

**Avaliação das Populações de Linfócitos T em Lesões Periapicais de Dentes
Tratados Endodenticamente
PIBIC/2010-2011**

Nathália Caroline de Souza Lima¹, Julio de Almeida Silva², Aline Carvalho Batista³,
Carlos Estrela⁴.

Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás, 74605-220, Brasil.

nathaliabrasil@hotmail.com e estrela3@terra.com.br

PALAVRAS-CHAVES: Lesões periapicais, infiltrado imunoinflamatório, dentes tratados endodenticamente.

- Revisado pelo orientador -

¹ Orientanda

² Co-orientador

³ Co-orientadora

⁴ Orientadora

1 INTRODUÇÃO

As lesões periapicais de origem endodôntica devem ser vistas como a resposta do organismo à destruição da polpa dental e à ocupação microbiana do canal radicular (GOMES *et al.*, 2004; NAIR, 2009; SIQUEIRA & ROÇAS, 2009; ESTRELA & BUENO, 2009). Dessa maneira, a defesa do hospedeiro é a associação entre resposta inflamatória e imunológica.

A resposta inflamatória é um mecanismo inespecífico imediato, que envolve fenômenos vasculo-exsudativos e proliferativos, infiltração e proliferação de células inflamatórias (ABBAS *et al.*, 2008; IZUMI *et al.*, 1995; BERGENHOLTZ, 1990) com o objetivo de destruir, diluir ou circunscrever o agente estranho para defender o tecido de danos.

A resposta imunológica ocorre após a resposta inicial, é mais complexa e caracterizada pelo processamento, apresentação e reconhecimento antigênicos (ABBAS *et al.*, 2008; IZUMI, *et al.*, 1995).

O combate às agressões microbianas endodônticas, portanto, é realizado pelas células de defesa do hospedeiro, como os neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e monócitos/macrófagos que estão presentes no tecido de granulação (TAŞMAN *et al.*, 2000). Alguns estudos envolvendo a função dos linfócitos em lesões periapicais têm mostrado grande número de linfócitos T no infiltrado inflamatório, o que sugere a participação dessas células na iniciação e desenvolvimento das lesões (RODINI & LARA, 2001). Desta maneira, o objetivo desta pesquisa é identificar e quantificar em lesões periapicais persistentes, os seguintes tipos celulares: linfócitos T (CD3⁺ - marcador para todos os linfócitos), linfócito T citotóxico (CD8⁺ - resposta celular), linfócito T memória (CD45RO⁺ - resposta imunológica adaptativa / resposta celular) e linfócito T regulatório (foxp3⁺ - regulador da resposta inflamatória e imunológica).

2 MATERIAIS E METÓDOS

2.1 Amostras Selecionadas

Foram selecionados 20 pacientes provenientes das Disciplinas de Endodontia e Urgência da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, que apresentavam dentes permanentes tratados endodônticamente com infecção secundária. A amostra selecionada foi constituída de dentes submetidos a retratamentos endodônticos, cujo

acompanhamento clínico e radiográfico sugeriu manutenção de infecção periapical decorridos mais de 6 meses do tratamento. Os procedimentos clínicos para coleta das lesões periapicais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, protocolo de número 170/2009.

As lesões foram removidas após a realização do diagnóstico clínico e constatação da indicação do tratamento cirúrgico. O aspecto macroscópico da lesão periapical foi analisado em termos de forma, coloração e consistência. As amostras foram imersas em solução de formol a 10% tamponado, sendo, posteriormente, preparadas para análise microscópica.

O grupo controle foi constituído de 10 amostras de lesões periapicais relacionadas a infecções primárias (lesões periapicais associadas ao ápice de dentes não tratados endodonticamente) de dentes indicados para exodontia.

2.2 Técnica de Rotina

O material selecionado, incluído em parafina, foi seccionado em micrótomo (Leica RM2165), obtendo-se de cada bloco cortes consecutivos de 5µm, que foram colocados sobre lâminas histológicas e corados pelo método de HE. Os quais foram utilizados para diferenciação das amostras em cistos periapicais, granulomas periapicais ou outras entidades patológicas.

2.3 Técnica Imunoistoquímica

Para a técnica da imunoistoquímica foram obtidos cortes seriados de 3µm que foram estendidos sobre lâminas de vidro silanizadas (A3648 - EasyPath) e submetidos à técnica imunoistoquímica, com o método LSAB, para a identificação dos seguintes antígenos: CD3, CD8, CD45RO e foxp3.

Inicialmente, os cortes sobre as lâminas foram desparafinizados em xilol e hidratados em banhos crescentes de álcool etílico. Em seguida, os cortes processados para identificação de CD3, CD8 e CD45RO foram incubados em tampão citrato, pH=6,0 (SIGMA, P4809, Saint Louis – USA) aquecidos a uma temperatura de 95⁰C, com auxílio de Banho Maria Digital (DeLeo), por 45 minutos; e os cortes para identificação de foxp3 foram incubados em EDTA tris base, ph=9,0 aquecidos, também, a uma temperatura de 95°C, com auxílio de Banho Maria Digital (DeLeo), por 30 minutos. Após lavagens com TBS, as lâminas foram incubadas em metanol com peróxido de hidrogênio 20V por 35 minutos, para o bloqueio da peroxidase

endógena. Posteriormente, as lâminas foram novamente lavadas com TBS e, em seguida, incubadas com solução BSA para bloqueio de proteínas endógenas por 25 minutos. Novamente as lâminas foram lavadas com TBS e, em seguida, incubadas com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD8 humano (C8/144B), anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD3 humano (F7.2.38), anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD45RO humano (UHCL1) e anticorpo monoclonal de camundongo anti-foxp3 (236^a/E7), por 18 horas e mantidas na temperatura de 4^oC. Após o período de 18 horas, foram realizadas lavagens consecutivas e, posteriormente, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário (Sistema LSAB/DAKO) por 30 minutos; lavadas e incubadas com a estreptavidina + peroxidase (Sistema LSAB/DAKO) por 30 minutos. Novamente as lâminas foram lavadas com TBS e, a seguir, procedeu-se à revelação da reação utilizando o 3.3'-Diaminobenzidina (DAB) em uma solução cromogênica (Sistema LSAB/DAKO), por 3 minutos para a identificação de CD8, CD45RO e foxp3 e por 5 minutos para a identificação de CD3. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina por 30 segundos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água corrente por 5 minutos, as lâminas foram desidratadas com álcoois, passadas em xilol e montadas com solução de resina não aquosa (Entellan-Mikroskopie-Merck).

2.3 Análise Quantitativa dos Dados

A análise quantitativa foi realizada considerando as células positivas. Esta análise foi realizada utilizando microscópio óptico contendo um retículo de integração em rede quadrada (CARL ZEISS, Germany) acoplado na objetiva de 100x com óleo de imersão. A área do retículo no aumento de 100x corresponde a 0,015625mm². Para cada amostra foram analisados 10 campos microscópicos consecutivos (correspondendo a uma área total de 0,3125mm²); assim, por meio de uma regra de três, avaliou-se a densidade de células positivas por mm².

2.4 Análise Estatística dos Dados

Os valores obtidos foram analisados através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney e foi realizada análise descritiva. Os testes estatísticos foram aplicados utilizando-se o programa SPSS 10.0 for Windows. O resultado foi expresso como média ± DP e o valor de P<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

A análise histopatológica das 10 amostras de lesões primárias revelou: 06 lesões identificadas como granuloma periapical, caracterizadas por tecido granulomatoso infiltrado por células inflamatórias; e 04 lesões periapicais identificadas como cisto periapical, caracterizadas por cavidade revestida internamente por epitélio escamoso estratificado não queratinizado, contendo infiltrado inflamatório, circundado por tecido conjuntivo de suporte. As 20 amostras de lesões secundárias revelaram 10 lesões identificadas como granuloma periapical e 10 identificadas como cisto periapical (Tabela 1).

Tabela 1 – Diferenciação das lesões periapicais em granulomas ou cistos periapicais.

Diagnóstico Histopatológico	Lesão Primária n= (10)	Lesão Secundária n= (20)
Granuloma Periapical	6	10
Cisto Periapical	4	10
Outros	0	0

A análise quantitativa dos dois grupos não apresentou diferença estatisticamente significativa para as populações celulares. As células CD3⁺, CD8⁺ e CD45RO⁺ apresentaram média e densidade semelhantes entre si, enquanto as células foxp3⁺ apresentaram menor contagem tanto nas lesões periapicais primárias quanto nas lesões periapicais secundárias. No entanto, uma maior densidade de células foxp3⁺ e menor densidade de células CD45RO⁺ foram encontradas nas lesões periapicais secundária em comparação com as lesões primárias (Tabela 2).

Tabela 2 – Média, densidade e desvio padrão da quantificação de células CD3⁺, CD8⁺, CD45RO⁺ e foxp3⁺ em lesões periapicais primárias e secundárias.

Marcadores Celulares	Lesão Primária			Lesão Secundária		
	Média (cél/campos)	Densidade (cél/mm ²)	Desvio Padrão	Média (cél/campos)	Densidade (cél/mm ²)	Desvio Padrão
CD3 ⁺	1,94	115,200	120,755	2,17	175,709	258,886
CD8 ⁺	2,05	154,880	126,584	1,56	105,309	123,052
CD45RO ⁺	1,72	151,040	150,950	1,44	90,764	124,358
foxp3 ⁺	0,10	7,680	8,345	0,33	23,273	41,994

A análise qualitativa revelou que as células $CD3^+$, $CD8^+$, $CD45RO^+$ e $foxp3^+$ apresentaram morfologia de linfócito e coloração marrom na membrana celular (Figura 1).

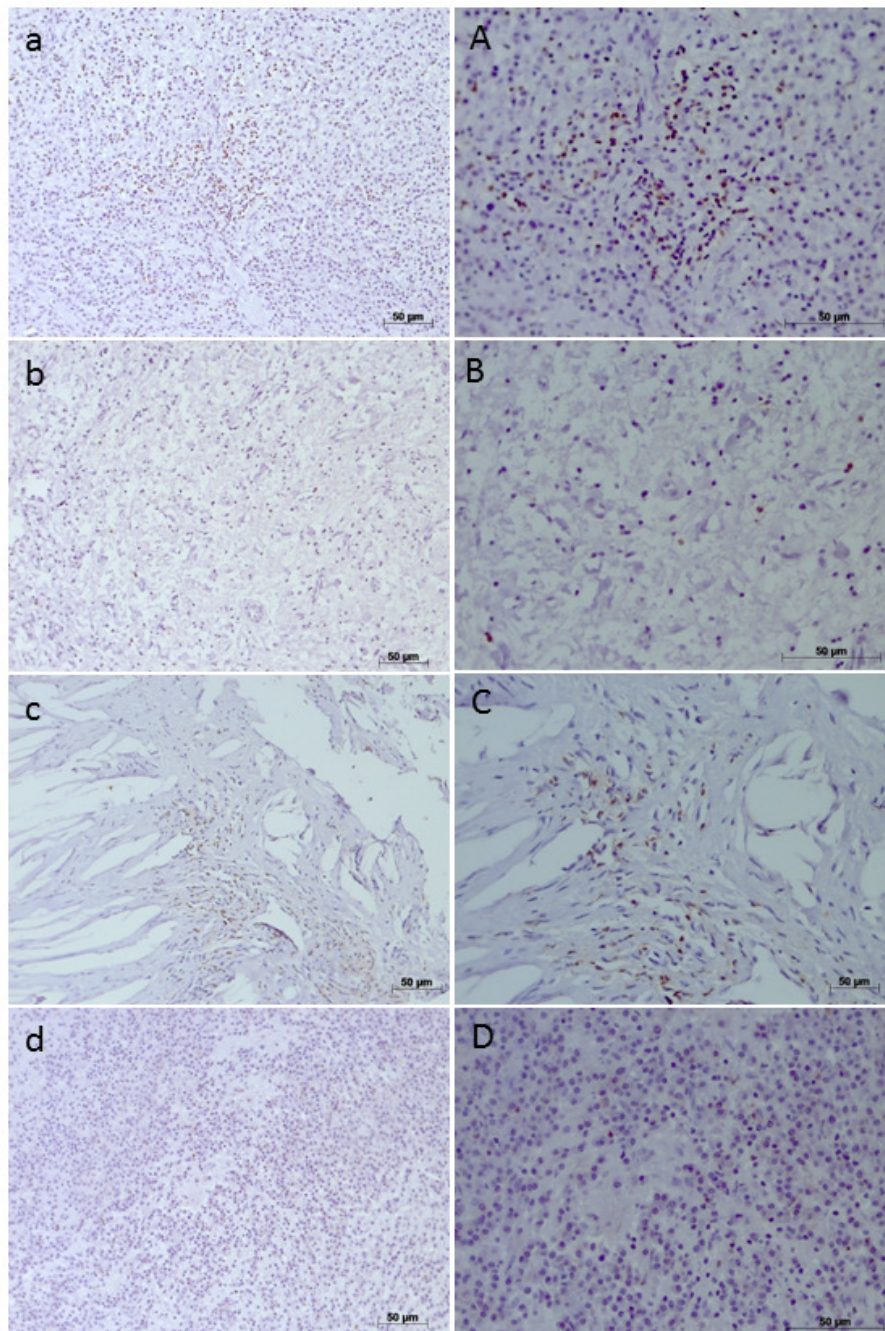


Figura 1 – Fotomicroscopia de lâminas processadas pela técnica de imunohistoquímica para a identificação das células: a) $CD3^+$, b) $CD8^+$, c) $CD45RO^+$ e d) $foxp3^+$ no aumento de 20x; e, A) $CD3^+$, B) $CD8^+$, C) $CD45RO^+$ e D) $foxp3^+$ no aumento de 40x.

4 DISCUSSÃO

A ocorrência de um conflito entre as forças microbianas e a defesa do hospedeiro favorece uma destruição periapical, o que resulta na formação de diferentes periapicopatias (NAIR, 1997). Além dos avanços no entendimento dos aspectos causais da periodontite apical, o processo de destruição óssea e acúmulo de células inflamatórias também devem ser considerados ao estudar-se as alterações histopatológicas que ocorrem na região periapical.

A defesa do hospedeiro associa a resposta inflamatória à imunológica (ABBAS *et al.*, 2008; IZUMI *et al.*, 1995; BERGENHOLTZ, 1990). A resposta inflamatória representa um mecanismo de defesa inespecífico e imediato, que além de exercer um papel importante na defesa também participa da degradação de matriz extracelular (BRUNO, 2010). A resposta imunológica é um mecanismo mais específico, ativado após a resposta inflamatória. A maioria dos estudos envolvendo a função de linfócitos em lesões periapicais tem observado grande número de células T no infiltrado inflamatório (RODINI & LARA, 2001).

As células apresentadoras de antígeno (APC), que expressam complexo de histocompatibilidade maior classe II (MHC classe II), capturam proteínas antigênicas e apresentam aos linfócitos T *helper* (CD4) nos linfonodos. Ativados, rapidamente eles multiplicam-se e diferenciam-se em linfócitos T de memória (CD45RO⁺) que migram através do sangue ou linfa (BRUNO, 2010). Nos infiltrados inflamatórios intensos tem sido observada a presença de linfócitos T regulatórios (foxp3⁺), o que pode indicar que eles afetam o controle da imunidade e podem prevenir inflamações exacerbadas. Também, os linfócitos regulatórios podem suprimir as células T e, conseqüentemente, reduzir os números de CD4⁺ e CD45RO⁺ (BRUNO, 2010). O que vai de encontro aos resultados desse estudo, que observou maior densidade de células foxp3⁺ nas lesões periapicais secundária, ao mesmo tempo em que ocorre menor densidade de células CD45RO⁺, o que sugere a possível existência de um mecanismo que previna a inflamação exacerbada das lesões persistentes.

Alavi *et al.* (1998) estudaram a proporção de linfócitos em lesões periapicais associadas com dentes tratados endodonticamente e dentes não tratados. Através da técnica de imunoistoquímica eles avaliaram linfócitos T (CD3⁺), linfócitos B (CD20⁺), linfócitos T *helper* (CD4⁺) e linfócitos T citotóxicos (CD8⁺). De 15 espécimes avaliados 14 apresentaram diagnóstico histopatológico de granuloma periapical e apenas 01 lesão foi diagnosticada como cisto periapical. Os resultados revelaram que as lesões primárias apresentavam infiltrado inflamatório mais denso que as lesões secundárias. A proporção de células B e T *helper* foi

significativamente maior nas lesões secundárias e não houve diferença estatisticamente significativa entre a proporção das células T dos dois grupos de lesões. O que vai de acordo com os achado do presente estudo, visto que, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a distribuição das células T entre os grupos de lesões primárias e de lesões secundárias, que também são denominadas lesões persistentes.

A persistência das lesões periapicais pode ser associada a fatores não microbianos endógenos ou exógenos. Causas endógenas incluem a presença de cristais de colesterol e cistos verdadeiros. As possíveis causas exógenas incluem a reação a corpo estranho causada pelo extravasamento de material endodôntico obturador. No entanto, a causa primária de periodontite apical após tratamento é a presença de bactérias no sistema de canais radiculares (NAIR, 2009; RICUCCI *et al.*, 2009).

Portanto, sabendo que a periodontite apical apresenta como importante causa a infecção intra radicular (GOMES *et al.*, 2004; NAIR, 2009; SIQUEIRA & ROÇAS 2009; ESTRELA & BUENO, 2009), o objetivo do tratamento endodôntico busca reduzir os microrganismos das infecções endodônticas e controlar possíveis reinfecções. Contudo, por várias razões, o reparo dos tecidos duros pode não ocorrer em todos os dentes tratados endodonticamente. Desta forma, quando os recursos terapêuticos indicados para as periodontites apicais via convencional se esgotam, uma alternativa viável é a remoção cirúrgica da lesão periapical, especialmente nas situações clínicas de persistência.

Com a finalidade de evitar-se a alternativa cirúrgica, pesquisas no campo da biologia celular e molecular têm mostrado resultados expressivos no estudo da histofisiologia e patologia periapical. No entanto, observa-se uma carência de informações fundamentadas sobre a presença e a participação efetiva de células inflamatórias e imunológicas nas lesões periapicais persistentes.

5 CONCLUSÃO

Portanto, nesse estudo não foi encontrada diferença estatisticamente significativa da expressão de células CD3⁺, CD8⁺, CD45RO⁺ e foxp3⁺, embora tenha sido observada maior expressão de foxp3⁺ e menor expressão de CD45RO⁺ nas lesões secundárias, o que pode indicar modificação no microambiente dessas lesões e possivelmente refletir em um mecanismo de prevenção da exacerbação da inflamação nas lesões persistentes.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILAI, S. In: *Imunologia celular e molecular*. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

ALAVI, A.M.; GULABIVALA, K.; SPEIGHT, P.M. Quantitative analysis of lymphocytes and their subsets in periapical lesions. **Int Endod J**, UK, v. 31, n. 4, p. 233-241. Jul. 1998.

BERGENHOLTZ, G. Pathogenic mechanisms in pulpal disease. **J Endod**, Sweden, v. 16, n. 2, p. 98-101. Feb. 1990.

BRUNO, K.F. et al. Characterization of inflammatory cell infiltrate in human dental pulpitis. **Int Endodod J**, Brazil, v. 43, n. 11, p. 1013-1021. Nov. 2010.

ESTRELA, C.; BUENO, M.R. **Epidemiology and therapy of apical periodontitis**. In: *Endodontic Science*. São Paulo: Ed. Artes Médicas, 2009.

GOMES, B.P. et al. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol Immunol**, Brazil, v. 19, n. 2, p. 71-76. Apr. 2004.

IHAN HREN, N.; IHAN, A. T lymphocytes activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts. **Arch Oral Biol**, Slovenia, v. 54, n. 2, p. 156-161. Feb. 2009.

IZUMI, T. et al. Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth. **Arch Oral Biol**, Japan, v. 40, n. 7, p. 609-614. Jul. 1995.

NAIR, P.N. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontol 2000**, Switzerland, v. 13, p. 121-148. Feb. 1997.

NAIR, P.N. **Biology and pathology of apical periodontitis**. In: *Endodontic Science*. São Paulo: Ed. Artes Médicas, 2009.

RICUCCI, D. et al. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. **J Endod**, v. 35, n. 4, p. 493-502. Apr. 2009.

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**, Brazil, v. 92, n. 2, p. 221-227. Aug. 2001.

SIQUEIRA, J.F., RÔÇAS, I.N. The microbiota of acute apical abscesses. **J Dent Res**, Brazil, v. 88, n. 1, p. 61-65. Jan, 2009.

TAŞMAN, F. et al. CD45/Isotypes expression in the immune cells of human periapical lesions. **Journal of Endodontics**, Turkey, v. 26, n. 3, p. 166-168. Mar. 2000.