

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DOUTORADO EM ODONTOLOGIA COM ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM
CLÍNICA INTEGRADA

RAPHAELA SILVA LEANDRO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD4, CD25, IL-10, IL-17 E FOXP 3 EM CISTOS
RADICULARES**



Recife – PE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA COM ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
EM CLÍNICA INTEGRADA
RAPHAELA SILVA LEANDRO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD4, CD25, IL-10, IL-17 E FOXP 3 EM CISTOS
RADICULARES**

Tese apresentada ao Colegiado da Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Recife –PE

2015

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- S237a Santos, Raphaela Silva Leandro.
Avaliação da expressão de CD4, CD25, IL-10, IL-17 E FOXP 3 em
cistos radiculares / Raphaela Silva Leandro Santos. – 2015.
64 f.: il.; tab.; 30 cm.
- Orientador: Danyel Elias da Cruz Perez.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2015.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Cisto radicular. 2. Linfócitos T reguladores. 3. Imuno-histoquímica.
4. Interleucina-17. I. Perez, Danyel Elias da Cruz (Orientador). II. Título.
- 617.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2017-091)

RAPHAELA SILVA LEANDRO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD4, CD25, IL-10, IL-17 E FOXP 3 EM CISTOS
RADICULARES**

Tese apresentada ao Colegiado da Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Aprovada em 31 de agosto de 2015

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. JUREMA FREIRE LISBOA DE CASTRO (Presidente)
(Universidade Federal de Pernambuco)

Prof. Dr. PAULO ROGÉRIO FERRETI BONAN (1º Examinador)
(Universidade Federal da Paraíba)

Profa. Dra. ELAINE JUDITE DE AMORIM CARVALHO (2º Examinador)
(Universidade Federal de Pernambuco)

Profa. Dra. ANDREA CRUZ CÂMARA (3º Examinador)
(Universidade Federal de Pernambuco)

Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ (4º Examinador)
(Universidade Federal de Pernambuco)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

COLEGIADO

MEMBROS PERMANENTES

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

Arnaldo De França Caldas Júnior

Anderson Stevens Leônidas Gomes

Bruna De Carvalho Farias Vajgel

Carlos Menezes Aguiar

Danyel Elias Da Cruz Perez

Flavia Maria De Moraes Ramos Perez

Gustavo Pina Godoy

Jair Carneiro Leão

Jurema Freire Lisboa De Castro

Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Maria Luiza Dos Anjos Pontual

Renata Cimões Jovino Silveira

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo

Dedico este trabalho, ao meu maior tesouro, minha filha Ana Laura, que me escolheu para gestá-la e trazê-la ao mundo e, dessa forma, construir minha família e descobrir a magnitude transformadora do amor materno.

Aos meus pais, José Marcos e Edileuza, pelo amor incondicional e pela generosidade de permitir que a minha formação fosse sempre prioridade em suas vidas, mesmo que isso significasse um grande sacrifício.

Ao meu marido, Everthon, por me incentivar, me admirar e me dedicar o amor mais sincero e mais puro que existe.

Aos meus avôs, José e Antônio e minhas avós, Amara e Irene, que, apesar de todas as limitações, criaram seus filhos com educação e dignidade e permitiram que seus netos pudessem ter um futuro promissor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre derramou inúmeras bênçãos ao longo de minha vida e que, através de seu amor, me manteve no caminho certo, me ergueu nos momentos de fraqueza e me permitiu alcançar vitórias imensuráveis como esta.

Ao meu orientador, Prof^o Danyel Elias da Cruz Perez, por quem nutro profunda admiração e respeito. Em quem vejo a essência e o exemplo do que é ser mestre e pesquisador.

A Sr. Rogério, pela paciência, solidariedade e ajuda nas etapas laboratoriais da pesquisa.

Ao Professor Jorge Esquiche Leon, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, pela fundamental contribuição na realização da pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, pela contribuição à nossa formação como pesquisadores.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação, especialmente, Oziclere Sena, pela solidariedade, carinho e atenção.

Aos meus colegas e amigos de turma, pelos momentos vividos ao longo desses quatro anos, pelas alegrias e angústias divididas.

“Cuide dos meios. O fim cuidará de si mesmo.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Introdução: Pouco se sabe sobre o papel modulador exercido pelos linfócitos T reguladores (Treg) e pelas diferentes citocinas envolvidas no desenvolvimento e manutenção dos cistos radiculares (CR). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a imuno-expressão dos marcadores CD4, CD25, interleucina-10 (IL-10), interleucina -17 (IL-17) e forkhead box P3 (FoxP3) em CR e associar esses achados com características histológicas dessas lesões. **Métodos:** Cinquenta e cinco espécimes teciduais de CR foram analisados quanto às suas características histológicas e submetidos à análise imuno-histoquímica utilizando os anticorpos anti-CD4, anti-CD25, anti IL-10, anti-IL-17 and anti-FoxP3. Os resultados da imuno-expressão foram correlacionados com a intensidade do infiltrado inflamatório e a espessura do revestimento epitelial cístico. **Resultados:** Todos os casos apresentaram marcação positiva para todos os marcadores estudados, mas com intensidades de expressão diferentes. A expressão de CD4, CD25, IL-10 e FoxP3 foi considerada fraca para todos os casos avaliados, enquanto que a IL-17 apresentou expressão forte e foi observada tanto nas células inflamatórias quanto no revestimento epitelial. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os marcadores avaliados e a intensidade do infiltrado inflamatório e a espessura do revestimento epitelial. Foi observada correlação positiva as marcações de IL-17 e FoxP3. **Conclusão:** Os presentes resultados evidenciaram uma participação menos expressiva de células Treg em cistos radiculares, através da fraca expressão de CD4, CD25, IL-10 e FoxP3, em detrimento de uma presença mais significativa de IL-17.

Palavras-chave: Cisto radicular. Linfócitos T reguladores. Imuno-histoquímica. Interleucina-17.

ABSTRACT

Introduction: Little is known about T regulatory (Treg) lymphocytes and cytokines modulation in development and maintenance of radicular cysts (RC). In this perspective, the aim of this study was to evaluate immunoexpression of the markers CD4, CD25, interleukin-17 (IL-17) and interleukin-10 (IL-10) and forkhead box P3 (FoxP3) in RC and to correlate these findings with the histological features of these lesions. **Methods:** Fifty five RC tissue specimens were analyzed for their histological characteristics and submitted to immunohistochemical analysis using anti-CD4, anti-CD25, anti IL-10, anti-IL-17 and anti-FoxP3 antibodies. The results of immunoexpression were correlated with the intensity of the inflammatory infiltrate and thickness of the epithelial lining. **Results:** All cases were positive to all studied markers, but with different expression intensity. The immunoexpression of CD4, CD25, IL-10 and FoxP3 was weak for all evaluated cases, whereas IL-17 exhibited strong expression in all cases. In addition, IL-17 was expressed in both inflammatory and epithelial cells of cystic lining. No significant differences in the number of positive cells were observed in terms of the intensity of the inflammatory infiltrate or epithelial thickness. It was observed positive correlations between the immunoexpressions of IL-17 and FoxP3. **Conclusion:** The present results showed a less expressive participation of Treg cells in radicular cysts due to weak expression of CD4, CD25, IL-10 and FoxP3 in detriment to a more significant presence of IL-17.

Keywords: Radicular cyst, T-Lymphocytes, Regulatory, Immunohistochemistry, Interleukin-17.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Desenvolvimento de células Foxp3^+ no timo 27

Figura 2. Um desequilíbrio entre células T helper 17 (Th17) e células T reguladoras (Tregs) contribui para uma doença imunológica 31

ARTIGO: IMMUNOEXPRESSION OF CD4, CD25, IL-10, IL-17 AND FOXP3 IN RADICULAR CYSTS

Figure 1. Representative photomicrographs of immunohistochemical staining of the studied markers in radicular cysts 45

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Citocinas que influenciam Tregs	23
Tabela 2. Subtipos de células T regulatórias naturais e induzidas.....	25

ARTIGO: IMMUNOEXPRESSION OF CD4, CD25, IL-10, IL-17 AND FOXP3 IN RADICULAR CYSTS

Table 1. Classification of immunoexpression of IL-17, CD4, CD25, IL-10 and FoxP3 in radicular cysts and their differences in realtion to intensity of inflammatory infiltrate and epithelial thickness.....	46
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CR/RC	Cisto radicular
GP/PG	Granuloma periapical
Th	Células T helper
Th1	Células T helper tipo 1
Th2	Células T helper tipo 2
Th17	Células T helper tipo 17
Treg	Células T regulatórias
NK	Células natural killer
CTLA-4	Linfócito T citotóxico associado ao antígeno 4
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
INF- γ	Interferon gama
FoxP3	Forkhead box P3
ILT	Transcrição de imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
NOS-2	Sintase do óxido nítrico 2
ROR γ t	Receptor órfão relacionado ao ácido retinóico gama T
CCR4	Receptor de quimiocina CC4
CCL22	Quimiocina CCL22
CCL17	Quimiocina CCL17
CCES	Carcinoma de células escamosas sinonasal
PNI	Papiloma nasal invertido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 <i>Linfócitos T reguladores</i>	24
2.2 <i>Aspectos imunológicos das lesões periapicais inflamatórias</i>	28
3. OBJETIVOS	33
3.1 <i>Objetivo Geral</i>	33
3.1 <i>Objetivos específicos</i>	33
4. RESULTADOS	34
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE	
ARTIGO: IMMUNOEXPRESSION OF CD4, CD25, IL-10, IL-17 AND FOXP3 IN RADICULAR CYSTS	38
<i>Abstract</i>	38
<i>Introduction</i>	39
<i>Methods</i>	41
<i>Results</i>	43
<i>Discussion</i>	47
<i>Acknowledgments</i>	52
<i>Conclusion</i>	53
<i>References</i>	54
ANEXOS	
ANEXO A - <i>Guidelines for Publishing Papers in the JOE</i>	56

1. INTRODUÇÃO

As lesões periapicais representam uma progressão da infecção bacteriana proveniente da polpa dentária e canais radiculares que se dissemina através do forâmen apical e resulta em resposta inflamatória localizada e concomitante reabsorção óssea. Os antígenos microbianos estimulam respostas imunológicas específicas e inespecíficas no tecido periapical. Como consequência desse processo e da inabilidade dos mecanismos de defesa do hospedeiro para erradicar a infecção, as lesões periapicais crônicas se desenvolvem com o objetivo de impedir a invasão microbiana. Essas lesões incluem granulomas periapicais (PG) e cistos radiculares (CR), ambos, acredita-se, representam diferentes estágios do mesmo processo inflamatório (PAULA-SILVA et al., 2009; COLIC´et al., 2009(a); FUKADA et al., 2009).

Os tecidos dos cistos e granulomas são infiltrados por células específicas e não específicas envolvidas nas respostas imunológicas locais. A apresentação de antígenos situados nos tecidos perirradiculares leva à ativação de células do sistema imunológico. Células imunoativas produzem mediadores para respostas inflamatórias, incluindo anticorpos e citocinas. A capacidade de síntese local de anticorpos contribui para a imunidade antígeno-específica e pode participar na modulação da atividade da doença. Além disso, a distribuição celular e o caráter da lesão são provavelmente regulados por citocinas, que são moléculas mensageiras, regulando desta forma as inter-relações de vários tipos de células (LIAPATAS; NAKOU; RONTOGIANNI, 2003).

Diversos tipos celulares, assim como diferentes citocinas, foram detectados em quantidades variáveis em modelos experimentais e em lesões periapicais (MARÇAL et al., 2010; PEIXOTO et al., 2012; COLIC´et al., 2009 (b); ANDRADE et al., 2013; ARAUJO-PIRES et al., 2014).

Entender as condições que favorecem a indução, acúmulo e função de células que regulam as reações imuno-inflamatórias é fundamental para definir a patofisiologia de doenças imuno-mediadas e para desenvolver novas intervenções terapêuticas (HOEPLI et al., 2015).

2. REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão da literatura foi desenvolvida com o objetivo de proporcionar um embasamento teórico e científico sobre o perfil das células inflamatórias e o papel da resposta imune, principalmente das células T reguladoras, na formação de CR.

Bactérias e seus subprodutos, atuando como antígenos em um dente desvitalizado, podem desencadear respostas inflamatórias inespecíficas, bem como reações imunológicas específicas nos tecidos perirradiculares. A mobilização dos mecanismos de defesa na tentativa de eliminar o agente agressor pode também destruir o tecido normal e induzir à reabsorção óssea e destruição do ligamento periodontal adjacente. Esta resposta imunopatológica resulta no desenvolvimento de lesões inflamatórias, como é o caso dos CR e é consequência das reações de defesa locais frente à invasão bacteriana (LIAPATAS; NAKOU; RONTOGIANNI, 2003; PEIXOTO; PEIXOTO, 2012).

O cisto radicular tem origem inflamatória e representa uma cavidade patológica, revestida internamente por epitélio odontogênico, que contém, no seu interior, um material fluido ou semi-fluido, e constituída externamente por um tecido fibroso. É uma consequência das respostas imunopatológicas que levam à formação de tecido granulomatoso na região periapical como resultado de um processo de reparação subsequente à inflamação local crônica; uma reação secundária e defensiva do hospedeiro na tentativa de controlar a progressão do processo infeccioso. Remanescentes epiteliais de Malassez dentro ou adjacentes ao tecido de granulação são estimulados a proliferar, um evento que pode resultar no desenvolvimento do CR (LIAPATAS; NAKOU; RONTOGIANNI, 2003; PEIXOTO et al., 2012; SANTOS et al., 2006).

Em geral, os pacientes com cistos radiculares não apresentam sintomas, a menos que exista uma exacerbação inflamatória aguda. Além disso, se o cisto atingir um tamanho grande, podem ser observadas tumefação e sensibilidade leve. Com o crescimento do cisto, podem ocorrer mobilidade e deslocamento dos dentes adjacentes. O dente de origem não responde ao teste pulpar térmico e elétrico (NEVILLE et al., 2009).

Os cistos podem desenvolver-se mesmo como imagens radiolúcidas periapicais pequenas. Observa-se perda da lâmina dura ao longo da raiz adjacente e uma imagem radiolúcida arredondada circunda o ápice do dente acometido. A reabsorção radicular é comum. O tratamento consiste em terapia endodôntica ou extração do dente acometido (NEVILLE et al., 2009).

Reações imunológicas em doenças periapicais crônicas possuem tanto um caráter inespecífico quanto específico. O primeiro é caracterizado por alterações vasculares e produção de mediadores químicos inflamatórios, enquanto o segundo pode ser classificado em dois tipos: humoral e celular. A resposta humoral pode ser mediada pelo complexo antígeno-anticorpo ou reações imunoglobulina-dependentes. Já a resposta celular é mediada principalmente pelos linfócitos T e B (SANTOS et al., 2006).

A resposta do hospedeiro é complexa; envolve tanto o recrutamento de diferentes células inflamatórias, quanto a participação de uma extensa rede de mecanismos imunológicos, incluindo a produção de citocinas. Os leucócitos, especialmente, neutrófilos e macrófagos estão envolvidos tanto no controle da infecção quanto no desenvolvimento da lesão. Os neutrófilos são recrutados para o local da inflamação durante a fase aguda do processo inflamatório. O final da fase aguda é caracterizado pelo recrutamento de macrófagos, o que também contribui para

a eliminação ou contenção dos estímulos inflamatórios. À medida que a doença progride para a fase crônica, o infiltrado inflamatório passa a conter vários subtipos de linfócitos T e elementos humorais da imunidade adaptativa (ALSHWAIMI et al., 2009; GARLET et al., 2010).

A composição do infiltrado celular depende do tipo de resposta imune (específica ou não específica) aos antígenos bacterianos, da duração dos processos inflamatórios e imunológicos, da destruição óssea, e da competência imunológica geral do hospedeiro (COLIC' et al., 2006).

A imunidade adaptativa é antígeno-específica, e serve para reforçar os mecanismos protetores da imunidade inata inespecífica. Ele também é conhecido como imunidade adquirida para enfatizar o fato de que essas respostas protetoras potentes são adquiridas ou aprendidas como consequência de uma experiência. A estimulação da resposta imune inata leva à ativação da imunidade adquirida, particularmente de células T ($CD3^+$), as quais podem ter fenótipo auxiliar ($CD4^+$) ou citotóxico/supressor ($CD8^+$) e células B ($CD20^+$). Estas células são caracterizadas pela sua capacidade de reconhecer uma grande variedade de antígenos, através de seus diferentes receptores, e de gerar memória imunológica. Mastócitos e macrófagos são também componentes do infiltrado inflamatório em conjunto com os linfócitos B e T. Estas células desempenham um papel fundamental nos mecanismos celulares envolvidos na inflamação crônica (ZIZZI et al., 2010; HAHN; LIEWEHR, 2007).

Os produtos dos linfócitos T e B incluem quimiocinas inflamatórias, citocinas e anticorpos. Quimiocinas inflamatórias direcionam o tráfego de células do sistema imunológico e citocinas induzidas durante a ativação de células T para regular respostas imunes e inflamatórias. Muitas citocinas produzidas por células imunes inatas são secretadas por células T ativadas na imunidade adaptativa. Por exemplo,

o interferon-gama (IFN- γ), que aumenta a fagocitose, é secretado por células natural killer (NK) na resposta imune inata, e também por células T efetoras da imunidade adaptativa. O fator de crescimento transformador beta (TGF- β), que atrai as células imunológicas, mas inibe a proliferação de células T e B e as funções dos macrófagos, é produzido por macrófagos e odontoblastos na resposta inata, e também por células T regulatórias (Treg) na resposta imune adaptativa. As citocinas só são induzidas por células T ativadas. Os anticorpos produzidos por células B ativadas são capazes de neutralizar as toxinas bacterianas ou prevenir a aderência bacteriana. Os anticorpos também podem funcionar como opsoninas para a fagocitose de bactérias extracelulares, tais como aquelas encontradas na cárie. O resultado final da imunidade adaptativa é uma resposta inflamatória exagerada (inflamação imunológica) que se destina a eliminar a infecção. No entanto, se a fonte de infecção (por exemplo, a cárie) não é eliminada, a inflamação imunológica na pulpite conduz eventualmente à destruição irreversível da polpa (HAHN; LIEWEHR, 2007).

A resposta imunológica humoral, mediada por linfócitos B, é o principal mecanismo contra micro-organismos extracelulares e suas toxinas, uma vez que os anticorpos se ligam a eles a fim de facilitar a sua remoção. Linfócitos B e seus derivados e plasmócitos produtores de IgG, IgA e IgM são habitualmente encontrados em grande número nos tecidos de granulação perirradiculares. Embora os linfócitos B e os plasmócitos representem a maior população no infiltrado inflamatório perirradicular, métodos quantitativos para a determinação das subpopulações de linfócitos têm demonstrado consistentemente que há um excesso de células T em comparação com os linfócitos B, indicando que os granulomas perirradiculares são compostos predominantemente pelas primeiras. A imunidade celular, mediada pelos linfócitos T, promove a destruição de células infectadas por micro-organismos

intracelulares, já que os anticorpos não são capazes de atrair estes antígenos (ZIZZI et al., 2010; MARTON; KISS, 2000).

Os linfócitos T auxiliares (T helper – Th) reconhecem os antígenos que são normalmente expressos pelas células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Sob diferentes estímulos, essas células podem assumir dois diferentes fenótipos, passando a ser denominadas células Th1 e Th2, distinguidas com base no perfil de citocinas produzidas por elas. As citocinas controlam a migração e a proliferação de células. Consistem de pequenas proteínas ou peptídeos, algumas das quais envolvidas na emissão de sinais entre células da resposta imune. Exercem sua ação de forma parácrina ou autócrina e são classificadas basicamente em interferons (INF), interleucinas (IL) e fatores estimuladores de colônias. As células Th1 produzem citocinas características denominadas IL-2, IL-12, Fator de Necrose Tumoral β (TNF- β) e principalmente interferon gama (IFN- γ), enquanto que as células Th2 secretam ativamente IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (PEIXOTO; PEIXOTO, 2012; SANTOS et al., 2009).

Fatores tais como a quantidade e tipo de citocinas, a natureza do antígeno e a expressão adequada de receptores e moléculas de co-estimulação, assim como o tipo de células apresentadoras de antígenos e a constituição genética do hospedeiro, modulam a progressão e gravidade de processos inflamatórios e influenciam o tipo de resposta do hospedeiro (PEIXOTO et al., 2012).

Embora as respostas Th1 / Th2 sejam induzidas por citocinas, os dois tipos de respostas efetoras são reguladas por uma família heterogênea de células, conhecidas como células T reguladoras (Treg). Estas células desempenham um papel importante na modulação de respostas imunes, a indução e manutenção da tolerância imunológica, e também na prevenção de doenças auto-imunes. O mecanismo de ação

das células Treg envolve a supressão direta da ativação dos linfócitos T e B e de células natural killers (NK), através de mecanismos celulares mediados por moléculas de superfície, tais como o antígeno associado a linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4), ou por meio da síntese de citocinas imunossupressoras, tais como a IL-10 e o fator TGF- β (Tabela 1). Atualmente, o fator de transcrição forkhead box P3 (FoxP3) é o melhor e mais confiável marcador imuno-histoquímico para células Treg. A função básica desta proteína é regular a atividade destas células (PEIXOTO et al., 2012).

Etapas de Treg	Citocina	Espécies	Função das citocinas
Desenvolvimento no timo	IL-2, IL-15	Rato	Orienta o desenvolvimento de tTregs pela indução de FoxP3 via STAT5
	IL-17	Rato	Promove o desenvolvimento de Treg na ausência de IL-2/IL-15
	TGF- β	Rato	Induz expressão de FoxP3
Desenvolvimento periférico	IL-2	Rato	Importante para o desenvolvimento de pTreg induzido por TGF- β Diminui a expressão de IL-6R, previne diferenciação de Th17
	TGF- β	Rato	Induz expressão de FoxP3 em células TCD4 ⁺ naïve <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
		Humano	Induz expressão de FoxP3 em células TCD4 ⁺ naïve <i>in vitro</i>
Homeostasia	TNF- α	Rato	Prejudica a diferenciação de pTreg induzida por TGF- β
	IL-2	Rato	Regula positivamente proteínas pró-sobrevivência Envolvida na homeostasia de pTreg Mantém a expressão de Treg GATA3, a qual suprime indução de T-bet e ROR γ T
		Rato/Humano	Controla o tamanho de Treg pool <i>in vivo</i> Induz e estabiliza FoxP3, regula moléculas de assinatura Treg chave
		Rato	Promove homeostasia de Tregs memória IL-7R α ⁺ na pele
		Rato	Promove homeostasia de Tregs memória IL-15R β ⁺ que se acumulam com a idade
	IL-33	Rato	Induz proliferação de Treg ST2 ⁺ do cólon, aumenta diferenciação de Treg ST2 ⁺ induzida por TGF- β <i>in vitro</i>
		Rato	Induz proliferação de Treg FoxP3 ⁺ CD4 ⁺ <i>in vivo</i>
Função	TNF- α	Humano	Reduz a expressão dos níveis de proteína e RNAm FoxP3 em Tregs Barreira de membrana TNF- α : reduz a capacidade supressiva de Tregs
		Rato	Prejudica a função de Tregs
Diferenciação	IL-4	Rato	Aumenta a função e proliferação de Tregs Induz diferenciação de Th9 na presença de TGF- β
	TGF- β + IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23, TNF- α , TGF- β + IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23 IL-23	Rato	Induz diferenciação de Th17 e mantém células Th17
		Humano	Induz diferenciação de Th17 e secreção de IL-17
		Rato	Inibe diferenciação de Treg <i>in vitro</i> e acúmulo de Treg no intestino
Th como Tregs/ex Tregs	IL-6	Rato	Induz secreção de IL-17 e conversão de Treg em Th17
	IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-15, IL-21, IL-23 IL-12	Humano	A combinação dessas citocinas induz secreção de IL-17 por Tregs
		Humano	Induz expressão de Tbet, CXCR3, e produção de IFN γ em Tregs
	IL-12, IL-27, IFN γ	Rato	Induz expressão de Tbet, CXCR3, e produção de IFN γ em Tregs

Fonte: Hoeppli et al. (2015).

2.1 Linfócitos T reguladores

Todo processo fisiológico precisa ser controlado e revertido após ter atingido seu objetivo. Sem supressão, os processos fisiológicos correm alto risco de se tornarem patológicos. Assim, a regulação negativa é de extrema importância. Isto se aplica, em especial, às reações imunológicas. A regulação negativa imunológica leva as respostas imunes ao fim (BEISSERT; SCHWARZ; SCHWARZ, 2006).

Todo o conceito de células supressoras foi reavivado por alguns artigos publicados em meados dos anos 1990. As células T regulatórias foram inicialmente descritas como células que suprimem respostas imunes antígeno-específicas e regulam negativamente a resposta imunológica. Posteriormente, foi identificada uma população, chamada de células T reguladoras/supressoras CD4⁺ CD25⁺, que é anérgica mas também supressiva (BEISSERT; SCHWARZ; SCHWARZ, 2006).

O estudo das Tregs está progredindo a um novo nível, onde a necessidade de demonstrar a sua existência foi substituída pela necessidade de entender sua biologia de modo que seu uso terapêutico vai se tornar uma realidade. A literatura atual sugere que as células Treg naturais CD4⁺ CD25⁺ atuam principalmente suprimindo respostas imunológicas próprias, enquanto subtipos adaptáveis de Tregs mantêm principalmente o controle homeostático sobre várias respostas imunes adquiridas (Tabela 2). A capacidade para induzir ou expandir Tregs *in vitro* ou *in vivo* pode ter implicações importantes no campo da auto-imunidade e inflamação (BEISSERT; SCHWARZ; SCHWARZ, 2006).

Tabela 2. Subtipos de células T regulatórias naturais e induzidas.

Subtipo de Treg	Mecanismos reguladores	Fator de transcrição expresso	Células alvo	Função
Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺	Dependente de contato celular, citocinas (IL-10?)	FoxP3	Células T, APC	Supressão de auto-imunidade, inibição da rejeição a enxertos alógenos e de respostas imunes induzidas por infecções microbianas, mediação de imunossupressão induzida por raios UV
Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺	Principalmente mediado por citocinas	FoxP3(?)	Células T/B, APC	Supressão de auto-imunidade
Tr1	Mediado por IL-10	FoxP3(?)	Células T	Supressão de auto-imunidade
Th3	Mediado por TGF- β	?	Células T	Supressão de auto-imunidade
Treg NK	IL-4, IL-10, TGF- β , citotoxicidade	?	Células T, APC, células tumorais	Eliminação de tumores e patógenos, supressão de auto-imunidade, mediação da supressão da imunidade tumoral protetora induzida por raios UV
Treg CD8 ⁺	Dependente de contato celular, citotoxicidade, e citocinas (?)	FoxP3(?)	Células T	Supressão de auto-imunidade, regulação do repertório de receptores de células T periféricos
Treg CD8 ⁺ CD28 ⁻	Indução de ILT3/ILT4 em células dendríticas	FoxP3(?)	Células dendríticas, APC	Regulação de auto-imunidade (?)

Fonte: Beissert et al. (2006).

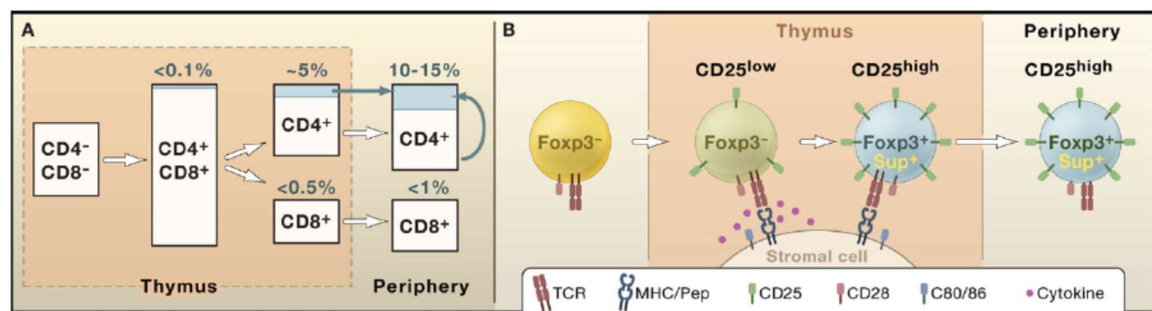
A interrupção no desenvolvimento ou função de Tregs é a principal causa de doenças auto-imunes e inflamatórias em seres humanos e animais. Além disso, cada resposta imune adaptativa envolve o recrutamento e ativação de células efectoras não só T e B, mas também Tregs, e o equilíbrio entre as duas populações é crítica para o controle adequado da qualidade e da magnitude das respostas imunes adaptativas e para estabelecer ou romper a tolerância a auto-antígenos e antígenos externos (SAKAGUCHI et al., 2008).

Notavelmente, o esgotamento de Tregs naturais não só provoca a auto-imunidade, mas também aumenta a resposta imunológica a antígenos próprios e externos. Depleção de Tregs produz doença inflamatória do intestino, o que provavelmente resulta de respostas imunológicas excessivas para bactérias comensais do intestino. A remoção ou redução de Tregs CD4⁺ CD25⁺ também provoca imunidade tumoral em animais não responsivos e aumenta a imunidade microbiana em infecção crônica, levando a erradicação de tumores ou micro-organismos, respectivamente. Por outro lado, o reforço de células T CD25⁺ CD4⁺ em ratos normais suprime alergia, estabelece tolerância a enxertos de órgãos, previne a doença do enxerto contra o hospedeiro após transplante de medula óssea, e promove a tolerância materno-fetal (SAKAGUCHI et al., 2008).

Basicamente, existem dois tipos principais de Tregs CD4⁺ CD25⁺, as células Tregs CD4⁺ CD25⁺ que ocorrem naturalmente (nTregs), originalmente produzidas no timo, e as células CD25⁺ CD4⁺ Tregs induzidas (iTreg) produzidas na periferia (ZANG; ZHAO, 2007).

Células T reguladoras naturais (nTreg) são uma subpopulação de células T que é especializada na supressão imunológica e envolvida na manutenção da auto-tolerância e homeostasia imunológica. A maioria delas é produzida pelo timo, como uma sub-população de células T funcionalmente distinta e madura, migrando e se instalando na periferia. Os esforços para caracterizar tais células nTreg por meio de marcadores de superfície celular específicos, revelaram-nas como células T CD4⁺ que expressam a proteína CD25 (cadeia α do receptor para IL-2), os quais constituem cerca de 10% das células T CD4⁺ periféricas em roedores e seres humanos normais (SAKAGUCHI et al., 2008; ZANG; ZHAO, 2007; MORIKAWA; SAKAGUCHI, 2014).

As células nTreg $CD4^+CD25^+$ expressam especificamente o fator de transcrição FoxP3, um membro da família de fatores de transcrição forkhead / winged-helix, o qual é crucial para a função das células Treg (Figura 1). Mutações de FoxP3 prejudicam o desenvolvimento e função de células nTreg, levando a um distúrbio imunológico grave, chamado de síndrome IPEX (immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked) em seres humanos, e auto-imunidade sistêmica fatal, conhecida como doença de Scurfy, em roedores. Além disso, a expressão ectópica de Foxp3 é capaz de conferir atividade supressora de células T convencionais. Foxp3 é o regulador principal e um marcador molecular específico para células nTreg (SAKAGUCHI et al., 2008; ZANG; ZHAO, 2007; MORIKAWA; SAKAGUCHI, 2014).



(A) The composition of Foxp3⁺ cells in each thymocyte subpopulation is shown as a percentage. In the periphery, CD4⁺ non-Treg cells can differentiate to Foxp3⁺ Tregs under certain conditions.
(B) Development of Foxp3⁺ Tregs in the thymus involves interaction with thymic stromal cells via various molecules. Foxp3⁻ thymocytes at a late CD4⁺CD8⁺ or an early CD4⁺CD8⁺ stage turn on a Treg differentiation program when they receive signals produced by the interaction between their TCRs and MHC/self-peptide complexes on thymic stromal cells, between their accessory molecules (e.g., CD28) and their ligands (e.g., CD80 and CD86), and/or via stromal cell-derived humoral factors (e.g., cytokines). Foxp3 expression following cell fate determination confers suppressive activity and stabilizes Treg function and phenotype (e.g., CD25 expression). Blue indicates that the thymocyte has a suppressive function (Sup+).

Figura 1. Desenvolvimento de células Foxp3⁺ no timo. Fonte: Sakaguchi et al. (2008).

A expressão de Foxp3 é a característica mais específica que distingue células Treg de outras linhagens Th. Como o fator de transcrição de especificação de linhagem de células Treg, a expressão de Foxp3 é necessária para a diferenciação de células Treg. A deleção da linhagem germinativa do gene Foxp3 conduz a

deficiência de células Treg e o desenvolvimento de síndrome autoimune letal. Além do seu papel na diferenciação de Treg, a expressão contínua de Foxp3 é também necessária em células Treg maduras para a sua função supressora e a manifestação plena das principais características das células Treg. A supressão de Foxp3 em células Treg totalmente maduras e diferenciadas resulta na desregulação dos seus genes-alvo e na perda da função de supressão. Foxp3 ajuda a evitar que as células Treg adquiriram destinos alternativos já que a ablação ou atenuação grave da expressão de Foxp3 leva à expressão de genes de citocinas efetoras que são característicos de outras linhagens de células CD4 auxiliares (LI; ZHENG, 2015).

2.2 Aspectos imunológicos das lesões periapicais inflamatórias

A resposta imune patológica aos estímulos oriundos dos canais radiculares infectados resulta no desenvolvimento de lesões inflamatórias periapicais. Os GP e CR representam dois estágios de desenvolvimento diferentes do mesmo processo inflamatório. Fatores derivados do hospedeiro como as citocinas estão envolvidas em sua patogênese (HREN; IHAN, 2009).

Acredita-se que a resposta imune de T-helper 1 (Th1) está envolvida na progressão da lesão e destruição óssea, enquanto que as citocinas de Th2 estimulam a imunidade humoral e restringem os mecanismos imunitários/inflamatórios (COLIC'et al., 2009(b); BRITO et al., 2012).

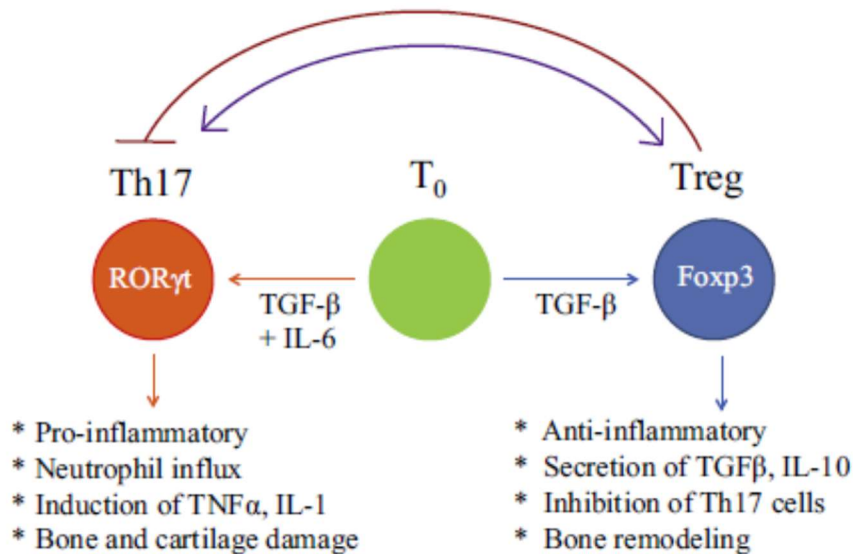
Vários mecanismos estão envolvidos nas alterações patológicas associadas a lesões periapicais. O conceito dos subtipos de células TCD4⁺ auxiliares Th1 como pró-inflamatório e Th2 como anti-inflamatório atuando como imunomoduladores de respostas imunológicas e doenças inflamatórias deve ser revisto, pois os dados mais recentes sugerem que a IL-17 (produzida por células Th) é diferente dos subtipos

tradicionais Th1 e Th2. Além do arquétipo TH1/Th2, Células Th17 emergem como um subtipo de células T com propriedades inflamatórias envolvidas em uma série de processos infecciosos, auto-imunes e osteolíticos. Enquanto a citocina tipicamente expressa por Th17 seja a IL-17, essas células podem produzir outras citocinas efetoras com propriedades osteoclastogênicas, como a IL-6 e IL-23, reforçando o potencial destrutivo de Th17 nas lesões periapicais. IL-23 induz a diferenciação de células T CD4⁺ indiferenciadas em células Th altamente patogênicas Th17, que produzem IL-17, IL-17F, IL-6 e TNF- α , mas não IFN- γ e IL-4. A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que contribui para a destruição do osso na artrite reumatóide pela estimulação de vários mediadores da inflamação como IL-1, IL-6, TNF-alfa, NOS-2, quimiocinas, etc., mas é essencial na defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos sensíveis aos neutrófilos. Considerando que a IL-17 destrói claramente o osso no contexto da artrite, os seus efeitos potentes sobre os neutrófilos sugerem que a IL-17 poderia desempenhar um papel de defesa na doença periodontal, exercendo um efeito protetor do osso. A função da IL-17 é, em geral, de proteção óssea, em grande parte através do controle da expressão de quimiocinas e recrutamento de neutrófilos (MORIKAWA; SAKAGUCHI, 2014; ARAUJO-PIRES et al., 2014).

Especula-se que a IL-17 apesar de exercer efeitos protetores está também envolvida na destruição do osso durante o aparecimento e desenvolvimento de lesões periapicais. Esta citocina pode ser um dos fatores que estimulam a expressão de efetores inflamatórios, com a maioria deles atuando sobre o metabolismo do osso, promovendo a osteoclastogênese. Além disso, a IL-17 participa no recrutamento e a ativação de neutrófilos e protege contra a perda de osso alveolar induzida por infecção nas lesões periapicais (ANDRADE et al., 2013).

Colic' et al. (2007) mostraram que uma produção significativamente alta de IL-17 por células mononucleares de lesões periapicais sintomáticas, caracterizada pelo acúmulo de neutrófilos e aumento na produção de IL-8, exerceu um papel na exacerbação da inflamação crônica em lesões periapicais.

A IL-17 secretada pelas células Th17 e o TGF- β produzido por células Treg, têm efeitos modulatórios opostos sobre o processo inflamatório, embora eles não exerçam efeitos inibidores mútuos. Na presença de IL-6, TGF- β contribui para o desenvolvimento de uma resposta de células Th17. Considerando que TGF- β é um potente modulador da resposta imunitária, a IL-17 é capaz de reativar o processo inflamatório, incluindo a indução de inflamação caracterizada pela presença de neutrófilos. Assim, a quantidade de TGF- β , bem como a presença ou ausência de citocinas pró-inflamatórias, determina o equilíbrio entre a expressão de fatores de transcrição, tais como Foxp3 e receptor órfão relacionado ao ácido retinóico gama T (ROR γ t) e, conseqüentemente, se o perfil de resposta imune será do tipo Th17 ou Treg (Figura 2) (MARÇAL et al., 2010).



Th17 cells secrete IL-17 and IL-22 and express the transcription factor retinoic acid-related orphan receptor gamma t (ROR γ t), whereas Treg cells secrete TGF- β and IL-10 and express the transcription factor forkhead box p3 (Foxp3). Furthermore, Treg cells can inhibit Th17 cell activity (—). For example, in the case of autoimmune arthritis, Th17 cells play a key role in inducing inflammation and tissue damage in the joint, whereas Treg cells have anti-inflammatory and immunoregulatory activities and facilitate regression of inflammation and tissue repair. Under certain circumstances, Treg cells can convert into Th17 cells and vice versa ($\longleftrightarrow$). This plasticity can potentially either be detrimental or beneficial depending on the direction of switch.

Figura 2. Um desequilíbrio entre células T helper 17 (Th17) e células T reguladoras (Tregs) contribui para uma doença imunológica. Uma célula T indiferenciada (T0) pode diferenciar-se em um subconjunto específico de células T após a sua ativação na presença de uma ou mais citocinas específicas. Fonte: Moudgil (2015).

Curiosamente, foi sugerido que o arquétipo Th17 / Tregs influencia o desfecho de lesões periapicais (ARAUJO-PIRES et al., 2014).

Muitas pesquisas vêm tentando esclarecer o perfil das células inflamatórias e o papel da resposta imune na formação de lesões periapicais crônicas com o intuito de melhor compreender sua etiopatogenia. No entanto, estudos que investiguem a presença e a função das células T reguladoras ainda são escassos, assim como pouco se sabe sobre como o conjunto de citocinas envolvidas no desenvolvimento e na manutenção de processos inflamatórios crônicos é regulado e como o perfil destas citocinas está correlacionado com a composição do infiltrado inflamatório. Essas

informações devem contribuir para um melhor entendimento da imunopatogênese e, consequentemente, do desenvolvimento e da gravidade das lesões periapicais.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de células T reguladoras e fazer associação com características histológicas de cistos radiculares diagnosticados pelo laboratório de Patologia Oral da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1 Revisar histologicamente casos de cistos radiculares diagnosticados pelo laboratório de Patologia Oral da UFPE;

3.2 Quantificar a expressão de linfócitos T CD4⁺, CD25⁺ e FoxP3⁺ nos cistos radiculares;

3.3 Quantificar a expressão das citocinas IL10 e IL17 nos cistos radiculares;

3.4 Verificar a correlação da expressão desses marcadores com a intensidade do infiltrado inflamatório e com a espessura do revestimento epitelial cístico.

4. RESULTADOS

Os resultados da pesquisa encontram-se apresentados em forma de artigo, os quais estão dispostos no Apêndice A deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. ALSHWAIMI, E.; PURCELL, P.; KAWAI, T. et al. Regulatory T Cells in Mouse Periapical Lesions. **Journal of Endodontics**, v. 35, n.9, p.1229–1233, 2009.
2. ANDRADE, A. L. D. L.; NONAKA, C. F. W.; GORDÓN-NÚÑEZ, M. A. et al. Immunoexpression of Interleukin 17, Transforming Growth Factor β 1, and Forkhead Box P3 in Periapical Granulomas, Radicular Cysts, and Residual Radicular Cysts. **Journal of Endodontics**, v.39, n. 8, p.990-994, 2013.
3. ARAUJO-PIRES, A. C.; FRANCISCONI, C. F.; BIGUETTI, C. C. et al. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. **Journal of Applied Oral Science**, v. 22, n. 4, p.336-346, 2014.
4. BEISSERT, S.; SCHWARZ, A.; SCHWARZ, T. Regulatory T cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 15-24, 2006.
5. BRITO, L. C. N.; TELES, F. R. F.; TELES, R. P. et al. T-Lymphocyte and Cytokine Expression in Human Inflammatory Periapical Lesions. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 4, p.481-485, 2012.
6. COLIC', M.; GAZIVODA, D.; VUCEVIC', D. et al. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. **Molecular Immunology**, v. 47, p.101-113, 2009 (a).
7. COLIC', M.; LUKIC', A.; VUCEVIC', D. et al. Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines. **Archives of Oral Biology**, v.51, p.1120-1130, 2006.
8. COLIC', M.; GAZIVODA, D.; VUCEVIC', D. et al. Regulatory T-cells in Periapical Lesions. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 11, p.997-1002, 2009 (b).
9. COLIC', M.; VASILIJIC', S.; GAZIVODA, D. et al. Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. **European Journal of Oral Science**, v. 115, p. 315-320, 2007.
10. FUKADA, S. Y.; SILVA, T. A.; GARLET, G. P. et al. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 24, p. 25-31, 2009.
11. GARLET, T. P.; FUKADA, S. Y.; SACONATO, I. F. et al. CCR2 Deficiency Results in Increased Osteolysis in Experimental Periapical Lesions in Mice. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 2, p. 244-250, 2010.
12. HAHN, C. L.; LIEWEHR, F. R. Update on the Adaptive Immune Responses of the Dental Pulp. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 7, p. 773-781, 2007.

13. HOEPPLI, R. E.; WU, D.; COOK, L.; LEVINGS, M. K. The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 61, p. 1-14, 2015.
14. HREN, N. I.; IHAN, A. T lymphocyte activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts. **Archives of Oral Biology**, v. 54, p. 156-161, 2009.
15. LI, X.; ZHENG, Y. Regulatory T cell identity: formation and maintenance. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 6, p. 344-353, 2015.
16. LIAPATAS, S.; NAKOU, M.; RONTOGIANNI, D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. **International Endodontic Journal**, v. 36, p. 464-471, 2003.
17. MARÇAL, J. R. B.; SAMUEL, R. O.; FERNANDES, D. et al. T-Helper Cell Type 17/Regulatory T-Cell Immunoregulatory Balance in Human Radicular Cysts and Periapical Granulomas. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 6, p. 995-999, 2010.
18. MÁRTON, I. J.; KISS, C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 15, p. 139-150, 2000.
19. MORIKAWA, H.; SAKAGUCHI, S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. **Immunological Reviews**, v. 259, p. 192-205, 2014.
20. MOUDGIL, K. D. Interplay among cytokines and T cell subsets in the progression and control of immune-mediated diseases. **Cytokine**, v. 74, p.1-4, 2015.
21. NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M.; BOUQUOT, J. E. Patologia Oral e Maxilofacial. 3.ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2009.
22. PAULA-SILVA, F. W. G.; D'SILVA, N. J.; DA SILVA, L. A. B.; KAPILA, Y. L. High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 9, p. 1234-1242, 2009.
23. PEIXOTO, R. F.; PEIXOTO, D. F. Aspectos Imunológicos e Etiopatogênicos das Lesões Periapicais Inflamatórias Crônicas. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e Saúde**, v. 14, n. 3, p.175-182, 2012.
24. PEIXOTO, R. F.; PEREIRA, J. S.; NONAKA, C. F. W.; DA SILVEIRA, E. J. D.; MIGUEL, M. C. C. Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. **Archives of Oral Biology**, v. 57, p.1159-1164, 2012.
25. SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ONO, M. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, v. 133, n. 30, p. 775-787, 2008.
26. SANTOS, L. C. S.; AZEVEDO, R. A.; MEIRA, T. M. et al. Etiopatogenia do cisto radicular. Parte II. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 8, n. 2, p. 219-224, 2009.

27. SANTOS, L. C. S.; RAMOS, E. A. G.; MEIRA, T. M. et al. Etiopatogenia do cisto radicular. Parte I. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 1, p. 69-74, 2006.
28. ZHANG, L.; ZHAO, Y. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4⁺CD25⁺T cells: multiple pathways on the road. **Journal of Cellular Physiology**, v. 211, p.590-597, 2007.
29. ZIZZI, A.; ASPRIELLO, S. D.; FERRANTE, L. et al. Immunohistochemical correlation between microvessel density and lymphoid infiltrate in radicular cysts. **Oral Diseases**, v. 19, p. 92-99, 2010.

APÊNDICE - ARTIGO

IMMUNOEXPRESSION OF CD4, CD25, IL-10, IL-17 AND FOXP3 IN RADICULAR CYSTS

Raphaella Silva Leandro Santos*, Danyel Elias da Cruz Perez*

*Dentistry Postgraduate Program, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Address requests for reprints to Dr Danyel Elias da Cruz Perez, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil CEP 50670-901. E-mail address: perezdec2003@yahoo.com.br.

ABSTRACT

Introduction: Little is known about T regulatory (Treg) lymphocytes and cytokines modulation in development and maintenance of radicular cysts (RC). In this perspective, the aim of this study was to evaluate immunoexpression of the markers CD4, CD25, interleukin-17 (IL-17) and interleukin-10 (IL-10) and forkhead box P3 (FoxP3) in RC and to correlate these findings with the histological features of these lesions. **Methods:** Fifty five RC tissue specimens were analyzed for their histological characteristics and submitted to immunohistochemical analysis using anti-CD4, anti-CD25, anti IL-10, anti-IL-17 and anti-FoxP3 antibodies. The results of immunoexpression were correlated with the intensity of the inflammatory infiltrate and thickness of the epithelial lining. **Results:** All cases were positive to all studied markers, but with different expression intensity. The immunoexpression of CD4, CD25, IL-10 and FoxP3 was weak for all evaluated cases, whereas IL-17 exhibited strong expression in all cases. In addition, IL-17 was expressed in both inflammatory and epithelial cells of cystic lining. No significant differences in the number of positive cells were observed in terms of the intensity of the inflammatory infiltrate or epithelial thickness. It was observed positive correlations between the immunoexpressions of IL-17 and FoxP3. **Conclusion:** The present results showed a less expressive participation of Treg cells in radicular cysts due to weak expression of CD4, CD25, IL-10 and FoxP3 in detriment to a more significant presence of IL-17.

Keywords: Radicular cyst, T-Lymphocytes, Regulatory, Immunohistochemistry, Interleukin-17.

INTRODUCTION

Periapical lesions represent a progression of bacterial infection from a necrotic tooth that spreads through the apical foramen and results in localized inflammatory response and concomitant bone resorption. Microbial antigens stimulate specific and nonspecific immune responses in periapical tissue. As a result of this process and the inability of host defense mechanisms to eradicate the infection, chronic periapical lesions develop in order to prevent microbial invasion. These lesions include periapical granulomas (PG) and radicular cysts (RC), both are believed to represent different stages of the same inflammatory process (1,2,3).

Both cellular and humoral specific immune responses are activated within periapical lesions. Among them T helper (Th) cells play an important role. Activated Th cells produce cytokines exerting different functions (4).

In this scenario, Th1 cytokines (IFN- γ , IL-12) have been associated with bone destruction and lesion progression, while its classic Th2 antagonists (IL-4, IL-10, and the recently described IL-33) are described to limit or attenuate the tissue damage. Beyond the Th1/Th2 archetype, Th17 cells emerged as a T subset with inflammatory properties involved in a series of infectious, autoimmune and osteolytic processes. While the prototypical Th17 cytokine is IL-17, Th17 cells can also produce other effector cytokines with osteoclastogenic properties, such as IL-6 and IL-23, reinforcing the potential destructive role of Th17 subset in periapical lesions. On the other hand, regulatory T cells (Tregs, a FoxP3⁺ CD4⁺ CD25⁺ subset) present suppressive effects on inflammatory osteolysis, thought to be mediated by cytokines such as TGF- β and IL-10 (5).

Treg cells play a major role in the modulation of immune responses, induction and maintenance of immune tolerance, and also in the prevention of autoimmune

diseases. At present, the forkhead box P3 (FoxP3) transcription factor is the best and most reliable immunohistochemical marker for Treg cells. The basic function of this protein is to regulate the activity of these cells (6).

Among the few studies that aimed to characterize the Treg cells in periapical lesions, there are no studies assessing IL-10, CD4, CD25 and FoxP3 together in RC, and no articles were found that attempted to identify the presence of CD25 in radicular cysts.

The IL-17 is proinflammatory cytokine which contributes to bone destruction in reumathoid arthritis by stimulation of multiple inflammation mediators as IL-1, IL-6, TNF-alpha, NOS-2, chemokines, etc.; but it is essential in host defense against pathogens susceptible to neutrophils (7). IL-17 is described as a potent inflammatory and osteoclastogenic factor, and was found in higher levels in active periapical lesions where it is supposed to exacerbate the inflammatory osteolytic process (5).

The Th17/Tregs archetype was suggested to influence the outcome of periapical lesions (5).

The role of the immune response and bone resorption in the formation of chronic periapical lesions has been extensively studied. However, little is known about the role of Treg cells in the modulation of the immune response in RC. In addition, it has not been fully established how the set of cytokines involved in the development and maintenance of chronic inflammatory processes is regulated and how the profile of these cytokines is correlated with the morphological aspects of the lesions (6,7).

The aim of this study was to evaluate the Treg/Th17 profile in radicular cysts by the immunoexpression of the markers CD4, CD25, FoxP3, IL-17 and IL-10 and to associate these findings with the intensity of the inflammatory infiltrate and thickness of the epithelial lining.

METHODS

Fifty five RC tissue specimens, archived in the files of the Department of Oral Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil, from 1991 to 2015 were selected for this study. The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco (protocol number: 1.059.335).

Histological Analysis:

For the histological analysis, 5- μ m-thick tissue sections were stained with hematoxylin-eosin. Tissue sections were examined by light microscopy (X100 magnification). The intensity of the inflammatory infiltrate was classified as discrete, moderate and intense according to Tsai et al (8).

The thickness of the epithelial lining was defined as atrophic (2–10 cell layers and flat epithelial/capsule boundary) or hyperplasic (>10 cell layers and undulating epithelial/capsule boundary often arranged into proliferating arcades) based on the predominant pattern in each case (7).

Immunohistochemical Methods:

For the immunohistochemical study, 3- μ m-thick sections were obtained from paraffin-embedded tissue blocks and deparaffinized. The sections were then washed in phosphate-buffered saline (PBS) and submitted to antigen retrieval. Antigen retrieval was performed in a pressure cooker for 4 min using a 10 mmol L) citrate buffer (pH 6.0). Histological sections were quenched of endogenous peroxidase with 3% aqueous hydrogen peroxidase (Merck, Rio de Janeiro, Brazil) for 20 min at room temperature, followed by a washing with 10 mmol L)1 phosphate buffered saline (pH 7.4) for 5 min. Incubations with the primary antibodies anti-IL-10 (monoclonal, dilution 1:200), anti-

IL17 (H-132 clone, dilution 1:100, Santa Cruz Technology), anti-CD4 (4B12 clone, dilution 1:100, Dako, Glostrup, Denmark), anti-CD25 (4C9 clone, dilution 1:50, Leica Biosystems, UK) and anti-FoxP3 (H-190 clone, dilution 1:50, Santa Cruz Technology) were performed for 18 h at 4°C. Next, the tissue sections were incubated with Post Primary Block for 30 min at 37° C (NovoLink Max Polymer, Novocastra, Newcastle, UK), followed by application of diaminobenzidine as the chromogen (Dako, Glostrup, Denmark), which resulted in a brown reaction product. Finally, the sections were counterstained with Carazzi hematoxylin and coverslipped. Positive and negative controls were treated as described previously except that, in the negative ones, the primary antibody was replaced with a solution of bovine serum albumin in PBS.

Immunostaining Assessment and Statistical Analysis:

Immunohistochemical analysis was performed in a blind fashion by 2 observers under an optic microscope (Leica, DM750, Frankfurt, Germany). Tissue sections were examined by light microscopy (X100 magnification) to identify 5 fields with the largest number of immunostained cells. Digital images of these 5 microscopic fields (X400 magnification) were acquired using an automatic digital slide scanner (Pannoramic MIDI, 3D Histech, Hungary). Immunoexpression intensity was determined by semi-quantitative analysis in each field, considering weak <10% of positive inflammatory cells, moderate 11-50% and strong >51% of positive inflammatory cells, permitting classification of each case by most prevalent immunoexpression intensity pattern.

The results obtained were initially submitted to descriptive statistical analysis. Besides this descriptive analysis, the comparisons were evaluated by the Fisher exact test, adopting a significance of 5%.

RESULTS

Histological Analysis:

The inflammatory infiltrate was intense in 23 cases (41,8%), discrete in 19 cases (34,5%) and moderate in 13 (23,6%). Acute inflammation characterized by the presence of neutrophils was observed in 3 cases (5,4%). Epithelial thickness was atrophic in 28 (50,9%) and hyperplastic in 27 cases (49,1%) (Table 1).

Immunohistochemical Analysis:

Immunoexpression of IL-17:

Analysis of the immunoexpression was positive for all evaluated cases of RC. All cases (n=55, 100%) showed strong expression of IL-17 positive cells. In addition, IL-17 was expressed in both inflammatory and epithelial cells of cystic lining (Figure 1).

Comparison of the median number of IL-17 positive cells in relation to the intensity of the inflammatory infiltrate revealed no statistically significant difference between groups ($p = 0.8$). Additionally, revealed no statistically significant differences in the median number of IL-17 positive cells between RC with atrophic epithelium and RC with hyperplastic epithelium ($p = 0.6$) (Table 1).

Immunoexpression of CD4, CD25, IL-10 and FoxP3:

Analysis of the immunoexpression of CD4, CD25, IL-10 and FoxP3 was positive but weak for all evaluated cases (n=55, 100%) of RC (Figure 1). Our samples did not indicate positive association between the number of FoxP3⁺ cells and the

immunoexpressions of IL-17, IL-10, CD4 and CD25. However, there was statistically significant difference between the number of FoxP3+ and the immunoexpression of IL-17 ($p < 0.001$).

No statistically significant difference between groups when compared the amount of positive cells in relation to both intensity of the inflammatory infiltrate ($p = 0.61; 0.7; 0.73; 0.64$) and epithelial thickness ($p = 0.52; p = 0.42; p = 0.61; p = 0.3$) (Table 1).

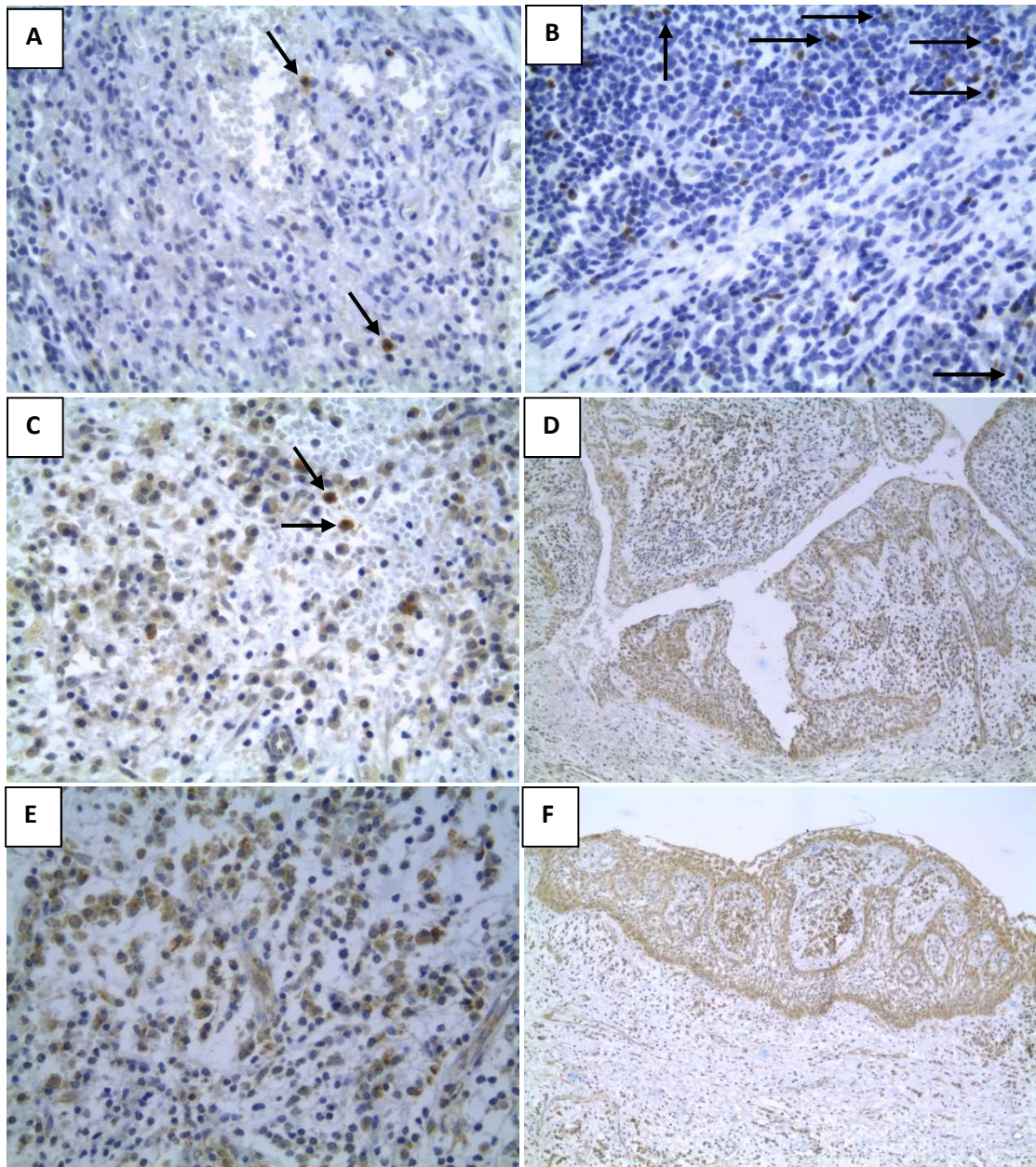


Figure 1. Representative photomicrographs of immunohistochemical staining of the studied markers in radicular cysts. (A) Immunohistochemical expression of CD-25 positive cells (arrows). (B) Immunohistochemical expression of FoxP3 positive cells (arrows). (C) Immunohistochemical expression of IL-10 positive cells (arrows). (D) Immunohistochemical expression of IL-17 showing staining in both inflammatory and epithelial cells of cystic lining. (E) Immunohistochemical expression of IL-17 showing staining only in inflammatory cells. (F) Immunohistochemical expression of IL-17 showing staining only in epithelial cells of cystic lining.

Table 1. Classification of immunoexpression of IL-17, CD4, CD25, IL-10 and FoxP3 in radicular cysts and their differences in relation to intensity of inflammatory infiltrate and epithelial thickness.

Variable		n(%)	IL-17 ⁺	CD4 ⁺	CD25 ⁺	IL-10 ⁺	FoxP3 ⁺
Intensity of inflammatory infiltrate	Discrete	19(34,5)	p=0.8*	p=0.61*	p=0.7*	p=0.73*	p=0.64*
	Moderate	13(23,6)					
	Intense	23(41,8)					
Epithelial thickness	Atrophic	28(50,9)	p=0.6*	p=0.52*	p=0.42*	p=0.61*	p=0.3*
	Hyperplasic	27(49,1)					

* Fisher exact test

DISCUSSION

Radicular cysts are the most common inflammatory cysts affecting the jawbones. They are related to extensive caries lesions, pulp necrosis and infection of the root canal. RC arise to control the infection as the low intensity chronic stimulus triggered by bacteria and their products provides conditions to the organism, confining the aggression to the periapical region (9).

Immunopathological studies have suggested an important role of T lymphocytes in RC development and enlargement (2,3,4,5,6,7,9,10,11, 12,13)

Natural Tregs, expressing CD4, CD25, and Foxp3, are key regulators of the immune response, including the control of any defense against infection (2).

Our results showed that all cases were positive to all studied markers, but with different expression intensity. The immunoexpression of CD4, CD25, IL-10 and FoxP3 was weak for all evaluated cases.

Immunohistochemical studies on experimental periapical lesions in rats confirmed that CD4⁺ T cells predominate in the early phase of lesion development, whereas in the chronic phase CD8⁺ T cells slightly outnumbered CD4⁺ cells. Some studies in humans have shown that the development of granulomatous infiltration in periapical tissue is associated with the influx of CD4⁺ T cells (14).

The development and function of Tregs are associated with IL-10 and TGF- β . Colic et al (2) showed that Treg cells in periapical lesions expressed IL-10 and TGF- β . Their frequency was significantly higher than in peripheral blood and correlated with the levels of TGF- β and IL-10 in culture supernatants of periapical lesion mononuclear cells. Tregs inhibited the proliferation of responder T-cells *in vitro*, at least in part, by stimulating the production of IL-10.

Fukada et al (3) investigated, among others variables, whether radicular cysts and granulomas, exhibit different balances of Treg markers. The authors showed that a greater expression of FoxP3 and IL-10 was seen in periapical granulomas in contrast with radicular cysts. Our results also showed weak expression of FoxP3 and IL-10 in radicular cysts.

AlShwaimi et al (10) quantified FoxP3⁺Treg cells infiltrated into periapical lesions after pulp exposure. Their results demonstrated the presence of FoxP3⁺ cells mainly at the periphery of periapical lesions. Our results differ from the cited authors, showing weak expression of FoxP3⁺ cells in all studied cases.

FoxP3 is a putative 'master gene' for Treg, and therefore serves as a unique and precise marker of this cell type. Recently it was demonstrated that FoxP3 also acts as an intrinsic negative regulator of T-cell proliferation and cytokine production (13).

Although FoxP3 expression is restricted to naturally occurring CD4⁺ regulatory T cells, TGF- β has been reported to modulate FoxP3 expression. TGF- β promotes the induction of IL-10-secreting CD4⁺ Tregs from precursors through *de novo* Foxp3 production and maintains natural Tregs peripheral homeostasis by sustaining Foxp3 expression. The T-cell immunosuppressive mechanisms mediated by TGF- β and IL-10 are responsible for healing processes and the restriction of the inflammatory/immune mechanisms in apical periodontitis (13). Campos et al (13) observed that FoxP3 mRNA expression was positively correlated with IL-10 and TGF- β levels in inactive periapical lesions. It is possible that such a correlation represents a protective mechanism in an attempt to avoid lesion progression and extensive bone destruction. The observed differential methylation profiles of FoxP3 in periapical lesions suggest that the expression of the FoxP3 gene as a marker for Tregs function

may be crucial to determine the balance between lesion progression and/or latency status.

Andrade et al (7) evaluated the immunoexpression of IL-17, TGF- β 1 and FoxP3 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. Cysts did not indicate positive correlations between the number of FoxP3⁺ cells and the immunoexpressions of IL-17 and TGF- β 1. The number of FoxP3⁺ cells was smaller in cysts than in granulomas, just like others previous studies (3,6). Our findings, however, showed statistically significant difference between the number of FoxP3⁺ cells and the immunoexpression of IL-17.

Regarding the correlation between Treg markers and the intensity of the inflammatory infiltrate and the thickness of the cystic epithelial lining, our results revealed no statistically significant difference between groups. Others studies also showed no statistically significant differences between Treg markers, considering the epithelial thickness (6,7).

According to Moreira et al (12), despite the presence of antigens able to induce immune responses, epithelial proliferation, and bone resorption, no cystic growth was observed in lesions with atrophic epithelium. Therefore, immunosuppressive effector molecules or apoptotic events may act during these stages, regulating cystic growth. In this perspective, the increased proliferative activity is influenced by the presence of inflammation at different levels in the capsule, whereas cysts lined by hyperplastic epithelium are more inflamed than those covered by atrophic epithelium (7).

Considering the correlation between immunoexpression and inflammatory infiltrate intensity, Peixoto et al (6) also observed no significant differences in the number of FoxP3⁺ cells in terms of the intensity of the inflammatory cells.

Unlike our results, Andrade et al (7) showed that lesions with intense inflammatory infiltrate exhibited a higher number of FoxP3⁺ cells in comparison with lesions with discrete and moderate inflammatory infiltrates. Similarly, in comparison with lesions with moderate and intense inflammatory infiltrates, lesions with discrete inflammatory infiltrate showed a tendency for a lower expression of IL-17 and TGF- β 1.

Our results exhibited strong expression of IL-17 in all cases of RC. IL-17 induces inflammatory responses, contributes to the development of Th1 immunity, and stimulates osteoclastic bone resorption in combination with receptor activator of nuclear factor kappa B and its ligand. It is speculated that IL-17 exerts protective effects and is also involved in bone destruction during the onset and development of periapical lesions. This cytokine may be one of the factors stimulating the expression of inflammatory effectors, with most of them acting on bone metabolism by promoting osteoclastogenesis. In addition, IL-17 participates in the recruitment and activation of neutrophils and protects against infection-induced alveolar bone loss in periapical lesions (7).

It is generally accepted that IL-17 primarily acts on stromal endothelial and epithelial cells, as well as on a subset of monocytes, to induce the secretion of proinflammatory mediators (14). In our study, IL-17 was expressed in both inflammatory and epithelial cells of cystic lining.

Although RC can present clinically as large expansible lesions, they show periods of nonproliferation and growth. These periods are not predictable, but can be assessed by the epithelium status of the cyst; this may be a reliable histological parameter of biological activity and/or inactivity of RC growth. On quiescent lesions, despite the presence of antigens and enzymes in the microenvironment able to induce immunological responses, epithelium proliferation and bone resorption, cyst

enlargement does not occur. Immunosuppressor effectors may operate in such phases in order to regulate RC enlargement (12). In our study, the presence of IL-17 was strong in the epithelium even in the lesion with atrophic lining.

Marçal et al (11) also observed high expression of IL-17 in periapical lesions. Significantly higher IL-17 levels were observed in cases of patients with reagudization process that is correlated with an increased leukocyte infiltration, with the predominance of neutrophils attracted by a chemokine milieu.

Araujo-Pires et al (5) simultaneously investigated the patterns of Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Thf, Tr1 and Tregs cytokines/markers expression in human periapical granulomas. According to the authors, a clear dichotomy exists in the profile of cytokine expression in inactive and active periapical lesions. While the widespread cytokine expression seems to be a feature of such chronic lesions, hierarchical cluster analysis demonstrates the association of TNF- α , IL-21, IL-17 and IFN- γ (ordered by their supposed destructive potential) with lesions' activity, and the association of Foxp3, IL-10, IL-9, IL-4 and IL-22 (ordered in its supposed protective potential) with lesions' inactivity.

Th17 and Treg cells seem to interact at the site of injury, suggesting the involvement of proinflammatory and immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of periapical lesions (7).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

CONCLUSION

The present results showed a less expressive participation of Treg cells in radicular cysts due to weak expression of CD4, CD25, IL-10 and FoxP3 in detriment to a more significant presence of IL-17.

REFERENCES

1. Paula-Silva FWG, D'Silva NJ, Da Silva LAB, Kapila YL. High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas. *J Endod* 2009; 35(9): 1234-42.
2. Colic' M, Gazivoda D, Vucevic' D, et al. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol* 2009;47:101–13.
3. Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, 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* 2009;24:25–31.
4. Colic' M, Lukic' A, Vucevic' D, et al. Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their *in vitro* production of Th1 and Th2 cytokines. *Arch Oral Biol* 2006;51: 1120—30.
5. Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Bigueti CC, et al. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(4):336-46.
6. Peixoto RF, Pereira JS, Nonaka CFW, Da Silveira EJD, Miguel MCC. Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. *Arch Oral Biol* 2012; 57:1159-64.
7. Andrade ALDL, Nonaka CFW, Gordón-Núñez MA, et al. Immunoexpression of Interleukin 17, Transforming Growth Factor b1, and Forkhead Box P3 in Periapical Granulomas, Radicular Cysts, and Residual Radicular Cysts. *J Endod* 2013;39(8):990–94.
8. Tsai CH, Weng SF, Yang LC, et al. Immunohistochemical localization of tissue-type plasminogen activator and type I plasminogen activator inhibitor in radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 2004;33:156–61.
9. Santos LCS, Vilas Bôas DS, Oliveira GQV. Histopathological Study of Radicular Cysts Diagnosed in a Brazilian Population. *Braz Dent J* 2011; 22(6): 449-454.
10. Alshwaimi E, Purcell P, Kawai T, et al. Regulatory T Cells in Mouse Periapical Lesions. *J Endod* 2009; 35(9): 1229–33.
11. Marçal JRB, Samuel RO, Fernandes D, et al. T-Helper Cell Type 17/Regulatory T-Cell Immunoregulatory Balance in Human Radicular Cysts and Periapical Granulomas. *J Endod* 2010; 36(6): 995–99.
12. Moreira PR, Santos DF, Martins RD, et al. CD57+ cells in radicular cyst. *Int Endod J* 2000;33:99–102.

13. Campos K, Franscisoni CF, Okehie V, et al. FOXP3 DNA Methylation Levels as a Potential Biomarker in the Development of Periapical Lesions. *J Endod* 2015;41:212–218.
14. Colic´ M, Gazivoda D, Vucevic´ D, et al. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol* 2009;47:101–13.

ANEXOS

ANEXO A

Guidelines for Publishing Papers in the JOE

Writing an effective article is a challenging assignment. The following guidelines are provided to assist authors in submitting manuscripts.

The *JOE* publishes original and review articles related to the scientific and applied aspects of endodontics. Moreover, the *JOE* has a diverse readership that includes full-time clinicians, full-time academicians, residents, students and scientists. Effective communication with this diverse readership requires careful attention to writing style.

General Points on Composition

Organization of Original Research Manuscripts

Manuscripts Category Classifications and Requirements

Available Resources

1. General Points on Composition

1. Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (*e.g.*, spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery since their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision, or have unacceptable grammar or syntax. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the *JOE*:
2. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c” below), or sentences with little to no transition within a paragraph.
3. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors’ names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, “In 1983, Langeland et al., reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al., 1983).” In this example, the paragraph’s subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.
4. Sentences are stronger when written in the active voice, *i.e.*, the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as “was,” “were,” “could,” etc. For example: “Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation,” can be edited to: “Our results demonstrated that

dexamethasone reduced inflammation.” Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.

5. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of focus or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph. (This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)
 6. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “Formerly, endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method,” can be edited to “Formerly, endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation.” The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.
 7. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used,” can be edited to “Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study.”
 8. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’s theme.
 9. Authors should be aware that the *JOE* uses iThenticate, plagiarism detection software, to assure originality and integrity of material published in the *Journal*. The use of copied sentences, even when present within quotation marks, is highly discouraged. Instead, the information of the original research should be expressed by new manuscript author’s own words, and a proper citation given at the end of the sentence. Plagiarism will not be tolerated and manuscripts will be rejected, or papers withdrawn after publication based on unethical actions by the authors. In addition, authors may be sanctioned for future publication.
2. **Organization of Original Research Manuscripts**

Please Note: All abstracts should be organized into sections that start with a one-word title (*in bold*), i.e., *Introduction, Methods, Results, Conclusions, etc.*, and should not exceed more than 250 words in length.

1. **Title Page:** The title should describe the major emphasis of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your advertising billboard—it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (e.g., use “sodium hypochlorite” rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at www.icmje.org). The manuscript title, name and address (including email) of one author designated as the corresponding author. This author will be responsible for editing proofs and ordering reprints when applicable. The contribution of each author should also be highlighted in the cover letter.
2. **Abstract:** The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings and conclusions. The abstract should describe the new

contributions made by this study. The word limitations (250 words) and the wide distribution of the abstract (e.g., PubMed) make this section challenging to write clearly. This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.

3. **Introduction:** The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address and the limitations of previous studies in the area. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be clearly described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the *JOE*. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to succinctly summarize the gap in knowledge that the study addresses. It is important to note that many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals. Therefore, authors should refrain from performing extensive review of the literature, and discussing the results of the study in this section.
4. **Materials and Methods:** The objective of the materials and methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The four components to this section are the detailed description of the materials used and their components, the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the essential aspects used in the present study. Thus, the reader should still be able to understand the method used in the experimental approach and concentration of the main reagents (e.g., antibodies, drugs, etc.) even when citing a previously published method. The inclusion of a “methods figure” will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a **commercial product**, the manuscript must state that they either followed manufacturer’s protocol or specify any changes made to the protocol. If the study used an *in vitro* model to simulate a clinical outcome, the authors must describe experiments made to validate the model, or previous literature that proved the clinical relevance of the model. Studies on **humans** must conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB/equivalent committee(s) approved the protocol and that informed consent was obtained after the risks and benefits of participation were described to the subjects or patients recruited. Studies involving **animals** must state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis as a basis for sample size computation, drop-outs from clinical trials, the effects of important confounding variables, and bivariate versus multivariate analysis.
5. **Results:** Only experimental results are appropriate in this section (*i.e.*, neither methods, discussion, nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study, as defined by the aim(s). Do not include all available data without justification; any repetitive findings will be rejected from publication. All Figures, Charts and Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings. Author may consider the use of supplemental figures, tables or video clips that will be published

online. Supplemental material is often used to provide additional information or control experiments that support the results section (e.g., microarray data).

6. **Figures:** There are two general types of figures. The first type of figures includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photo-, radio- or micrographs take up one column-width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two columns-width figure (*i.e.*, about 175 mm wide X 125 mm high when published in the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing to emphasize the most important feature of each photomicrograph, but it greatly increases the total number of illustrations that you can present in your paper. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (e.g., “A,” “B,” etc.), in order for the reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Jeger et al (J Endod 2012;38:884–888); Olivieri et al., (J Endod 2012;38:1007–1011); Tsai et al (J Endod 2012;38:965–970). Please note that color figures may be published at no cost to the authors and authors are encouraged to use color to enhance the value of the illustration. Please note that a multipanel, composite figure only counts as one figure when considering the total number of figures in a manuscript (see section 3, below, for maximum number of allowable figures).

The second type of figures are graphs (*i.e.*, line drawings including bar graphs) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen-treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

7. **Tables:** Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not be necessary:

% NaOCl	N/Group	% Inhibition of Growth
0.001	5	0
0.003	5	0
0.01	5	0
0.03	5	0
0.1	5	100
0.3	5	100
1	5	100

3	5	100
---	---	-----

8. Instead, the results could simply state that there was no inhibition of growth from 0.001-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03-3% NaOCl (N=5/group). Similarly, if the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure. These and many other suggestions on figure and table construction are described in additional detail in Day (1998).
 9. **Discussion:** This section should be used to interpret and explain the results. Both the strengths and weaknesses of the observations should be discussed. How do these findings compare to the published literature? What are the clinical implications? Although this last section might be tentative given the nature of a particular study, the authors should realize that even preliminary clinical implications might have value for the clinical readership. Ideally, a review of the potential clinical significance is the last section of the discussion. What are the major conclusions of the study? How does the data support these conclusions
 10. **Acknowledgments:** All authors must affirm that they have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past three years. Any other potential conflict of interest should be disclosed. Any author for whom this statement is not true must append a paragraph to the manuscript that fully discloses any financial or other interest that poses a conflict. Likewise the sources and correct attributions of all other grants, contracts or donations that funded the study must be disclosed
 11. **References:** The reference style follows Index Medicus and can be easily learned from reading past issues of the *JOE*. The *JOE* uses the Vancouver reference style, which can be found in most citation management software products. Citations are placed in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.
3. **Manuscripts Category Classifications and Requirements**
- Manuscripts submitted to the *JOE* must fall into one of the following categories. The abstracts for all these categories would have a maximum word count of 250 words:
1. CONSORT Randomized Clinical Trial-Manuscripts in this category must strictly adhere to the Consolidated Standards of Reporting Trials-CONSORT- minimum guidelines for the publication of randomized clinical trials. These guidelines can be found at www.consort-statement.org/. These manuscripts have a limit of 3,500 words, [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.
 2. Review Article-Manuscripts in this category are either narrative articles, or systematic reviews/meta-analyses. Case report/Clinical Technique articles even when followed by extensive review of the literature will should be categorized as "Case Report/Clinical Technique". These manuscripts have a limit of 3,500 words, [including abstract, introduction, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.
 3. Clinical Research (e.g., prospective or retrospective studies on patients or patient records, or research on biopsies, excluding the use of human teeth for technique studies). These

manuscripts have a limit of 3,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.

4. Basic Research Biology (animal or culture studies on biological research on physiology, development, stem cell differentiation, inflammation or pathology). Manuscripts that have a primary focus on biology should be submitted in this category while manuscripts that have a primary focus on materials should be submitted in the Basic Research Technology category. For example, a study on cytotoxicity of a material should be submitted in the Basic Research Technology category, even if it was performed in animals with histological analyses. These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or 4 tables*.
5. Basic Research Technology (Manuscripts submitted in this category focus primarily on research related to techniques and materials used, or with potential clinical use, in endodontics). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 3 figures and tables*.
6. Case Report/Clinical Technique (e.g., report of an unusual clinical case or the use of cutting-edge technology in a clinical case). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or tables*.

* Figures, if submitted as multipanel figures must not exceed 1 page length. Manuscripts submitted with more than the allowed number of figures or tables will require approval of the *JOE* Editor or associate editors. If you are not sure whether your manuscript falls within one of the categories above, or would like to request preapproval for submission of additional figures please contact the Editor by email at jendodontics@uthscsa.edu.

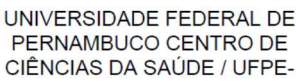
Importantly, adhering to the general writing methods described in these guidelines (and in the resources listed below) will help to reduce the size of the manuscript while maintaining its focus and significance. Authors are encouraged to focus on only the essential aspects of the study and to avoid inclusion of extraneous text and figures. The Editor may reject manuscripts that exceed these limitations.

Available

Resources:

- Strunk W, White EB. *The Elements of Style*. Allyn & Bacon, 4th ed, 2000, ISBN 020530902X.
- Day R. *How to Write and Publish a Scientific Paper*. Oryx Press, 5th ed. 1998. ISBN 1-57356-164-9.
- Woods G. *English Grammar for Dummies*. Hungry Minds:NY, 2001 (an entertaining review of grammar).
- Alley M. *The Craft of Scientific Writing*. Springer, 3rd edition 1996 SBN 0-387-94766-3.
- Alley M. *The Craft of Editing*. Springer, 2000 SBN 0-387-98964-1.

ANEXO B

		
---	---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS E IMUNOGLOBULINAS EM LESÕES PERIAPICAIS INFLAMATÓRIAS

Pesquisador: DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39908614.0.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.059.335

Data da Relatoria: 29/05/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto tem como pesquisador principal Danyel Elias da Cruz Perez, sendo desenvolvido na UFPE (Laboratório de Patologia Oral do Curso de Odontologia) e o Hospital do Câncer de Pernambuco.

Objetivo da Pesquisa:

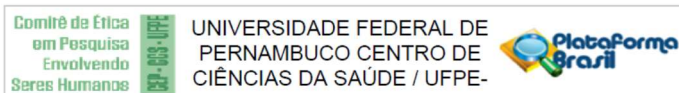
Objetivo Primário:

Realizar análise histomorfológica e comparar a imunoexpressão de marcadores imunológicos em granulomas periapicais e cistos radiculares diagnosticados pelo laboratório de Patologia Oral da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Objetivo Secundário:

1. Revisar histomorfologicamente todos os granulomas periapicais e cistos radiculares diagnosticados pelo laboratório de Patologia Oral da UFPE durante o período de 1991 a 2014;
2. Comparar o número de linfócitos T CD4+, CD25+ e FoxP3+ nos granulomas periapicais e cistos radiculares;
3. Comparar a expressão das citocinas IL10 e IL17 nos granulomas periapicais e cistos radiculares;
4. Comparar a expressão das imunoglobulinas IgA, IgG e IgM nos granulomas periapicais e cistos radiculares.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.059.335

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Possibilidade de extravio de amostras.

Benefícios:

O benefício direto deste trabalho reside na determinação do papel dos linfócitos T regulatórios e a expressão de imunoglobulinas em lesões periapicais inflamatórias. Os resultados deste trabalho, uma vez publicados, poderão ser importantes para melhor compreensão dos fenômenos inflamatórios envolvidos nessas lesões, resultando eventualmente em tratamentos mais eficazes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto aborda uma parte interessante nos aspectos histológicos e imunológicos das doenças inflamatórias orais periapicais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta a documentação exigida.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

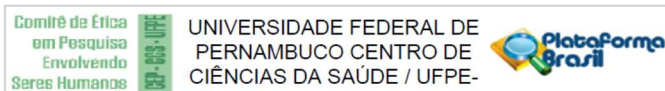
Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto,

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.059.335

identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

RECIFE, 12 de Maio de 2015

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br