamatórios, sendo a maioria destes capazes de exercer impacto sobre o metabolismo ósseo, promovendo a osteoclastogênese. Além disso, a IL-17 participa do recrutamento e ativação de neutrófilos, podendo desempenhar um papel protetor na prevenção contra a perda óssea alveolar estimulada pela infecção nas lesões periapicais (MARÇAL et al, 2010)

No que tange à análise da imunoexpressão da IL-17 em relação às três lesões periapicais estudadas, o escore 3 foi predominante em GPs, CRs e CRRs (75,0%, 55,0% e 50,0%, respectivamente), seguido pelo escore 4 em GPs e CRs (20,0% e 35,0%, respectivamente) e pelo 2 nos casos de CRRs (30,0%). Deste modo, observou-se uma imunorreatividade relativamente semelhante para a IL-17 entre as três lesões pesquisadas, de modo que a mediana observada para as mesmas foi igual (3,00), não sendo verificadas diferenças estatisticamente significativas entre elas. Estes resultados foram discordantes aos observados por Marçal et al (2010), em cujo estudo verificaram uma maior imunoexpressão desta citocina nos casos de GPs quando comparados com os CRs.

Segundo Kraychete, Calasans e Valente (2006), é possível que em processos inflamatórios agudos ou crônicos, as citocinas induzam o organismo a produzir uma variedade de respostas imunológicas na tentativa de acelerar as reações enzimáticas defensivas, reduzir a replicação de patógenos, aumentar a proliferação de células imunes, imobilizar a área que foi lesada e conservar energia. Assim, estas citocinas pró-inflamatórias podem ser reconhecidas e utilizadas para desencadear diversas reações intracelulares.

Deste modo, a elevada imunoexpressão da IL-17, uma citocina pró-inflamatória, em GPs e CRs pode ser decorrente da fonte constante de estimulação pelas toxinas bacterianas

liberadas no canal radicular infectado e também pela maior atividade proliferativa destas lesões (MUGLALI et al, 2008). Quanto aos CRRs, a forte imunopositividade para a IL-17 pode sugerir que apesar do irritante inflamatório e principal agente causador da estimulação antigênica estar ausente nestas lesões, outras fontes secundárias podem estar envolvidas com os aspectos imunopatogênicos das mesmas.

Embora possuam características de cronicidade, GPs, CRs e CRRs podem sofrer agudização geralmente associada com a reinfecção da lesão. Quando isto ocorre, tais lesões periapicais passam a adquirir aspectos de processos inflamatórios agudos com abundância de células inflamatórias principalmente neutrófilos polimorfonucleares (TAKAHASHI et al, 1996)

High e Hirschmann (1988) indicam que após um período de latência que varia de meses a anos, evidências de inflamação aguda podem se desenvolver em sítios intra-ósseos, aparentemente sem relação com inflamação dentária ou traumas externos. Possíveis explicações são: infecção a partir da disseminação de bactérias hematogênicas; infarto ou necrose focal, devido à fibrose densa e reduzida vascularização presentes em muitos cistos maduros; e mecanismos imunológicos.

Corroborando esta concepção, embora a maioria não apresente qualquer evidência de crescimento, lesões de CRRs podem aumentar de tamanho, crescendo ativamente anos após a extração do elemento dentário relacionado ter sido realizada. Acredita-se que estes processos sejam mais comuns especialmente em lesões que atingiram uma posição mais superficial devido ao seu crescimento, se tornando mais susceptíveis a fatores como infecções secundárias ou irritação traumática, por exemplo, por uma prótese mal adaptada (OEHLERS, 1970; HIGH; HIRSCHMANN, 1986). Deste modo, autores indicam que o CR pode persistir, já que o grau de resolução, se houver, não é considerado suficiente para curar estas lesões (MUGLALI et al, 2008). Deste modo, levantamos a hipótese de que alguns CRRs representariam lesões refratárias, nas quais o estímulo antigênico pode permanecer, promovendo a manutenção destas lesões e sendo capaz de induzir células Th17 a secretarem a IL-17.

Além disso, estudos evidenciaram que, embora em menor escala quando comparados com os CRs, os CRRs continham também citocinas como a IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$ , além de quimiocinas. Tais mediadores foram implicados como participantes da expansão cística e por isso, postulou-se que os CRRs possuem um certo grau de potencial expansivo (MUGLALI et al, 2008).

Em relação à análise da imunoposição da IL-17 quanto a intensidade do infiltrado inflamatório, observou-se que os escores 3 e 4 foram predominantes nos casos que apresentaram infiltrado moderado (53,3% e 40,0%, respectivamente) e intenso (68,8% e 21,9% respectivamente). Nas lesões com infiltrado inflamatório leve, os escores 2 e 3 foram os mais frequentes (66,7% e 33,3%), de modo que nenhuma lesão apresentou escore 4.

Santos et al (2007) acreditam que a intensidade do infiltrado inflamatório não está relacionada apenas com um aumento na quantidade de estímulos antigênicos, mas também com uma resposta exacerbada dos mecanismos de defesa do organismo. Desta forma, estes resultados suportam o sedimentado na literatura de que a IL-17 desempenha importante função na exacerbação da inflamação (COLIĆ et al, 2007), já que as lesões com infiltrado moderado/severo representadas pelos GPs e CRs, apresentaram também forte imunomarcção para a IL-17. No entanto, assim como relatado por outros autores não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre a imunoposição desta citocina e a intensidade do infiltrado inflamatório (SUZUKI et al, 2001; SANTOS et al, 2007).

No que se refere à análise da imunopositividade para a IL-17 em relação à espessura do revestimento epitelial das lesões císticas, os casos com epitélio atrófico demonstraram distribuição relativamente semelhante entre os escores 3, 4 e 2 (38,9%; 33,3%; 27,8%, respectivamente). Por sua vez, nas lesões com epitélio hiperplásico, verificou-se predomínio dos escores 3 e 4 (75,0%; 25,0%, respectivamente). Estes resultados confirmam os achados encontrados em outros estudos, nos quais se verificou uma imunopositividade moderada/intensa nos casos de cistos com epitélio hiperplásico, embora não tenha sido evidenciada diferença estatisticamente significativa (CURY et al, 1998; MOREIRA et al, 2000; SUZUKI et al, 2001; SANTOS et al, 2007). Nesta perspectiva, Cury et al (1998) presumiram que os cistos com revestimento epitelial hiperplásico possuem comportamento mais ativo do que aquelas que apresentam epitélio atrófico e se encontravam em um estado de atividade quiescente.

Além disso, diferentemente do observado em outros estudos, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre a imunoposição da IL-17 e a sintomatologia das lesões (COLIĆ et al, 2007; COLIĆ et al, 2009a). Colić et al (2009a) demonstraram que lesões sintomáticas se caracterizavam por um infiltrado neutrofílico, elevada produção de IL-17, correlação positiva entre IL-17 e IFN- $\gamma$ , mas não entre a produção de IL-17 e IL-23, de modo que a maioria das células IL17<sup>+</sup> coexpressaram IFN- $\gamma$ . Por sua vez, as lesões assintomáticas apresentaram-se fenotipicamente heterogêneas.

A ausência de diferenças na imunexpressão da IL-17 entre lesões sintomáticas e assintomáticas evidenciada no presente estudo pode ser decorrente do fato de que nós não tivemos o acompanhamento clínico desses pacientes, uma vez que todos os dados relativos a estes aspectos foram obtidos a partir das fichas clínicas das biópsias. Desta forma, dentre os 50 casos pesquisados, 13 lesões (26,0%) não apresentavam tais informações disponíveis nas fichas. Assim, como não seria possível termos certeza quanto a sintomatologia destas lesões cujos dados foram negligenciados pelo cirurgião-dentista, todos estes casos foram excluídos dos testes estatísticos no tocante a esta variável clínica.

No que se refere ao TGF- $\beta$ , o mesmo corresponde a uma potente citocina com funções regulatórias e que exerce efeitos variados sobre células hematopoiéticas. No sistema imunológico, a função fundamental do TGF- $\beta$  é manter a tolerância através do controle da proliferação, diferenciação e sobrevivência de linfócitos. Além disso, o TGF- $\beta$  controla a iniciação e resolução de respostas inflamatórias através da regulação da quimiotaxia, ativação e sobrevivência não apenas de linfócitos, mas também de células NK, células dendríticas, macrófagos, mastócitos e granulócitos. Tais atividades regulatórias do TGF- $\beta$  são moduladas pelo estado de diferenciação celular e pela presença de citocinas inflamatórias e moléculas co-estimulatórias (LI et al, 2006)

A participação do TGF- $\beta$  no desenvolvimento, manutenção e indução de células Tregs e Th17 têm sido alvo de pesquisas recentes. Esta citocina participa do processo de diferenciação de células Tregs adaptativas e Th17 efectoras, enquanto que a produção concomitante de IL-6 contribui para o desenvolvimento de células Th17, inibindo o processo de diferenciação para a linhagem de células Tregs (ROMAGNANI, 2006).

Desta forma, o TGF- $\beta$  tem sido identificado em algumas doenças osteolíticas, como osteoartrites, artrite reumatóide, doença periodontal e lesões periapicais (KABASHIMA et al, 1998; LIN et al, 2000). Estudos indicam que o TGF- $\beta$  possui atividade imunossupressora e promotora da cicatrização tecidual, de modo que quantidades mensuráveis desta citocina foram recuperadas de tecidos inflamatórios periapicais de dentes cujo tratamento endodôntico tivesse falhado (DANIN et al, 2000; COLIĆ et al, 2007).

No presente estudo, a análise da expressão imunohistoquímica do TGF- $\beta$ 1 nas três lesões pesquisadas revelou diferença estatisticamente significativa, apresentando os GPs e CRs maior imunorreatividade quando comparados com os CRRs, de modo que as medianas encontradas foram de 3,00; 3,00; e 1,50, respectivamente. Estes achados foram considerados em consonância com o observado em pesquisas anteriores (TYLER et al, 1999; MARÇAL et

al, 2010; TEIXEIRA-SALUM et al, 2010). Fukada et al (2009), no entanto, relataram uma expressão do TGF- $\beta$ 1 considerada semelhante em ambas as lesões.

A razão dos níveis elevados do TGF- $\beta$  em lesões periapicais ainda não foi totalmente esclarecida. Entretanto, acredita-se que seja decorrente da presença de grandes quantidades de células produtoras desta citocina, visto que diferentes tipos celulares, como macrófagos, fibroblastos, eosinófilos, osteoclastos, osteoblastos, além de células Tregs, parecem ser capazes de sintetizá-la (TYLER et al, 1999; DANIN et al, 2000; TEIXEIRA-SALUM et al, 2010). Outrossim, foi sugerido que a participação do TGF- $\beta$  seja de fundamental importância no processo de cicatrização do periápice nas periapicopatias, já que esta citocina parece inibir a atividade de reabsorção óssea, além de promover remodelação e reparo tecidual. No que se refere ao processo de reparo ósseo, estudos indicam que o TGF- $\beta$  contribua com o mesmo através da estimulação da síntese de colágeno, neovascularização e proliferação de fibroblastos. (TYLER et al, 1999). Deste modo, a alta concentração do TGF- $\beta$  pode representar um fenômeno local compensatório que acompanha o processo de reabsorção óssea fundamental para a progressão destas lesões. Após a completa remoção dos agentes agressores, o TGF- $\beta$  pode, ainda, induzir a reparação óssea durante o processo de regressão da lesão (TEIXEIRA-SALUM et al, 2010).

Em estudo realizado com animais experimentais, Lin et al (2000) observaram que o número de macrófagos TGF- $\beta$ 1-positivos diminuiu gradualmente de quantidade quando o crescimento da lesão cessou, estando presentes principalmente na fase ativa das lesões periapicais. Por sua vez, os osteoblastos apresentaram imunomarcagem apenas durante o estágio crônico das mesmas. Desta forma, os autores apontaram a participação dos macrófagos na iniciação e desenvolvimento das periapicopatias, bem como sugeriram a participação do TGF- $\beta$ 1 na reabsorção e formação óssea reparativa.

Os resultados da presente pesquisa demonstram que a expressão imuno-histoquímica do TGF- $\beta$ 1 não está correlacionada com a intensidade do infiltrado inflamatório. Contudo, pode-se verificar que as lesões com infiltrado discreto exibiram predomínio do escore 1 (66,7%), enquanto que as lesões moderada ou intensamente inflamadas apresentaram predominância do escore 3 (53,3%; 56,3%, respectivamente). Estes resultados confirmam a possível participação do TGF- $\beta$ 1 no processo de estabilização das lesões periapicais através de seus efeitos imunossupressores e reguladores da inflamação, já que foi verificada maior imunomarcagem para esta citocina nas lesões mais inflamadas (DANIN et al, 2000).

De forma semelhante, não foi observada diferença estatística no que tange à imunomarcagem do TGF- $\beta$ 1 em relação à espessura do revestimento epitelial. Entretanto,

considerando as medianas encontradas para os dois tipos de epitélio císticos, a variante atrófica obteve mediana discretamente inferior à observada para a hiperplásica (2,50 e 3,00; respectivamente). Estes achados comprovam o observado por alguns autores de que os efeitos regulatórios do TGF- $\beta$ 1 estariam presentes tanto nos períodos de iniciação como de estabilização das lesões periapicais (LIN et al, 2000).

Além disso, assim como evidenciado por outros autores, foi observada ausência de significância estatística entre a expressão imuno-histoquímica do TGF- $\beta$ 1 quanto à sintomatologia das lesões. Estes resultados podem ser decorrentes do fato de que lesões sintomáticas se caracterizam por uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias. Neste contexto, citocinas imunorregulatórias como o TGF- $\beta$  são reconhecidamente mais importantes para a supressão da inflamação em lesões assintomáticas, sendo nestes casos mais potentes seus efeitos (GAZIVODA et al, 2009).

Como comentado anteriormente, o TGF- $\beta$  medeia a regulação da diferenciação e função de células Th17 e Treg, de modo que seu papel como principal indutor do fenótipo de células Tregs tem sido cada vez mais aceito. O fator de transcrição FoxP3 é essencial para o desenvolvimento e função das células Tregs, sendo predominantemente expresso neste tipo celular (CHEN et al, 2011). Tais células que expressam o FoxP3 estão naturalmente presentes no sistema imunológico, sendo consideradas indispensáveis para a manutenção da tolerância imunológica e homeostase corporal (SAKAGUCHI et al, 2010). Deste modo, as células Tregs são consideradas de fundamental importância na regulação da resposta imunológica, incluindo o controle dos mecanismos de defesa contra a infecção (COLIĆ et al, 2009b). Tais tipos celulares participam do controle de células T auto-reativas que escaparam da seleção negativa, além de modularem respostas de células T efectoras excessivas contra antígenos exógenos (ROMAGNANI, 2006). Não obstante ao seu papel na prevenção da autoimunidade, as células Tregs regulam a imunidade a infecções de origem viral, bacteriana ou parasitária, bem como podem promover respostas imunes direcionadas para tumores ou tecido transplantado (CAMPBELL; ZIEGLER, 2007).

Em nosso estudo, a análise da imunopositividade dos linfócitos para o FoxP3 revelou diferenças estatisticamente significativas, de modo que os GPs apresentaram média superior de linfócitos FoxP3-positivos ( $3,05 \pm 2,49$ ), seguidos pelos CRs ( $1,36 \pm 1,20$ ) e, por fim, pelos CRRs ( $0,32 \pm 0,42$ ). Estes resultados estão em consonância com os observados por Fukada et al (2009) que também detectaram a expressão do gene FoxP3 em lesões periapicais humanas, apresentando os GPs maior expressão deste fator de transcrição quando comparados com os

CRs. Por sua vez, Marçal et al (2010) observaram diferenças na expressão imunohistoquímica apenas entre GPs e CRs e o grupo controle, mas não houve correlação entre as lesões.

A presença de células Tregs foi investigada e comprovada em lesões periapicais, de modo que foi postulado que as mesmas poderiam infiltrar tais lesões para inibir a proliferação de células T (ALSHWAIMI, et al, 2009; COLIĆ et al, 2009a; COLIĆ et al, 2009b; FUKADA et al, 2009). Além disso, apesar de não se ter total conhecimento sobre os mecanismos que promovem o desenvolvimento das periapicopatias humanas, sugere-se que o desequilíbrio da atividade de células osteoclásticas e pertencentes ao sistema imunológico em GPs e CRs parece ser criticamente regulada por células Tregs (FUKADA et al, 2009). A quantidade crescente de linfócitos imunorreativos dos casos de CRRs para os de CRs e destes para os de GPs pode ser considerada proporcional à atividade metabólica destas lesões periapicais pesquisadas.

Números elevados de células Tregs foram identificados também em espécimes de periodontites crônicas e gengivites, de modo que as primeiras lesões exibiram maior imunorreatividade. Especula-se que em lesões de gengivite as células Tregs controlam os mecanismos imunopatológicos para evitar a destruição do tecido periodontal. Por sua vez, nas periodontites que representam lesões já estabelecidas, tais elementos celulares poderiam ser recrutados na tentativa de suprimir a destruição tecidual através de supostos mecanismos autoimunes por intermédio de um sistema de feedback negativo (NAKAJIMA et al, 2005).

A análise da imunexpressão do FoxP3 quanto à intensidade do infiltrado inflamatório também evidenciou correlação positiva, de modo que as lesões com infiltrado intenso revelaram maior média de células imunomarcadas ( $2,35 \pm 2,25$ ), seguido pelos casos moderadamente inflamados ( $1,04 \pm 1,22$ ) e pelos com infiltrado discreto ( $0,13 \pm 0,11$ ). Assim como verificado em relação à imunorreatividade do TGF- $\beta$ 1, sugere-se que as células Tregs poderiam desempenhar suas funções regulatórias, controlando os processos imuno-inflamatórios presentes nas periapicopatias. Destarte, uma maior quantidade deste tipo de células estaria presente nas lesões mais intensamente inflamadas, provavelmente na tentativa de regular os mecanismos imunológicos desencadeados nas mesmas (COLIĆ et al, 2009b).

No que se refere à análise da imunopositividade dos linfócitos FoxP3-positivos quanto à espessura do revestimento epitelial, verificou-se que as lesões císticas com epitélio hiperplásico apresentaram mediana de células imunorreativas significativamente maior (1,30) do que a encontrada nos cistos com epitélio atrófico (0,40). Moreira et al (2000) afirmaram



que apesar da presença de antígenos capazes de induzir respostas imunológicas, proliferação epitelial e reabsorção óssea; em lesões cujo epitélio encontra-se atrófico, o crescimento cístico não foi relatado. Deste modo, efetores imunossupressores ou eventos apoptóticos podem atuar supostamente nestas fases regulando o crescimento cístico (MOREIRA et al, 2000; LOYOLA et al, 2005).

Corroborando o que foi observado em outras pesquisas, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi evidenciada na frequência de linfócitos FoxP3-positivos entre as lesões sintomáticas e assintomáticas. Desta forma, como a frequência das células Tregs não se correlaciona com a apresentação clínica das lesões periapicais, não está totalmente sedimentado na literatura se sua função no tecido periapical está associada com a exacerbação da infecção ou com a manutenção da cronicidade da inflamação (COLIĆ et al, 2009b).

Os resultados do presente estudo demonstraram ainda haver forte correlação positiva entre a quantidade de linfócitos FoxP3-positivos e a imunoexpressão de TGF- $\beta$ 1 ( $r = 0,755$ ;  $p < 0,001$ ) nos casos de GPs. Estes resultados estão em consonância com os achados por outros autores (NAKAJIMA et al, 2005; COLIĆ et al, 2009a; COLIĆ et al, 2009b) e confirmam as interações já sedimentadas na literatura, de que níveis elevados do TGF- $\beta$  no microambiente tecidual induzem a diferenciação de células Tregs FoxP3<sup>+</sup> (ZHOU et al, 2008). Diante da expressão conjunta do TGF- $\beta$ 1 e FoxP3, pode-se sugerir que a população de células Tregs seja maior em GPs quando comparada com CRs e CRRs (FUKADA et al, 2009).

Nos GPs foi observada, também, moderada correlação positiva entre as imunoexpressões da IL-17 e TGF- $\beta$ 1 ( $r = 0,503$ ;  $p = 0,024$ ). Tal correlação estatisticamente significativa ainda não havia sido identificada em lesões periapicais.

A proximidade com os estímulos antigênicos bacterianos e a alta permeabilidade do epitélio não-ceratinizado das lesões periapicais císticas, facilitam que respostas inflamatórias sejam desencadeadas. Sinais substanciais ativam, então, várias populações celulares na região e conduzem, conseqüentemente, a atividade tanto de inibidores quanto de ativadores (TSAI et al, 2004). Deste modo, sugere-se que esta correlação entre as imunoexpressões da IL-17 e TGF- $\beta$  seja decorrente da participação de citocinas tanto pró-inflamatórias como imunorregulatórias na patogenia das periapicopatias (COLIĆ et al, 2009a).

Diante dos resultados apresentados, torna-se evidente a complexidade dos mecanismos imunopatogênicos relacionados com as lesões periapicais. Destarte, uma grande variedade de respostas imunológicas são desencadeadas nos tecidos perirradiculares, de modo que diversas interações celulares podem ser estabelecidas. Células Th17 e Treg participam desse processo

exercendo efeitos modulatórios opostos, porém que podem estar presentes simultaneamente. Além das moléculas estudadas, diversas outras participam das reações imunológicas que ocorrem nos tecidos periapicais, de modo que outros estudos devem ser conduzidos para que um melhor entendimento sobre a etiopatogenia destas lesões seja alcançado.

**CONCLUSÕES**

## 7. CONCLUSÕES

Baseado nos achados do presente estudo pode-se concluir que:

- A expressão imuno-histoquímica da IL-17 foi observada em todos os casos de GPs, CRs e CRRs, sugerindo que as células Th17 participam da patogenia das lesões periapicais secretando esta citocina durante os três estágios do processo inflamatório, bem como nos diferentes graus de intensidade do infiltrado inflamatório, tipos de revestimento epitelial cístico e independente da sintomatologia das lesões.
- A maior imunomarcação para o TGF- $\beta$ 1 dos casos de GPs e CRs quando comparada a observada nos CRRs, suscita que estas lesões, por representarem estágios de inflamação primária ativa, apresentam mecanismos imunorregulatórios compensatórios à presença da mesma. Entretanto, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre a expressão imuno-histoquímica do TGF- $\beta$ 1 e a intensidade do infiltrado inflamatório, espessura do epitélio e sintomatologia das lesões.
- A frequência de linfócitos FoxP3-positivos revelou-se maior em ordem decrescente do GP para o CRR, indicando a presença de maior quantidade de células Tregs nas fases iniciais do processo inflamatório, assim como nas lesões mais intensamente inflamadas e nos cistos com revestimento epitelial hiperplásico, ou seja, em crescimento ativo. No que se refere à sintomatologia das lesões, não foram observadas diferenças entre as lesões sintomáticas e assintomáticas.
- A forte correlação positiva entre a imunexpressão do TGF- $\beta$ 1 e do FoxP3 nos casos de GP indica a já suposta e indispensável presença desta citocina no microambiente tecidual para diferenciação das células Tregs nesta etapa do processo inflamatório.
- Nos casos de GPs, foi identificada ainda, moderada correlação positiva entre a imunexpressão da IL-17 e do TGF- $\beta$ 1, sugerindo a participação de citocinas tanto pró-inflamatórias como imunorregulatórias na patogenia das lesões periapicais e indicando que ambas não exercem inibição mútua apesar de seus efeitos moduladores opostos.



## REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Elsevier, 574 p., 2008
- AGGARWAL, S.; et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. **J Biol Chem**. v. 278, n. 3, p. 1910–4, 2003.
- AGGARWAL, S.; GURNEY, A.L. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. **J Leukoc Biol**. v. 71, n. 1, p. 1-8, 2002.
- AGGARWAL, V.; LOGANI, A.; SHAH, N. The Evaluation of Computed Tomography Scans and Ultrasounds in the Differential Diagnosis of Periapical Lesions. **J Endod**. v. 34, n. 11, p. 1312-5, 2008
- AKAMINE, A.; et al. Immunohistochemical examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions. **Endod Dent Traumatol**. v. 10, n. 3, p. 121-128, 1994.
- ALLAN, S.E.; et al. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4<sup>+</sup> Tregs. **J Clin Invest**. v. 115, n. 11, p. 3276–3284, 2005.
- ALSHWAIMI, E.; et al. Regulatory T cells in Mouse Periapical Lesions. **J Endod**. v. 35, n. 9, p. 1229–1233, 2009.
- ASANO, M.; et al. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. **J Exp Med**. v. 184, n. 2, p. 387–396, 1996.
- AZAMBUJA, T.W.F.; BERCINI, F.; ALANO, F. Cirurgia paraendodôntica: revisão da literatura e apresentação de casos clínico-cirúrgicos. **Rev Fac Odontol Porto Alegre**. v. 47, n. 1, p. 24-29, 2006.
- BAECHER-ALLAN, C.; HAFLER, D.A. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. **Immunol Rev**. v. 212, n. 1, p. 203–216, 2006.
- BAECHER-ALLAN, C.; VIGLIETTA, V.; HAFLER, D.A. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. **Semin Immunol**. v. 16, n. 2, p. 89–98, 2004.
- BECCONSALL-RYAN, K.; TONG, D.; LOVE, R.M. Radiolucent inflammatory jaw lesions: a twenty-year analysis. **Int Endod J**. v. 43, n. 10, p. 859–865, 2010.
- BENNETT, C.L.; et al. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. **Nat Genet**. v. 27, n. 1, p. 20-21, 2001.
- BETTELLI, E; et al. Induction and effector functions of T(H) 17 cells. **Nature**. v. 453, n. 7198, p. 1051–7, 2008.

- BODNER, L. Cystic lesions of the jaws in children. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol.** v. 62, n. 1, p. 25–29, 2002.
- BODNER, L; et al. Cystic lesions of the jaws in edentulous patients: analysis of 27 cases. **Br J Oral Maxillofac Surg.** v. 49, n. 8, p. 643-6, 2011.
- BOFFANO, P.; GALLESIO, C. Exposed Inferior Alveolar Neurovascular Bundle During Surgical Removal of a Residual Cyst. **J Craniofac Surg.** v. 21, n. 1, p. 270-3, 2010.
- BRUNETTE, D.M. Cholera toxin and dibutyl cyclic-AMP stimulate the growth of epithelial cells derived from epithelial cell rests from porcine periodontal ligament. **Arch Oral Biol.** v. 29, n. 4, p. 303–9, 1984.
- BRUNKOW, M.E.; et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nat Genet.** v. 27, n. 1, p. 68–73, 2001.
- CAMPBELL, D.J.; ZIEGLER, S.F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. **Nat Rev Immunol.** v. 7, n. 4, p. 305-10, 2007.
- CARLSSON, P.; MAHLAPUU, M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. **Dev Biol.** v. 250, n. 1, p. 1–23, 2002.
- CHANG, K-M.; et al Epidermal growth factor in gingival crevicular fluid and its binding capacity in inflamed and noninflamed human gingiva. **Arch Oral Biol.** v. 41, n. p. 719 –24, 1996.
- CHEDID, M.; et al. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. **J Biol Chem.** v. 269, n. 14, p. 10753–7, 1994.
- CHEN, Z.; et al. FOXP3 and ROR $\gamma$ t: Transcriptional regulation of Treg and Th17. **Int Immunopharmacol.** v. 11, n. 5, p. 536–542, 2011.
- COLIĆ, M.; et al. Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. **Eur J Oral Sci.** v. 115, n. 4, p. 315–20, 2007.
- COLIĆ, M.; et al. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. **Mol Immunol.** v. 47, n. 1, p. 101-13, 2009a.
- COLIĆ, M.; et al. Regulatory T-cells in periapical lesions. **J Dent Res.** v. 88, n. 11, p. 997-1002, 2009b.
- CUROTTO DE LAFAILLE, M.A.; LAFAILLE, J.J. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? **Immunity.** v. 30, n. 5, p. 626–635, 2009.
- CURY, V.C.; et al. Immunohistochemical study of apical periodontal cysts. **J Endod.** v. 24, n.1, p. 36–7, 1998.
- DANIN, J.; et al. Cytokines in periapical lesions: The effect of lineolid treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 96, n. 4, p. 492–498, 2003.

DANIN, J.; et al. Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factorbeta<sub>1</sub> in chronic periapical lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 90, n. 4, p. 514-7, 2000.

DERYNCK, R.; ZHANG, Y.E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signaling. **Nature.** v. 425, n. 6958, p. 577-84, 2003.

DIMITROULIS, G.; CURTIN, J. Massive residual dental cyst: Case report. **Aust Dent J.** v. 43, n. 4, p. 234-7, 1998.

DONG, C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. **Nat Rev Immunol,** v. 6, n. 4, p. 329–33, 2006.

FONTENOT, J.D.; RUDENSKY, A.Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nat Immunol.** v. 6, n. 4, p. 331–337, 2005.

FOSSIEZ, F.; et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **J Exp Med.** v. 183, n. 6, p. 2593-603, 1996.

FUKADA, S.Y.; et al. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. **Oral Microbiol Immunol.** v. 24, n. 1, p. 25–31, 2009.

GAFFEN, S.L.; et al. The IL-17 cytokine family. **Vitam Horm.** v. 74, p. 255– 82, 2006.

GAO, Z.; FLAITS, C.M.; MACKENZIE, I.C. Expression of keratinocyte growth factor in periapical lesions. **J Dent Res.** v. 75, n. 9, p. 1658-63, 1996.

GAZIVODA, D.; et al. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. **J Oral Pathol Med.** v. 38, n. 7, p. 605–611, 2009.

GROSSMAN, R.M.; et al. Interleukin-6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. **Proc Nat Acad Sci U S A.** v. 86, n. 16, p. 6367–71, 1989.

GROSSMANN, S.M.; MACHADO, V.C.; XAVIER, G.M. Demographic profile of odontogenic and selected nonodontogenic cysts in a Brazilian population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 104, n. 6, p. e35-e41, 2007.

GUPTA, S.; SHANG, W.; SUN, Z. Mechanisms regulating the development and function of natural regulatory T cells. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz).** v. 56, n. 2, p. 85-102, 2008.

HAIQI, H.; YONG, Z.; YI, L. Transcriptional regulation of Foxp3 in regulatory T cells. **Immunobiology.** v. 216, n. 6, p. 678–685, 2011.



- HAMA, S.; et al. Co-production of vascular endothelial cadherin and inducible nitric oxide synthase by endothelial cells in periapical granuloma. **Int Endod J.** v. 39, n. 3, p. 179-84, 2006.
- HIGH, A.S.; HIRSCHMANN, P.N. Age changes in residual radicular cysts. **J Oral Pathol.** v. 15, n. 10, p. 524-8, 1986.
- HIGH, A.S.; HIRSCHMANN, P.N. Symptomatic residual radicular cysts. **J Oral Pathol.** v. 17, n. 2, p. 70-72, 1988.
- HÖFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B.; SALMON, C.R. Imunopatologia da polpa. In: HÖFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. **Imunologia para Odontologia.** 1. ed. Porto Alegre. Artmed, 2006, cap.19. p. 287-302.
- HOLM, T.L.; NIELSEN, J.; CLAESSION, M.H. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. I. Phenotype and physiology. **APMIS.** v. 112, n. 10, p. 629-641, 2004.
- IATROU, I; et al. Intraosseous cystic lesions of the jaws in children: A retrospective analysis of 47 consecutive cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 107, n. 4, p. 485-492, 2009.
- IRWIN, C.R.; SCHOR, S.L.; FERGUSON, M.W. Expression of EGF-receptors on epithelial and stromal cells of normal and inflamed gingiva. **J Periodont Res.** v. 26, n. 5, p. 388-94, 1991.
- IVANOV, I.I.; et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell.** v. 126, n. 6, p. 1121-33, 2006.
- JANEWAY, C.A.; et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença.** 6. ed. São Paulo: Artmed, 2007. 824p
- JIANG, Y.; et al. Endodontic pathogens stimulate monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in mononuclear cells. **Int Endod J.** v. 24, n. 2, p. 86-90, 1998.
- JONES, A.V.; CRAIG, G.T.; FRANKLIN, C.D. Range and demographics of odontogenic cysts diagnosed in a UK population over a 30-year period. **J Oral Pathol Med.** v. 35, n. 8, p. 500-7, 2006.
- JONULEIT, H.; et al. Identification and functional characterization of human CD4+CD25+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. **J Exp Med.** v. 193, n. 11, p. 1285-1294, 2001.
- KABASHIMA, H.; et al. Interferon-gamma-producing cells and inducible nitric oxide synthase-producing cells in periapical granulomas. **J Oral Pathol Med.** v. 27, n. 3, p. 95-100, 1998.
- KAWASHIMA, N.; STASHENKO, P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. **Arch Oral Biol.** v. 44, n. 1, p. 55-66, 1999.
- KRAYCHETE, D.C.; CALASANS, M.T.A.; VALENTE, C.M.L. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. **Rev Bras Reumatol,** v. 46, n.3, p. 199-206, 2006.

- KOSMACZEWSKA, A.; et al. The significance of Treg cells in defective tumor immunity. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**. v. 56, n. 3, p. 181–191, 2008.
- KRAMER, I.R.; PINDBORG, J.J.; SHEAR, M. The WHO histological typing of odontogenic tumours; a commentary on the second edition. **Cancer**. v.70, n.12, 1992.
- LEDESMA-MONTES, C.; HERNANDEZ-GUERRERO, J.C.; GARCES-ORTIZ, M. Clinico-pathologic study of odontogenic cysts in a Mexican sample population. **Arch Med Res**. v. 31, n. 4, p. 373-6, 2000.
- LEIDEN, J.M. Transcriptional regulation of T cell receptor genes. **Annu Rev Immunol**. v. 11, p. 539–570, 1993.
- LEONARDI, R.; et al. Detection of Vascular Endothelial Growth Factor/ Vascular Permeability Factor in Periapical Lesions. **J Endod**. v. 29, n. 3, p. 180-3, 2003.
- LETTERIO, J.J.; ROBERTS, A.B. Regulation of immune responses by TGF- $\beta$ . **Annu Rev Immunol**. v. 16, p. 137–161, 1998.
- LI, T.J.; BROWNE, R.M.; MATHEWS, J.B. Expression of epidermal growth factor receptors by odontogenic jaw cyst. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**. v. 423, n. 2, p. 137–44, 1993.
- LI, M.O.; et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. **Annu Rev Immunol**. v. 24, p. 99-146, 2006.
- LIGHVANI, A.A.; et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 98, n. 26, p. 15137–15142, 2001.
- LIN, L.M.; HUANG, G.T.J.; ROSENBERG, P.A. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cyst, and regression of apical cysts after periapical wound healing. **J Endod**. v. 33, n. 8, p. 908-16, 2007.
- LIN, S.K.; et al. Immunolocalization of macrophages and transforming growth factor-beta 1 in induced rat periapical lesions. **J Endod**. v. 26, n. 6, p. 335–40, 2000.
- LIU, Y.Z.; et al. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. **Nat Immunol**. v. 9, n. 6, p. 632–640, 2008.
- LOYOLA, A.M.; et al. Apoptosis in epithelial cells of apical radicular cysts. **Int Endod J**. v. 38, n. 7, p. 465-9, 2005.
- MANEL, N.; UNUTMAZ, D.; LITTMAN, D.R. The differentiation of human TH17 cells requires transforming growth factor beta and induction of the nuclear receptor RORgammaT. **Nat Immunol**. v. 9, n. 6, p. 641–9, 2008.
- MARÇAL, J.R.B.; et al. T-Helper Cell Type 17/Regulatory T-Cell Immunoregulatory Balance in Human Radicular Cysts and Periapical Granulomas. **J Endod**. v. 36, n. 6, p. 995–999, 2010.

MARSON, A.; et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. **Nature**. v. 445, n. 7130, p. 931–5, 2007.

MARTON, I.J.; KISS, C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**. v. 15, n. 3, p. 139–150, 2000.

MCGUIRK, P.; MILLS, K.H. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. **Trends Immunol**. v. 23, n. 9, p. 450–455, 2002.

MEGHJI, S.; et al. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. **Arch Oral Biol**. v. 41, n. 6, p. 523–31, 1996.

MELO, F.C.C.; et al. Granuloma periapical: análise de 150 casos. **Rev bras patol oral**. v. 2, n. 3, p.2-7, 2003

MERIKA, M.; ORKIN, S.H. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. **Mol Cell Biol**.v. 13, n. 7, p. 3999–4010, 1993.

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

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

MUGLALI, M.; et al. Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cyst fluids. **J Oral Pathol Med**. v. 37, n. 3, p. 185–189, 2008.

MUGLALI, M.; SUMER, A.P. Squamous cell carcinoma arising in a residual cyst: a case report. **J Contemp Dent Pract**. v. 9, n. 6, p.115-21, 2008.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7 ed. São Paulo: Artmed, 885 p., 2010.

NAIR, P.N.R. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontology 2000**. v. 13, n. 1, p. 121–48, 1997.

NAIR, P.N.R.; et al. Experimental evidence supports the abscess theory of development of radicular cysts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 106, n. 2, p. 294-303, 2008.

NAIR, P.N; et al. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. **J Endod**. v. 16, n. 12, p. 580-8, 1990.

NAIR, P.N.R. New perspectives on radicular cysts: do they heal? **Int Endod J**. v. 31, n. 3, p. 155-60, 1998.

NAIR, P.N. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. **Int Endod J**. v. 39, n. 4, p. 249-81, 2006.

NAIR, P.N.R.; PAJAROLA, G.; SCHROEDER, H.E. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v. 81, n. 1, p. 93-102, 1996.

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

NAKAJIMA T.; et al. Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. **J Dent Res.** v. 84, n. 7, p. 639–643, 2005.

NEVILLE, B.W.; et al. Doenças da Polpa e do Periápice. In: \_\_\_\_\_. **Patologia Oral e Maxilofacial.** 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, cap. 3, p. 119-151.

NOBUHARA, W.; DEL RIO, C. Incidence of periradicular pathoses in endodontic treatment failures. **J Endod.** v. 19, n. 6, p. 315-8, 1993.

NONAKA, C.F.; et al. Immunoexpression of vascular endothelial growth factor in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 106, n. 6, p. 896-902, 2008.

OCHSENIUS, G.; et al. Odontogenic Cysts: Analysis of 2.944 cases in Chile. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** v. 12, p. E85-91, 2007.

OEHLERS, F.A. Periapical lesions and residual dental cysts. **Br J Oral Surg.** v. 8, n. 2, p. 103–13.

OSEKO, F.; et al. IL-17 is involved in bone resorption in mouse periapical lesions. **Microbiol Immunol.** v. 53, n. 5, p. 287–294, 2009.

PERRINI, N.; CASTAGNOLA, L. eds. W Hess & O. Keller's Anatomical Plates: Studies on the Anatomical Structure of Root Canals in Human Dentition by a Method of Making the Tooth Substance Transparent (1928). Milano: Lainate; 1998.

PROCKT, A.P.; et al. Odontogenic Cysts: Analysis of 680 Cases in Brazil. **Head and Neck Pathol.** v. 2, n. 3, p. 150–156, 2008.

QUEIROZ-JUNIOR, C.M.; et al. A controversial role for IL-12 in immune response and bone resorption at apical periodontal sites. **Clin Dev Immunol.** v, 2010, p. 1-8, 2011.

RAITZ, R.; et al. Cisto radicular: uma análise epidemiológica de 1507 casos. **RPG Rev Pós Grad.** v.7, n.1, p.27-39, 2000.

READ, S.; et al. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. **J Immunol.** v. 177, n. 7, p. 4376-83, 2006.

REGEZI, J.A.; SCIUBBA, J.J.; JORDAN, R.C.K. Cistos dos Maxilares e Pescoço. In: \_\_\_\_\_. **Patologia Bucal – Correlações Clinicopatológicas.** 5. ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2008, cap. 10, p. 237-259.

RICUCCI, D.; MANNOCCI, F.; FORD, T.R. A study of periapical lesions correlating the presence of a radiopaque lamina with histological findings. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 101, n. 3, p. 389- 94, 2006.

ROCHA, D.A.P.; et al. Formación de los granulomas y quistes radicales: Una revisión de los aspectos inmunopatológicos. **Revista ADM.** v. LXIV, n. 3, p. 91-96, 2007.

RODINI, C.O; LARA, V.S. 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.** v. 92, n. 2, p. 221-7, 2001.

ROMAGNANI, S. Regulation of the T cell response. **Clin Exp Allergy.** v. 36, n. 11, p. 1357–1366, 2006.

RONCADOR, G.; et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+ CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. **Eur J Immunol.** v. 35, n. 6, p. 1681–1691, 2005.

SAKAGUCHI, S.; et al. Foxp3(+)CD25(+)CD4(+) natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. **Immunol Rev.** v. 212, n. 1, p. 8–27, 2006.

SAKAGUCHI, S.; et al. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nat Rev Immunol.** v. 10, n. 7, p. 490-500, 2010.

SAKAGUCHI, S.; et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol.** v. 155, n. 3, p. 1151–1164, 1995.

SAKAGUCHI, S.; et al. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell.** v. 133, n. 5, p. 775–87, 2008.

SANTOS, L.C.; et al. Immunohistochemical detection of Langerhans cells in dental granulomas and radicular cysts. **J Mol Histol.** v. 38, n. 3, p. 201-205, 2007.

SCHULZ, M.; VON ARX, T.; ALTERMATT, H.J. Histology of Periapical Lesions Obtained During Apical Surgery. **J Endod.** v. 35, n. 5, 2009.

SHEAR, M.; SPEIGHT, P.M. Cisto Radicular e Cisto Residual. In: \_\_\_\_\_. Cistos da Região Bucomaxilofacial. 4. ed, São Paulo. Santos, 2011, cap. 11, p. 123-142.

SCHEFFOLD, A.; MURPHY, K.M.; HÖFER, T. Competition for cytokines: T(reg) cells take all. **Nat Immunol.** v. 8, n. 12, p. 1285-7, 2007.

SIMON, J.H.S. Incidence of periapical cysts in relation to root canal. **J Endod.** v. 6, p. 845–8, 1980.

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

- SOJKA, D.K.; HUANG, Y.H.; FOWELL, D.J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. **Immunology**. v. 124, n. 1, p. 13-22, 2008.
- STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Crit Rev Oral Biol Med**. v. 9, n. 4, p. 498-521, 1998.
- SUMMERS, L. The incidence of epithelium in periapical granulomas and the mechanism of cavitation in apical dental cysts in man. **Arch Oral Biol**. v. 19, n. 12, p. 1177-80, 1974.
- SUZUKI, T.; et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and heat shock proteins in periapical inflammatory lesions. **J Oral Pathol Med**. v. 31, n. 8, p. 488-93, 2002.
- SUZUKI, T.; et al. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. **J Oral Pathol Med**. v. 34, n. 1, p. 46-52, 2005.
- SUZUKI, T.; et al. Immunohistochemical analysis of CD1a-labeled Langerhans cells in human dental periapical inflammatory lesions – correlation with inflammatory cells and epithelial cells. **Oral Dis**. v. 7, n. 6, p. 336-43, 2001.
- SWINSON, B. D.; JERJES, W.; THOMAS, G. J. Squamous Cell Carcinoma Arising in a Residual Odontogenic Cyst: Case Report. **J Oral Maxillofac Surg**. v. 63, n. 8, p. 1231-1233, 2005.
- SZABO, S.J.; et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**. v. 100, n. 6, p. 655–669, 2000.
- TAKAHASHI, K.; et al. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. **J Clin Periodontol**. v. 32, n. 4, p. 369 –74, 2005.
- TAKAHASHI, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. **Int Endod J**. v. 31, n. 5, p. 311-325, 1998.
- TAKIMOTO, T.; et al. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. **J. Immunol**. v. 185, n. 2, p. 842–855, 2010.
- TEIXEIRA-SALUM, T.B.; et al. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. **J Oral Pathol Med**. v. 39, n. 3, p. 250-256, 2010.
- TONE, Y.; et al. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. **Nat. Immunol**. v. 9, n. 2, p. 194–202, 2008.
- TORABINEJAD, M. Mediators of acute and chronic periradicular lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. v. 78, n. 4, p. 511-21, 1994
- TROWBRIDGE, H.O. Immunological aspects of chronic inflammation and repair. **J Endod**. v. 16, n. 2, p. 54-61, 1990.

- TSAI, C. H.; et al. Immunohistochemical localization of tissue-type plasminogen activator and type I plasminogen activator inhibitor in radicular cysts. **J Oral Pathol Med.** v. 33, n. 3, p. 156-61, 2004.
- TYLER, L.W.; et al. Eosinophil-Derived Transforming Growth Factors (TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1) in Human Periradicular Lesions. **J Endod.** v. 25, n. 9, p. 619-24, 1999.
- VELDHOEN, M.; et al. TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity.** v. 24, n. 2, p. 179-89, 2006.
- WAHL, S.M. Transforming growth factor  $\beta$ : the good, the bad, and the ugly. **J Exp Med.** v. 180, n. 5, p. 1587–1590, 1994.
- WALTON, R.E. The residual radicular cyst: Does it exist? **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 82, n. 5, p. 471, 1996.
- WARD, J.P.; et al. A mathematical model of the dynamics of odontogenic cyst growth. **Anal Quant Cytol Histol.** v. 26, n. 1, p. 39-46, 2004.
- WILLIAMS, L.M.; RUDENSKY, A.Y., Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. **Nat Immunol.** v. 8, n. 3, p. 277–284, 2007.
- XIA, G.L.; SHAH, M.; LUO, X.R. Prevention of allograft rejection by amplification of Foxp3(+)/CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells. **Transl Res.** 153, n. 2, p. 60–70, 2009.
- XIONG, H.; WEI, L. PENG, B. Immunohistochemical Localization of IL-17 in Induced Rat Periapical Lesions. **J Endod.** v. 35, n. 2, p. 216–220, 2009.
- YANG, L.; et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. **Nature.** v. 454, n. 7202, p. 350–352, 2008.
- YOSHIMURA, A.; WAKABAYASHI, Y.; MORI, T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- $\beta$ . **J Biochem.** v. 147, n. 6, p. 781-92, 2010.
- YU, J.J.; GAFFEN, S.L. Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. **Front Biosci.** v. 13, n. 1, p. 170 –7, 2008.
- ZHENG, S.G.; et al. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4(+)/CD25(–) cells to CD25(+)/Foxp3(+) regulatory T cells and for expansion of these cells. **J Immunol.** v. 178, n. 4, p. 2018–2027, 2007.
- ZHENG, Y.; et al. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. **Nature.** v. 463, n. 7282, p. 808-12, 2010.
- ZHENG, W.; FLAVELL, R.A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. **Cell.** v. 89, n. 4, p. 587–596, 1997.

ZHOU, L.; et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nat Immunol.** v. 8, n. 9, p. 967-74, 2007.

ZHOU, L.; et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. **Nature.** v. 453, n. 7192, p.236-40, 2008.

ZHU, J.; PAUL, W.E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood.** v. 112, n. 5, p. 1557-69, 2008





## APÊNDICES









**APÊNDICE E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)****UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Este é um convite para você participar da pesquisa **“EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE IL-17, TGF- $\beta$  E FOXP-3 EM LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS”**, sob a orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Hébel Cavalcanti Galvão. Sua participação é voluntária (você só participa, se quiser), o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento (sua permissão), sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade. Essa pesquisa procura avaliar proteínas (substâncias) presentes em lesões periapicais crônicas (lesões nos tecidos que envolvem o ápice do dente) com a finalidade de entender os mecanismos biológicos destas lesões (forma como a doença se comportará). Caso você decida aceitar o convite, não irá passar por nenhum tratamento clínico nem fará nenhuma cirurgia. Os riscos de você sofrer danos físicos, psicológicos ou de qualquer outro tipo por participar dessa pesquisa serão mínimos e caso ocorram serão resolvidos da melhor maneira possível. Iremos utilizar o material que já foi removido da sua boca durante a biópsia (cirurgia para retirada da lesão que você tinha na boca). Sua participação é muito importante, pois assim podemos conhecer mais sobre essas lesões e caso exista alguma mudança no seu diagnóstico, você será comunicado e será feito o seu tratamento na Faculdade de Odontologia da UFRN. Todas as informações colhidas da sua ficha ficarão guardadas em local seguro e seu nome não será identificado em nenhum momento.

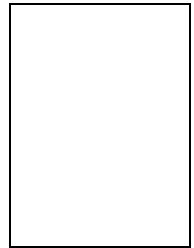
Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido. Se você sofrer algum dano, decorrente desta pesquisa, terá direito a indenização que será providenciada pelos pesquisadores.

Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hébel Cavalcanti Galvão no Departamento de Odontologia da UFRN, no endereço Av. Sen. Salgado Filho, nº 1787, Lagoa Nova, Natal – RN, ou pelo telefone (84)3215-4138. Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN, localizado no *Campus* Universitário da UFRN, ou pelo telefone (84)3215-3135.

**Consentimento Livre e Esclarecido**

Eu, \_\_\_\_\_ ,  
declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa **“EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE IL-17, TGF- $\beta$  E FOXP-3 EM LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS”**

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante



\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hébel Cavalcanti Galvão  
Pesquisadora Responsável





**ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP**

**PARECER Nº 330/2011**

<b>Prot. nº</b>	132/11-P CEP/UFRN
<b>CAAE</b>	0158.0.051.000-11
<b>Projeto de Pesquisa</b>	EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE IL-17, TGF- $\beta$ E FOXP3 EM LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS
<b>Área de Conhecimento</b>	4 - CIÊNCIAS DA SAÚDE 4.02 - Odontologia
	Grupo III
<b>Pesquisador Responsável</b>	Hébel Cavalcanti Galvão
<b>Instituição Proponente</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
<b>Instituição Coparticipante</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
<b>Nível de abrangência do Projeto</b>	Dissertação de Mestrado
<b>Período de realização</b>	Início abr/2011 - Final mar/2012 Arrolamento dos participantes: Início ago/2011 - Final dez/2011
<b>Revisão ética em</b>	29 de julho de 2011

**RELATO**

**1. RESUMO**

É uma pesquisa que tem como objetivo formação de pessoal a nível de mestrado, programa de pós graduação em patologia oral. O estudo pretende avaliar a expressão de citocinas induzida pela presença de granulomas periapicais. A hipótese é que o granuloma induz processo inflamatório mediado por citocinas. As amostras biológicas serão selecionadas dentre as amostras coletadas e armazenadas no Departamento de Odontologia, com diagnóstico histopatológico de Granulomas periapicais, cistos radiculares e cistos radiculares residuais realizados no período de 1997 a 2010. A hipótese de trabalho é que o tipo de citocina expressa está associado ao comportamento biológico observado histopatologicamente. Os pacientes serão contados por telefone, após anuência dos mesmos, estes serão visitados para esclarecimentos acerca da pesquisa e obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O protocolo está adequadamente instruído. Os pesquisadores irão consultar os pacientes que tiveram o diagnóstico de cisto no período indicado acima. Receberam autorização do Departamento de Odontologia para realização da pesquisa. O estudo é importante e poderá trazer dados sobre o processo de lesões periapicais.

**2. ENTENDIMENTOS E PARECER**

Entendemos que este protocolo encontra-se bem instruído e em concordância com as normas e diretrizes propostas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Diante do exposto o CEP/UFRN classifica-o na categoria de PROTOCOLO APROVADO.

*Galvão*