

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS
UNIEVANGÉLICA
CURSO DE ODONTOLOGIA

**EXPRESSÃO DO MARCADOR DE CÉLULAS-TRONCO SOX-2 EM LESÕES
PERIAPICAIS CRÔNICAS E AGUDAS**

Amanda Castro Carrijo
Bruna Maria Xavier Santos
Jessyka Magela Coelho
Roberta Soares

Anápolis – GO
2019

AMANDA CASTRO CARRIJO
BRUNA MARIA XAVIER SANTOS
JESSYKA MAGELA COELHO
ROBERTA SOARES

**EXPRESSÃO DO MARCADOR DE CÉLULAS-TRONCO SOX-2 EM LESÕES
PERIAPICAIS CRÔNICAS E AGUDAS**

Trabalho de Curso apresentado a Disciplina de Produção Científica III, como requisito para obtenção de título de Bacharel em Odontologia pelo Curso de Odontologia do Centro Universitário de Anápolis- UniEvangélica, sob a orientação do Prof.º Dr. Brunno Santos de Freitas Silva.

Anápolis - GO

2019

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. METODOLOGIA	8
2.1. <i>Técnica de imuno-histoquímica</i>	9
2.2. <i>Avaliação da expressão imuno-histoquímica</i>	10
2.3. <i>Análise estatística</i>	10
3. RESULTADOS	10
4. DISCUSSÃO.....	11
5. CONCLUSÃO	12
REFERÊNCIAS	14

Section: Oral Pathology

Expressão do marcador de células-tronco Sox-2 em lesões periapicais crônicas e agudas

Brunno Santos de Freitas Silva, DDS, PhD¹, Bruna Maria Xavier Santos, Undergraduate student², Jessyka Magela Coelho, Undergraduate student³, Roberta Soares, Undergraduate student⁴, Amanda Carrijo, Undergraduate student⁵, Carlos Estrela, DDS, PhD⁶ e Fernanda Paula Yamamoto-Silva, DDS, PhD⁷.

¹Professor titular de Patologia Bucal, Departamento de Diagnóstico Bucal, Curso de Odontologia do Centro Universitário de Anápolis, Goiás, Brasil. E-mail: brunno.santosfreitas@gmail.com – Phone: +55(62) 3310-6630.

²Acadêmica do Curso de Odontologia do Centro Universitário de Anápolis, Goiás, Brasil. E-mail: pesquisaodonto59@gmail.com – Phone: +55(62) 3310-6630.

³Acadêmica do Curso de Odontologia do Centro Universitário de Anápolis, Goiás, Brasil. E-mail: pesquisaodonto59@gmail.com – Phone: +55(62) 3310-6630.

⁴Acadêmica do Curso de Odontologia do Centro Universitário de Anápolis, GoiásBrasil. E-mail: pesquisaodonto59@gmail.com – Phone: +55(62) 3310-6630.

⁵Acadêmica do Curso de Odontologia do Centro Universitário de Anápolis, Goiás, Brasil. E-mail: pesquisaodonto59@gmail.com – Phone: +55(62) 3310-6630.

⁶Professor titular de Endodontia, Departamento de ciências estomatológicas, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brasil. E-mail: estrela3@terra.com.br – Phone: +55(62) 3209-6051.

⁷Professora Adjunto IV, Departamento de ciências estomatológicas, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brasil. E-mail: fernanda.paula.yamamoto@gmail.com - Phone: +55 (62) 3209-6051.

Corresponding author:

Prof. Brunno Santos de Freitas Silva

University of Anápolis, Department of Oral Diagnosis

Avenida Universitária Km 3,5

CEP 75083-515, Anápolis, GO, Brazil

Email address: brunno.santosfreitas@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão imuno-histoquímica do marcador de células-tronco Sox-2 em lesões periapicais agudas e crônicas. Com essa finalidade foram utilizados 10 espécimes de abscessos, 10 granulomas, 10 cistos periapicais, e 10 amostras (controle) de mucosa normal. As reações de imuno-histoquímica foram realizadas pelo sistema streptavidina-biotina e a avaliação da imunomarcacão se deu por um sistema de graduação da marcação com 4 categorias de intensidade (0, ausência de marcação; 1, fraca; 2, moderada; 3, forte) e 6 categorias de proporção (0, marcação em < 1%; 1, 1-5%; 2, 6-10%; 3, 11-25%; 4, 26-50% e 5, > 50% das células). Possíveis diferenças na expressão imuno-histoquímica da proteína Sox-2 entre as lesões e o controle foram verificadas pelo teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($P < 0.05$). Observou-se diferença nas expressões de Sox-2 entre os cistos, granulomas e abscessos periapicais ($P < 0.05$). Sox-2 foi significativamente mais expressa em abscessos em comparação aos granulomas ($P < 0.05$) e aos cistos ($P < 0.05$). Não houve relação entre a expressão de Sox-2 e o grau de inflamação, entretanto, foi observado um predomínio desta proteína em lesões infiltradas por células agudas. Os resultados deste estudo indicam uma expressão aumentada de Sox-2 em abscessos, sugerindo que células com características de células-tronco pluripotentes podem estar presentes em lesões permeadas por células inflamatórias agudas, corroborando com a “teria do abscesso” para formação dos cistos periapicais.

Palavras-chave: Periodontite apical; Abscesso periapical; Células-tronco.

1. INTRODUÇÃO

As periodontites apicais são reconhecidamente o resultado da interação entre a resposta imunológica do indivíduo e microrganismos patogênicos oriundos do sistema de canais radiculares. Os canais radiculares infectados são fontes desses microrganismos patogênicos e mediadores inflamatórios que, ao extravasarem para o tecido periapical, criam e sustentam uma resposta inflamatória¹, podendo resultar em uma destruição do osso periapical², e o desenvolvimento de granulomas, cistos e outras lesões periapicais³.

Os cistos periapicais (radiculares) são reconhecidamente uma seqüela direta da inflamação periapical, sendo estes teoricamente formados por células epiteliais remanescentes da fase de formação dos dentes, mais especificamente pela proliferação dos remanescentes epiteliais de Malassez⁴. Curiosamente, nem toda periodontite apical crônica evolui para a formação de um cisto periapical. Cerca de 52% de todas as periodontites apicais apresentam localmente algum tipo de epitélio odontogênico com capacidade proliferativa, entretanto, o cisto periapical (radicular) representa apenas 20% das lesões diagnosticadas nesta região⁴. Apesar de ter sido aventada a relação da inflamação/necrose pulpar com eventos inflamatórios e a formação de lesões periapicais, não se sabe ao certo os mecanismos envolvidos neste processo. Várias células inflamatórias e células residentes na região periapical, sob uma resposta inflamatória específica, podem secretar citocinas e fatores de crescimento, tornando plausível postular-se que os remanescentes epiteliais da odontogênese proliferam sob o estímulo da inflamação⁵. Contudo, muitas das teorias inflamatórias clássicas não sustentam como isso de fato ocorre⁶, visto que várias lesões apresentam o estímulo inflamatório na presença de remanescentes epiteliais, e mesmo assim, só algumas se transformam em cistos⁴.

Uma das teorias para a formação dos cistos periapicais é baseada na agudização de lesões periapicais de caráter crônico, com conseqüente proliferação de remanescentes epiteliais em torno de um foco inflamatório agudo (abscesso), ou em torno de uma área necrótica focal resultante do insulto tecidual causado pelo abscesso. Desta forma, a cavidade cística seria formada e o seu crescimento dependeria de fatores osmóticos associados a outros mecanismos inflamatórios⁷. Apesar de ser apenas uma teoria entre tantas outras, em 2008, Nair et al.⁸ realizaram um estudo experimental em modelo animal para testar a hipótese da “teoria do abscesso”. Os autores em questão demonstraram nos seus experimentos que a formação de cistos foi induzida quando

deflagrada uma resposta inflamatória aguda (foco de abscesso) no tecido subcutâneo de ratos, onde previamente foram implantados queratinócitos orais. Neste estudo, após a injeção bacteriana com a espécie *Fusobacterium nucleatum* um foco de abscesso foi formado e os queratinócitos orais foram estimulados, englobando o foco inflamatório e formando uma cavidade semelhante a um cisto. Esta forte evidência demonstrou que as lesões agudas apresentam um potencial maior para formação dos cistos, comprovando uma diferença na resposta epitelial em lesões agudas e crônicas.

Os achados citados acima fornecem alguns indícios sobre a baixa incidência relativa dos cistos entre outras lesões periapicais de cunho inflamatório. Mas não elucidada de que forma as lesões agudas apresentam um maior potencial de transformação cística. Recentemente, um estudo conduzido pelo nosso grupo⁹ demonstrou que lesões periapicais agudas apresentam uma quantidade maior de células com característica de células-tronco pluripotentes, o que poderia indicar uma plasticidade maior dessas lesões, e possivelmente ter efeito no epitélio odontogênico remanescente. Tal hipótese é baseada na forte expressão de Sox-2 encontrada em lesões periapicais agudas no referido estudo. Sox-2 é um marcador de células-tronco progenitoras o qual a literatura associa a células com características de pluripotência, sendo sua expressão observada em vários tipos de células epiteliais, incluindo o epitélio odontogênico¹⁰.

Apesar dos resultados promissores deste estudo prévio, a referida investigação não tinha a premissa de investigar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de lesões periapicais primárias, sendo assumida na ocasião que seria mais relevante a utilização de uma amostra mais específica, utilizando-se amostras de abscesso periapical. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar a expressão imuno-histoquímica do marcador de células-tronco Sox-2 em abscessos, granulomas e cistos periapicais.

2. METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o parecer de número 2.472.461. Para este estudo foram selecionados 60 blocos parafinados de espécimes de lesões periapicais provenientes dos arquivos do Serviço de Patologia Bucal do Centro Universitário de Anápolis. Foram incluídos no estudo espécimes parafinados de abscessos periapicais (n= 20), granulomas periapicais (n= 20), e cisto periapicais (n=20), com a confirmação clínica e histopatológica do diagnóstico em questão. Adicionalmente, foram selecionadas 10 amostras de tecido normal

representado pela mucosa adjacente a terceiros molares com indicação de extração. Para a confirmação do diagnóstico dos casos selecionados foram obtidos cortes histológicos consecutivos de 5µm de espessura, em seguida corados pelo método de hematoxilina e eosina. Os dados clínicos quanto à vitalidade pulpar ausente e as imagens clínicas e radiográficas foram adicionadas as características histopatológicas para firmar o diagnóstico final. Para avaliar a relação da inflamação com a presença de células com características de células-tronco, a intensidade do infiltrado inflamatório presente nos espécimes foi estimada sob microscópio óptico de luz no aumento de 200x, conforme protocolo descrito por Tsai, et al. (2004)¹¹. Cada espécime foi graduado em: Grau I, menos de 1/3 de células inflamatórias por campo analisado; Grau II, células inflamatórias entre 1/3 e 2/3 por campo; e Grau III, quando a quantidade de células inflamatórias ultrapassava 2/3 por campo histológico. A avaliação do grau de inflamação foi realizada em três (3) campos de cada espécime, sendo representada a porção mais externa da lesão, a intermediária e a central.

2.1. Técnica de imuno-histoquímica

Para as reações de imuno-histoquímica foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina e os cortes submetidos ao anticorpo monoclonal anti-Sox-2. Para realização desta metodologia foram preparados, a partir do material emblocado em parafina, cortes de 3 µm de espessura dos espécimes teciduais. Após essa etapa, os cortes foram desparafinados e depois reidratados em cadeia descendente de etanóis. Após a reidratação foi realizada a remoção do pigmento formólico através de incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica (etanol 95%). A recuperação antigênica se deu com por meio da imersão dos cortes em solução de ácido cítrico pH 6.0 por meia hora em banho maria. O bloqueio da peroxidase endógena dos espécimes foi efetuado por meio da imersão das lâminas, por duas vezes, em uma solução na proporção de 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol. A incubação dos anticorpos primários, do anticorpo de ligação, do complexo terciário, a revelação com a diaminobenzidina (Liquid DAB+, K3468, DAKO, Carpinteria, CA, USA), e a contra-coloração com hematoxilina de Mayer serão realizadas automaticamente com o auxílio do Autostainer DAKO (DAKO, Carpinteria, CA, USA). As reações imuno-histoquímicas deste estudo foram realizadas utilizando-se como controles positivos amostras teciduais de adenocarcinoma de mama, e amostras teciduais de carcinoma

adenóide cístico. Como controle negativo foi realizada a omissão dos anticorpos primários.

2.2. Avaliação da expressão imuno-histoquímica

Os espécimes submetidos às reações de imuno-histoquímica foram avaliados por um sistema de pontuação quantitativa e qualitativa. As lâminas foram observadas em microscópio óptico de luz com aumento final de 200x. A avaliação da expressão imuno-histoquímica de anti-Sox-2 foi efetuada utilizando-se um sistema modificado de graduação da marcação (Pitynski et al., 2015)¹², levando em consideração 4 categorias que estimam a intensidade da marcação (0, ausência de marcação; 1, marcação fraca; 2, marcação moderada; 3, marcação forte) e 6 categorias que estimam a proporção de células positivas (0, marcação em < 1%; 1, 1-5%; 2, 6-10%; 3, 11-25%; 4, 26-50% e 5, > 50% das células). A expressão do marcador Sox-2 foi avaliada nos campos teciduais de maior expressão (“hot spots”) por dois patologistas independentes (análise cega). Na ocorrência de discordâncias entre os resultados avaliados, os casos discordantes foram analisados novamente pelos mesmos patologistas para obtenção de um julgamento final. A avaliação final da imunoexpressão dos marcadores elencados foi determinada multiplicando os valores de intensidade pelos valores obtidos na análise de proporção de células positivas, o que gerou um intervalo de pontuação de 0-15.

2.3. Análise estatística

A análise estatística utilizada neste estudo foi realizada com o auxílio do programa computacional SPSS 16 (Statistical Package for Social Sciences, Headquarters, USA). Possíveis diferenças na expressão imuno-histoquímica da proteínas Sox-2 nos abscessos periapicais, granulomas periapicais e mucosa normal foram verificadas pelo teste de *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*. Possíveis correlações entre o tipo de lesão e grau de inflamação foram verificadas pelo teste de correlação de *Spearman*. Foram considerados estatisticamente significantes resultados com valor de $P < 0.05$.

3. RESULTADOS

Nos espécimes analisados foi observada uma discreta expressão nuclear de Sox-2 nos remanescentes epiteliais presentes em alguns espécimes de granuloma periapical, no revestimento epitelial dos cistos periapicais, e na parede dos espaços vasculares dos três

tipos de lesão (Figura 1). A expressão de Sox-2 também foi observada em células inflamatórias mononucleares, aparentemente identificadas como linfócitos e plasmócitos, como também em células polimorfonucleares (Figura 1).

Foram observadas diferenças significantes na expressão de Sox-2 entre os cistos, granulomas e abscessos periapicais ($P < 0.05$) (Figura 2). Sox-2 foi significativamente mais expressa em abscessos em comparação aos granulomas ($P < 0.05$) e aos cistos ($P < 0.05$). Não houve relação entre a expressão de Sox-2 e o grau de inflamação, entretanto, foi observado um predomínio desta proteína em lesões infiltradas por células agudas.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a expressão imuno-histoquímica do marcador de células-tronco Sox-2 em abscessos, granulomas e cistos periapicais, tendo sido encontradas diferenças significativas na expressão desse marcador entre as lesões crônicas e as agudas, mais especificamente entre os abscessos e os granulomas ($P < 0.05$). Foi observada uma maior expressão de Sox-2 em abscessos, sugerindo que células com características de células-tronco são mais frequentes nesse tipo de lesão, e que pode evidenciar a participação das células inflamatórias agudas na progressão de um granuloma para um cisto. Nossa suposição se baseia na conhecida plasticidade das células Sox-2 positivas^{13,14}, e no potencial das células inflamatórias em estimular a proliferação do epitélio odontogênico⁸.

Os mecanismos de formação dos cistos periapicais têm sido amplamente discutidos ao longo dos anos, sendo importante essa compreensão do ponto de vista clínico, por apresentar um potencial impacto na terapia endodôntica. Contudo, ainda não se sabe como os remanescentes epiteliais da odontogênese são estimulados a proliferar e a formar um cisto, e nem como esses cistos são formados a partir de um granuloma periapical⁵. Dentre as várias teorias a respeito da formação dos cistos periapicais, a teoria do abscesso é sustentada convincentemente por um modelo experimental realizado em animais⁸. Nessa proposição, sugere-se que a agudização de lesões periapicais de caráter crônico teriam uma capacidade maior de promover a proliferação de células epiteliais no periápice em comparação com lesões eminentemente infiltradas por células inflamatórias crônicas. A hipótese descrita acima teoricamente forneceria alguns indícios sobre a baixa incidência relativa dos cistos em comparação a outras lesões periapicais de cunho inflamatório. Contudo, esta teoria não

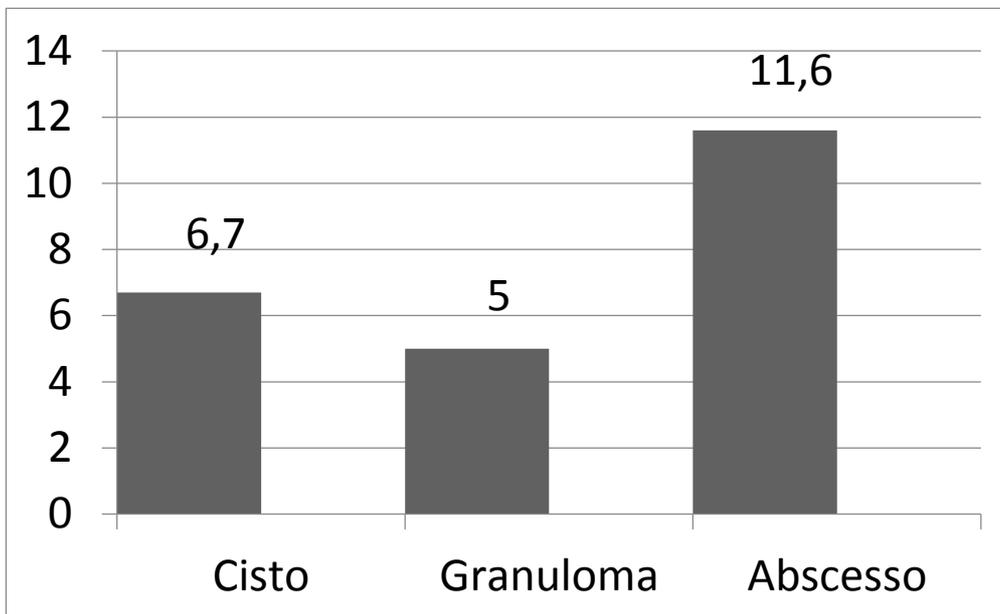
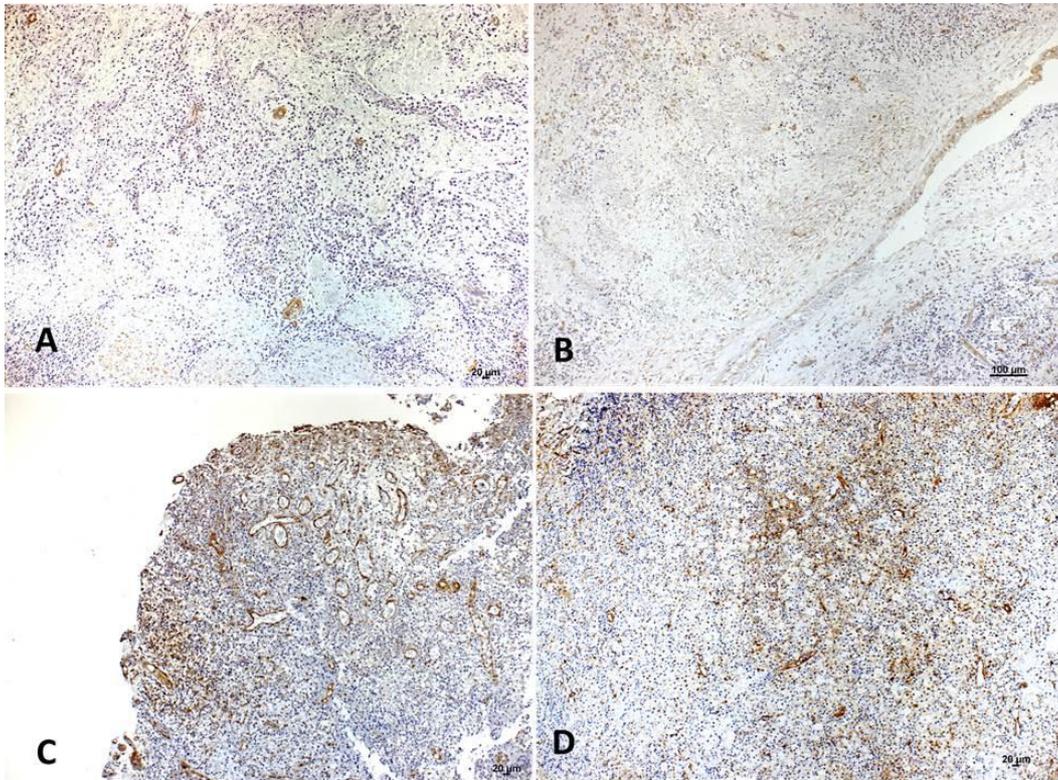
esclarece de que forma as lesões agudas apresentariam um maior potencial de transformação cística. Um recente estudo conduzido pelo nosso grupo demonstrou que lesões periapicais agudas apresentam uma quantidade maior de células com característica de células-tronco pluripotentes, sugerindo uma plasticidade maior dessas lesões infiltradas por células inflamatórias agudas, o que pode ter efeito no epitélio odontogênico remanescente na região periapical⁹. A referida investigação não tinha o objetivo de investigar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de lesões periapicais primárias, sendo admitida na ocasião que seria relevante a utilização de uma amostra característica de lesões agudas, mais especificamente amostras de abscesso periapical.

Neste estudo não houve relação entre a expressão de Sox-2 e o grau de inflamação, entretanto, foi observado um predomínio desta proteína em lesões infiltradas por células agudas. Dessa forma, acredita-se que em lesões periapicais Sox-2 possa ser reativada por células inflamatórias agudas, podendo contribuir com a proliferação de remanescentes epiteliais odontogênicos e conseqüentemente a formação de cistos. Tal premissa baseia-se no fato de que Sox2 é um conhecido marcador de células-tronco progenitoras pluripotentes, com reconhecida atividade em vários tecidos epiteliais, incluindo o epitélio odontogênico¹⁰. Células positivas para Sox-2 têm a capacidade de formar o componente epitelial de um novo dente bem como atuar na reprogramação de fibroblastos diferenciados^{13,15}. Todas essas evidências sugerem uma relação do infiltrado inflamatório agudo com a presença de células-tronco na região periapical. Tal relação é reforçada pelo fato de Sox-2 não ser naturalmente expresso na bainha epitelial de Hertwig e nos remanescentes epiteliais de Malassez¹⁴. Ou seja, essas células podem ser ativadas ou emergem na região periapical^{16,17}.

Acredita-se que os resultados deste estudo trazem mais um elemento para apoiar a teoria do abscesso, a qual explicaria o desenvolvimento dos cistos periapicais. Entretanto, assumisse que esses resultados podem ser reforçados com a investigação adicional com um painel mais amplo de marcadores.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam uma expressão aumentada de Sox-2 em abscessos, sugerindo que células com características de células-tronco pluripotentes podem estar presentes em lesões permeadas por células inflamatórias agudas, corroborando com a “teoria do abscesso” para formação dos cistos periapicais.



REFERÊNCIAS

1. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod.* Jun 2012;38(6):740-745.
2. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(4):498-521.
3. Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J.* 2003 Jul;36(7):464-471.
4. Nair PNR, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1996 Jan;81(1):93-102.
5. Lin LM, Huang GT, Rosenberg PA. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *J Endod.* 2007 Aug;33(8):908-16.
6. Shear M. The histogenesis of dental cysts. *Dent Practit.* 1963;13:238-243.
7. Valderhaug J. A histologic study of experimentally induced periapical inflammation in primary teeth in monkeys. *Int J Oral Surg.* 1974;3:111-123.
8. Nair PN, Sundqvist G, Sjöogren U. Experimental evidence supports the abscess theory of development of radicular cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Aug;106(2):294–303.
9. Estrela C, Silva BSF, Silva JA, Yamamoto- Silva FP, Pinto-Junior DD, Gomez RS. Stem Cell Marker Expression in Persistent Apical Periodontitis. *J Endod.* 2017 Jan;43(1):63-68.
10. Heikinheimo K, Kurppa KJ, Laiho A, Peltonen S, Berdal A, Ruhin B, et al. Early dental epithelial transcription factors distinguish ameloblastoma from keratocystic odontogenic tumor. *J Dent Res.* 2015 Jan;94(1):101–11.
11. Tsai CH, Huang FM, Yang LC, Chou MY, Chang YC. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-2 in radicular cysts. *Int Endod J.* 2002;35(10):854-858.
12. Pitynski K, Banas T, Pietrus M, Millian- Ciesielska K, Ludwin A, Okon K. SOX-2, but not Oct4, is highly expressed in early-stage endometrial adenocarcinoma and is related to tumour grading. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(7):8189-8198.

13. Sarkar A, Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*. 2013 Jan;12(1):15–30.
14. Juuri E, Isaksson S, Jussila M, Heikinheimo K, Thesleff I. Expression of the stem cell marker, SOX2, in ameloblastoma and dental epithelium. *Eur J Oral Sci*. 2013;121:509–16.
15. Juuri E, Jussila M, Seidel K, Holmes S, Wu P, Richman J, et al. Sox2 marks epithelial competence to generate teeth in mammals and reptiles. *Development*. 2013 Apr;140(7):1424–32.
16. Liao J, Al Shahrani M, Al-Habib M, Tanaka T, Huang GT-J. Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic. *J Endod*. 2011 Sep;37(9):1217–24.
17. Patel J, Gudehithlu KP, Dunea G, Arruda JA, Singh AK. Foreign body-induced granulation tissue is a source of adult stem cells. *Transl Res*. 2010 Apr;155(4):191–9.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Expressão imuno-histoquímica de Sox-2. (A) Granuloma periapical; (B) Cisto periapical; (C - D) Abscesso periapical.

Figure 2 - Expressão de Sox-2 (valores médios) em cistos, granulomas e abscessos (Kruskall Wallis - $P < 0.05$)