

ADRIANA GOMES ROCHA BASTOS

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE IL-17
EM LESÕES PERIRRADICULARES DE
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

2020



Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Av. Alfredo Baltazar da Silveira, 580, cobertura
22790-710 – Rio de Janeiro, RJ
Tel. (0XX21) 2497-8988

ADRIANA GOMES ROCHA BASTOS

AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE IL-17 EM LESÕES
PERIRRADICULARES DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, da
Universidade Estácio de Sá, como parte dos
requisitos para a obtenção do grau de
Mestre em Odontologia (Endodontia).

Orientador(a):

Profa. Dra. Luciana Armada Dias

UNIVERSIDADE ESTÁCIO DE SÁ
RIO DE JANEIRO
2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B327a BASTOS, Adriana Gomes Rocha.

Avaliação da imunoexpressão de IL-17 em lesões perirradiculares de pacientes com anemia falciforme / Adriana Gomes Rocha Bastos. – Rio de Janeiro, 2020

42 p.: il.

Bibliografia:f.33-40.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, 2020.

Orientação: Profª. Dra.Luciana Armada Dias.

1.Anemia falciforme.2.Imuno-histoquímica.3.Lesão perirradicular.I.Dias,Luciana Armada.

CDD: 617.6



UNIVERSIDADE ESTÁCIO DE SÁ
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

A dissertação

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE IL-17 EM LESÕES
PERIRRADICULARES DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

elaborada por

ADRIANA GOMES ROCHA BASTOS

e aprovada por todos os membros da Banca Examinadora foi aceita pelo Curso de
Mestrado em Odontologia como requisito parcial à obtenção do título de

MESTRE EM ODONTOLOGIA

Rio de Janeiro, 25 de maio de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Luciana Armada Dias – Presidente
Universidade Estácio de Sá

Profª Drª Mônica Aparecida Schultz Neves
Universidade Estácio de Sá

Profª Drª Inger Teixeira de Campos Tuñas
Universidade Federal do Rio Janeiro

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer aos meus pais, Rogério e Clarinda por todo incentivo e confiança no meu sonho em fazer esse curso. Sem vocês nada seria possível, obrigada por acreditar nos meus sonhos como se fosse os de vocês.

Á minha minha inspiração e motivadora na odontologia, minha prima Fernanda, obrigada pelo apoio e comemorar comigo cada fase dessa jornada.

Á minha orientadora, Prof^a. Luciana Armanda Dias, por ser mais que um exemplo de profissional e me fazer ser um ser humano melhor. Obrigada pelo apoio, carinho, paciência e cuidado. Sem dúvida você é minha maior inspiração para o caminho acadêmico. Obrigada por tudo.

Obrigada ao meu namorado, Cristiano, por me ajudar durante todas as fases boas e ruins, por ter estado ao meu lado e ter me ajudado muito durante o curso.

A todos os professores, funcionários e amigos do PPGO por ter me ajudado a chegar nessa fase de realização.

E principalmente obrigada a Deus.

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
3. JUSTIFICATIVA	17
4. OBJETIVO	18
5. MATERIAIS E MÉTODOS	19
6. RESULTADOS	24
7. DISCUSSÃO	29
8. CONCLUSÃO	32
10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
11. ANEXOS	42

RESUMO

Objetivo: Avaliar através de imuno-histoquímica a expressão de IL-17 em LP de pacientes portadores de anemia falciforme.

Materiais e Métodos: Foram coletas 40 amostras de Lesões Perirradiculares (20 do grupo estudo e 20 do controle). Lâminas silanizadas contendo cortes de parafina foram utilizadas para a realização das reações imuno-histoquímicas. A análise das imagens foi realizada com auxílio de microscópio óptico e cada lâmina foi subdividida em 5 campos de grande aumento. Foram atribuídos valores (0-2) para cada campo, de acordo com o número de marcações positivas para o anticorpo. Os dados foram analisados estatisticamente tendo como significância o valor de $p < 0,05$.

Resultados: A avaliação qualitativa da expressão de IL-17 nas imagens obtidas através de imuno-histoquímica revelou 15% dos casos eram fracos a moderados e 85% fortes no grupo AF. Enquanto que no grupo controle, 80% e 20% para focais e fracos a moderados, respectivamente. A análise quantitativa de IL-17 em LP revelou maior expressão em casos de AF ($1,69 \pm 0,39$) quando comparado aos grupo C ($0,35 \pm 0,19$), havendo diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$).

Conclusão: As LP de portadores de AF apresentaram maior expressão de IL-17 quando comparadas ao grupo controle.

Palavras-chave: Anemia falciforme; Imuno-histoquímica; Lesão perirradicular.

ABSTRACT

Aim: Evaluate through immunohistochemistry the expression of IL-17 in LP of patients with sickle cell anemia

Materials and Methods: Forty samples of LPs were collected (20 from the study group and 20 from the control). Silanized slides containing paraffin were used for the immunohistochemical reactions. The analysis of the images was done by using an optical microscope and each blade was subdivided into 5 big fields increased, in which we evaluated the epithelium (cysts) and connective tissue. It were assigned values (0-2) for each field, based on the number of positive markups to the antibody. The data were analyzed with 5% significance ($p < 0,05$).

Results: The results demonstrate that the expression of IL-17 in the images obtained through immunohistochemistry revealed in the SCA group the highest percentage of strong labeling for the antibody. Quantitative analysis of IL-17 in LPs revealed greater expression in cases of SCA ($1,69 \pm 0,39$) when compared to control group ($0,35 \pm 0,19$), with significant difference between groups ($p < 0,0001$).

Conclusion(s): The expression IL-17 was more evident in SCA patients than the control group patients

Keywords: Apical periodontitis; Immunohistochemistry; Sickle cell anemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cortes histológicos de lesões perirradiculares corados em hematoxilina e eosina	20
Figura 2. Expressão de IL-17 em lesões perirradiculares do grupo anemia falciforme	24
Figura 3. Fotomicrografia de cortes histológicos com marcação forte para IL-17 em lesão perirradicular do grupo anemia falciforme.....	25
Figura 4. Expressão de IL-17 em lesões perirradiculares do grupo controle.....	26
Figura 5. Fotomicrografia de corte histológico com marcação fraca para IL-17 em lesão perirradicular do grupo controle.....	27
Figura 6. Comparação da expressão de IL-17 entre lesões perirradiculares dos grupos anemia falciforme e controle.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AS	Traço Falciforme
AF	Anemia Falciforme
DAB	Diamino benzidina
DF	Doença Falciforme
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
Hbf	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
IL	Interleucina
LP	Lesão Perirradicular
OPG	Osteoproteína
RANK	Receptor activator of NF- κ B
RANKL	Receptor activator of NF- κ B Ligand
SCA	Sickle Cell Anemia
TNF- α	Fator de necrose tumoral – alpha
TNF- β	Fator de necrose tumoral – Beta

1. INTRODUÇÃO

A lesão perirradicular (LP) consiste em uma doença inflamatória de origem microbiana causada primeiramente pelo desenvolvimento da infecção no sistema de canais radiculares (LOPES & SIQUEIRA, 2015).

Algumas condições sistêmicas dos hospedeiros podem modificar o curso da doença, como crises vaso-oclusivas, apresentando respostas distintas à infecção perirradicular e ao mesmo tipo de tratamento endodôntico. Estes casos ocorrem porque alguns indivíduos apresentam condições que podem influenciar na susceptibilidade de desenvolvê-la (SEGURA-EGEA *et al.*, 2005). Tais condições podem ser referidas como modificadores da doença perirradicular, desde que não sejam a causa, mas possam influenciar no desenvolvimento, diagnóstico, severidade ou resposta ao tratamento (SEGURA-EGEA *et al.*, 2015).

As Doenças Falciformes (DF) são distúrbios hematológicos hereditários com maior prevalência em todo o mundo e que acometem uma expressiva parcela da população brasileira (FRANCO *et al.*, 2007). A Anemia Falciforme (AF) é a mais grave e comum das DF, que se caracteriza por ser uma doença autossômica recessiva não ligada ao sexo, que geralmente ocorre com maior frequência entre indivíduos da etnia negra (COSTA *et al.*, 2013).

Essa desordem sanguínea está associada com a produção anormal de Hemoglobina (Hb), causada pela mutação do gene beta-globina. A mutação conduz a produção de uma Hb alterada (CHEKROUN *et al.*, 2019). Essa mudança estrutural resulta em hemácias em formato de foice que promovem a obstrução de vasos sanguíneos, reduzindo assim a capacidade de transportar

oxigênio que ocasiona na necrose de tecidos e órgãos (BISHOP *et al.*, 1995; NUZZO & FONSECA, 2004; HOSNI *et al.*, 2008).

Os fenômenos que ocorrem na AF são decorrentes da hemólise ou da oclusão vascular. A hemólise leva a manifestações cardiovasculares, pulmonares, gastrointestinais e renais (SILVA *et al.*, 2014). Já os processos que envolvem crises vaso-oclusivas, levam a um processo inflamatório que conta com diversos tipos de células, neuropeptídeos e citocinas inflamatórias (MAKIS *et al.*, 2000; LANARO *et al.*, 2009; NAPOLITANI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2014).

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória de atuação relevante na iniciação e na manutenção das respostas inflamatórias (SANTOS, 2015) que apresenta importante participação na fisiopatologia de LP. A determinação da imunoexpressão de IL-17 em LP de portadores de AF permitiria avaliar a capacidade deste distúrbio em influenciar o curso da doença perirradicular. Porém, ainda são escassas as evidências científicas que estabeleçam esta correlação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anemia Falciforme (AF)

As DF são condições decorrentes de desordens genéticas que induzem a produção de Hb anormal, com estabilidade alterada e características físico-químicas desiguais da molécula normal (HOSNI *et al.*, 2008).

A Hb que é comumente encontrada é chamada de HbA. Porém, existem as anormais conhecidas como C, D, E e S. A HbS é a maior responsável pela modificação no formato da hemácia que define a DF. A conjunção de uma destas hemoglobinas como C, D ou E com a HbS constitui um grupo de DF, sendo a AF a mais grave e comum do grupo, caracterizada pela presença duplicada da HbS. Sendo assim, o paciente com AF tem a herança genética SS (ZAGO, 2001; SILVA *et al.*, 2016). Existe uma mutação no cromossomo 11, na posição 6 do gene da beta-globina, onde acontece uma alteração do aminoácido ácido glutâmico pela valina, definindo a variante nomeada HbS (HOSNI *et al.*, 2008).

O traço falciforme não é considerado doença, ou seja quando se herda de um dos pais o gene HbA e do outro o gene HbS, é considerado AS. Este indivíduo, não apresenta nenhum sinal ou sintoma da doença, sendo saudável. Contudo, duas pessoas AS, poderão ter filhos com AF (KIKUCHI, 2003; BORGES, 2015).

A HbS sofre polimerização devido a mutação, quando em baixas concentrações de oxigênio, ocasionando mudança em sua forma, o que acarreta à deformação da hemácia, aumentando a viscosidade sanguínea com formação de cristais tactóides. As síndromes falciformes têm essas anomalias

como base de sua fisiopatologia (EATON & HOFRICHTER, 1996; BANDEIRA *et al.*, 1999).

A diminuição de pH e o aumento da temperatura podem levar a molécula de HbS a sofrer polimerização e as hemácias a assumirem a forma semelhante a de uma foice (MENDES, 2010; BORGES, 2015). Os glóbulos vermelhos alterados têm pouca mobilidade e flexibilidade, dificultam a circulação adequada e bloqueiam o fluxo sanguíneo capilar. Desta forma, prejudicam a irrigação e oxigenação dos tecidos e órgãos (KIKUCHI, 2003; BORGES, 2015).

2.2. Prevalência e Incidência da Anemia Falciforme (AF)

A identificação da AF ocorreu em 1910, em um jovem afro-descendente de origem caribenha. Este fato contribuiu para que a doença ficasse restrita a uma patologia racial. Estudos posteriores a esse auxiliaram na evidenciação da relação entre a AF e a etnia negra (TAPPER, 1999; BOTELHO *et al.*, 2009; BORGES, 2015).

Na atualidade, podem ser classificadas por três características geneticamente importantes que condicionam a gravidade da evolução clínica: os níveis de hemoglobina fetal (Hbf), a concomitância de alfa-talassemia e os haplótipos associados ao gene da HbS. Existem cinco haplótipos distintos do gene da HbS, cada um corresponde o nome da região ou grupo étnico onde é mais predominante: Árabe-Indiano, Camarões, Banto, Benin e Senegal. A AF é muito mais benigna associada aos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano, enquanto existem indicadores de que a doença associada ao haplótipo Banto pode ser mais crítico que a forma relacionada ao haplótipo Benin. Como cada

haplótipo é prevalente em uma região da África ou da Ásia, a dimensão de pacientes com diversos haplótipos diverge no continente Americano, devido a suas origens populacionais (ZAGO, 2001; BOTELHO *et al.*, 2009).

Estima-se que 40% da África Equatorial seja portadora e a AF atinge uma prevalência de 2 a 3% da população (GÓMEZ-CHIARI *et al.*, 2003; NUZZO & FONSECA, 2004). A associação dessa patologia com a população negra pode ser esclarecida. Há cerca de 50 a 100 mil anos nas regiões tropicais e equatoriais da África, havia perfeitas condições para a proliferação do mosquito *Anopheles*, vetor da malária. Os indivíduos que portavam o gene HbS, sobreviviam a doença, pois este gene não permite o alojamento para o merozoíto, tornando-os assim mais adaptados ao meio. Com isso, os percentuais desta população são bastante elevados na mutação de Hb (ZAGO, 2001; BOTELHO *et al.*, 2009).

É alta a prevalência da AF entre descendentes de origem africana, devido ao alto grau de miscigenação. Por essa razão, tem propensão de atingir cada vez mais um grupo significativo da população mundial, sendo uma doença de caráter endêmico no Brasil (CANÇADO & JESUS, 2007; BOTELHO *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2017), chegando a acometer 0,1% a 0,3% da população afro-brasileira (ZAGO, 2001; LOUREIRO & ROZENFELD, 2005; BOTELHO *et al.*, 2009; BORGES, 2015; SILVA *et al.*, 2016).

É a doença hereditária mais prevalente no Brasil. No mundo a mais encontrada é a anemia hemolítica congênita (TAKAHASHI *et al.*, 1993; NAUFEL *et al.*, 2002; HOSNI *et al.*, 2008; BOTELHO *et al.*, 2009; BORGES, 2015). No Brasil é mais frequente na região do norte e nordeste, porém devido a grande miscigenação no país, pode ser observada em pessoas de

outras etnias. Na Bahia são 1:650 para a doença e 1:17 para o traço. Cerca de 2% da população sudeste é portadora de pelo menos um gene mutado (CANÇADO & JESUS, 2007; BARROS *et al.*, 2017). A triagem neonatal nos Estados de Minas Gerais e do Rio de Janeiro aponta a incidência de traço falciforme 1:21 nascidos e de AF 1:1.200 nascimentos (HOSNI *et al.*, 2008).

A elevada prevalência e as inúmeras complicações caracterizam a AF como um problema de saúde pública (BRASIL, 2002; CANÇADO & JESUS, 2007; BARROS *et al.*, 2017). Em diferentes regiões brasileiras, estima-se a existência de mais de 2 milhões de portadores do gene da HbS (RODRIGUES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2016).

2.3. Complicações sistêmicas da Anemia Falciforme (AF)

Os pacientes que possuem AF estão sujeitos a complicações, como crise vaso-oclusivas e anemia hemolítica crônica que podem acarretar em maior vulnerabilidade a infecções e alterações sistêmicas (SERJEANT *et al.*, 2004; HOSNI *et al.*, 2008; BRANDOW *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2014).

A crise algica é a situação mais comum de procura do paciente com AF a emergências (KAYA *et al.*, 2004; BOTELHO *et al.*, 2009; TAYLOR *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2014). Os principais motivos de consulta, são as dores agudas, que acarretam dor óssea e dor articular. Esses sintomas devem ser tratados o mais rápido possível por causa de sua intensidade. No entanto, a dor, pode ser devido a outras patologias, como por exemplo, artrite infecciosa, pericardite e pancreatite. É necessário cautela ao se diagnosticar o paciente com crise de dor (MANWANI & FRENETTE, 2013; CHEKROUN *et al.*, 2019).

A principal causa de morte de pacientes adultos com AF é a síndrome torácica aguda, que no seu estágio inicial é radiologicamente visível, associada aos sintomas de tosse, dispnéia, dor torácica e febre (WANG *et al.*, 2018; CHEKROUN *et al.*, 2019). Na infância, os acidentes vasculares cerebrais estão comumente associados, sendo considerados as complicações mais graves da AF (VICHINSKY, 2017; CHEKROUN *et al.*, 2019).

O paciente com AF é imunocomprometido em termos de síntese de anticorpos e substâncias efetoras envolvidas na defesa antimicrobiana. Terapias antibióticas são necessárias para tratar o quadro de sépsis grave, especialmente contra patógenos pneumococos (RANKINE & OWUSU *et al.*, 2017; CHEKROUN *et al.*, 2019).

A complicação crônica mais frequente é a nefropatia. As patologias renais manifestam-se de várias formas, como glomerulopatias, hematúria e proteinúria e podem levar a insuficiência renal grave. A dor crônica de origem óssea pode ocorrer como parte dessa condição (HARIRI *et al.*, 2018; CHEKROUN *et al.*, 2019).

2.4. As manifestações Oraís da Anemia Falciforme (AF)

A palidez da mucosa oral é uma manifestação habitual em pacientes com AF, que ocorre devido ao processo de hemólise (FONSECA *et al.*, 2007; CHEKROUN *et al.*, 2019).

O atraso na erupção dentária é comum em pacientes com AF, porém a origem desta circunstância permanece desconhecida (BISHOP *et al.*, 1995; TAYLOR *et al.*, 1995; ALVES *et al.*, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2007; FONSECA *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2007; BORGES 2015).

Outros achados relatados na literatura pertinentes a região oral são hipomineralização em esmalte, calcificações pulpares, hipercementose e alterações ósseas que resultam em protusão maxilar (BISHOP *et al.*, 1995; TAYLOR *et al.*, 1995; ALVES *et al.*, 2006; FRANCO *et al.*, 2007; BOTELHO *et al.*, 2009; BORGES, 2015; CHEKROUN *et al.*, 2019).

A dor orofacial que é secundária a isquemia óssea devido a oclusão vascular, acarretam no aparecimento de pequenas áreas de necrose. Os ossos mandibulares são os mais atingidos, especialmente sua área posterior (TAYLOR *et al.*, 1995; TSATALA *et al.*, 2004; CHEKROUN *et al.*, 2019).

A osteomielite mandibular é uma alteração comum a pacientes com AF. TSATALA *et al.* (2004) observaram essa manifestação entre 79% a 100% do casos de pacientes com AF. Osteomielite também pode afetar outros ossos da face em pacientes falciformes. A crise vaso-oclusiva pode levar a isquemia e a osteonecrose, o que propícia um ambiente favorável para o crescimento de bactérias (PATTON *et al.*, 1990; BORGES, 2015).

As alterações radiográficas nos ossos da face podem se apresentar isoladas ou combinadas. Os indicativos da AF são: o número de trabéculas ósseas que pode se apresentar reduzido; as trabéculas ósseas restantes podem se apresentar grosseiras e definidas com nitidez e em eventuais casos as trabéculas ósseas horizontais proeminentes entre os dentes conferem o aspecto conhecido como *stepladder* (SANGER & BYSTROM, 1977; CORDEIRO *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2013).

O aumento da medula óssea em pacientes falciforme ocorre em resposta a necessidade elevada da reposição de células vermelhas, acarretando alterações ósseas, dentre elas a expansão e projeção do osso

maxilar. Essas mudanças podem gerar má oclusão, sendo a protrusão maxilar a mais comum (SHNORHOKIAN *et al.*, 1984; SILVA *et al.*, 1993; ALVES *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2008; RODRIQUES *et al.*, 2013; BORGES, 2015).

A diminuição da radiodensidade e a formação de um trabeculado grosseiro são alterações ósseas comuns nesses pacientes. Podem ser observados tanto na mandíbula quanto na maxila, e são atribuídas a hiperplasia eritroblástica e a hipertrofia medular que ocasionam na formação de espaços medulares largos e na perda do fino trabeculado ósseo (SILVA *et al.*, 1993; MINISTÉRIO DE SAÚDE DO BRASIL, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2013).

O suprimento sanguíneo mandibular é precário, colocando esse osso em evidência quanto ao seu risco (ANDREWS *et al.*, 1983; PATTON *et al.*, 1990; KAYA *et al.*, 2004). As células falciformes podem ocasionar um infarto isquêmico que leve a necrose óssea, criando um ambiente favorável para o crescimento de bactérias (FRIENDLANDER *et al.* 1980; GREGORY & OLUJOHUNGBE, 1994; KAYA *et al.*, 2004).

O estudo de KAYA *et al.* (2004) revelou alterações no tecido ósseo mandibular de pacientes com AF através avaliações radiográficas. Em 67% dos pacientes foi constatado que a qualidade óssea foi deteriorada significativamente, a densidade óssea trabecular diminuída e espaços de medula óssea foram ampliados e se tornaram locais. Assim, atribuindo um aspecto osteoporótico ou esponjoso nas radiografias. Neste estudo foi relatado um padrão trabecular chamado de *stepladder*, observado em 28% do pacientes, e também foram citadas mudanças significativas no osso cortical. Cerca de 22% dos pacientes com AF demonstraram um afinamento do osso

cortical e irregularidades na mandíbula. De 36 pacientes com AF, o teste de sensibilidade pulpar identificou 6% de necrose pulpar em 827 dentes. Esse achado indica que não é apenas a estrutura óssea que é afetada pela doença. Além disso, 83% dos pacientes que apresentaram dor orofacial ou dentária sem razão aparente foi maior que do que o grupo controle.

Em portadores de AF, os espaços medulares ocorrem mais comumente como áreas radiolúcidas entre os ápices dos dentes e a borda inferior da mandíbula (SANGER & MCTIGUE, 1978; KAYA *et al.*, 2004; BORGES, 2015). Os espaços medulares têm chance de serem mais visíveis, assim como o aumento da espessura da cortical mandibular (BORGES, 2015).

Outros aspectos radiográficos podem ser vistos, como aumento da espessura da cortical mandíbula, que pode ocorrer durante as crises de falcização e pouco frequente, aparecimento de lesões radiopacas de natureza vaso-oclusiva, normalmente são encontradas na região posterior da mandibular devido a um processo de reparo das áreas infartadas (TSATALA *et al.*, 2004; BORGES, 2015).

2.5. Fisiopatologia das Lesões Perirradiculares (LP)

As LP são repostas a reações imunoinflamatórias correspondente as toxinas liberadas pelo metabolismo bacteriano (PEIXOTO & PEIXOTO, 2012). Alterações patológicas podem afetar tecidos, como a polpa dentária, sendo normalmente de natureza inflamatória e etiologia infecciosa (LOPES & SIQUEIRA, 2015). Sua patogenia decorre da necrose pulpar, uma vez que o tecido necrótico converte-se em um ambiente para colonização de bactérias, a contaminação do canal radicular causa um processo de inflamação da polpa e

dos tecidos perirradiculares caso não tratado precocemente. Uma vez que a inflamação se instala destruindo a integridade dos tecidos, a resposta inflamatória tende a localizar e reparar a área atingida. Quando a resposta imunológica do hospedeiro não é capaz de destruir os agentes agressores, essa agressão se torna persistente desencadeando reações inflamatórias no organismo. Nessa situação, organismo em defesa tenta confina estes agentes, tentando controlar infecção (PEIXOTO & PEIXOTO, 2012; LOPES & SIQUEIRA, 2015).

Para evitar a propagação da infecção aos ossos da face e outras regiões do corpo, a resposta inflamatória nos tecidos perirradiculares, que tem como característica a reabsorção óssea, permite o recuo do osso para longe da área infectada (COLIC *et al.*, 2009; PEIXOTO & PEIXOTO, 2012; AJUZ *et al.*, 2014; LOPES & SIQUEIRA, 2015; AZEREDO *et al.*, 2017).

2.5.1. Mecanismo de defesa contra infecções

A primeira linha de defesa contra uma infecção é chamada de imunidade inata (ABBAS *et al.*, 2007; SIQUEIRA, 2011; AJUZ *et al.*, 2014; AZEREDO *et al.*, 2017). Uma vez que essa infecção se encontra na região perirradicular, o hospedeiro tenta combater esses microrganismos com mecanismos inespecíficos, sendo por barreiras físicas e químicas, como fagócitos, células NK e por diversas moléculas efetoras (PEIXOTO & PEIXOTO, 2012; LOPES & SIQUEIRA, 2015).

Quando há persistência da infecção bacteriana, que não foi eliminada pela imunidade inata, mecanismos específicos de defesa são induzidos,

característicos da imunidade adaptativa, representados por linfócitos, células apresentadoras de antígeno e imunoglobulinas (PEIXOTO & PEIXOTO, 2012; AJUZ *et al.*, 2014; LOPES & SIQUEIRA, 2015; AZEREDO *et al.*, 2017).

Bactérias podem agredir diretamente o tecido do hospedeiro, mediante a liberação de enzimas, toxinas e outros produtos metabólicos, mas a destruição tecidual é também resultado da ação indireta do hospedeiro, pela resposta imunopatológicas, induzidas por mediadores químicos inflamatórios (PEIXOTO & PEIXOTO, 2012; LOPES & SIQUEIRA, 2015). Destacam-se as citocinas, entre esses mediadores, que são moléculas envolvidas na regulação da resposta imune. Essas moléculas são responsáveis por ativar células-alvo ao se comunicarem com receptores específicos na membrana celular e provocarem uma série de reações intracelulares que causaram uma mudança de atividade biológica (TAKAHASHI, 1998; PEIXOTO & PEIXOTO, 2012; AJUZ *et al.*, 2014).

Inicialmente, os macrófagos residentes e o sistema complemento tentam combater os microrganismos, sendo oriundos da defesa inata do organismo (TROWBRIDGE & EMLING, 1997; PEIXOTO & PEIXOTO, 2012; AJUZ *et al.*, 2014). Entretanto, a ativação dos macrófagos aumenta sua propensão como célula apresentadora de antígeno e funções pro-inflamatórias (ABBAS *et al.*, 2007; PEIXOTO & PEIXOTO, 2012; AJUZ *et al.*, 2014), também podem sintetizar vários mediadores biológicos, como a interleucina (IL) 1, IL-6, IL-8, , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e prostaglandinas, que têm o papel subsequente no processo inflamatório (BASSET *et al.*, 2003; PEIXOTO & PEIXOTO, 2012; AJUZ *et al.*, 2014).

Com a ativação do sistema complemento, seus produtos, vão dar origem a mediadores como C3a e C5a, que estimulam os mastócitos a liberar

histamina, ocasionando a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular. O C5a é um potente agente quimiotático, com capacidade de atrair neutrófilos e monócitos para a área afetada (WALSH, 2003; PEIXOTO & PEIXOTO, 2012; AJUZ *et al.*, 2014). Além disso, esse sistema é responsável pela opsonização, onde formam-se complexos capazes de atacar as bactérias e estimular resposta inflamatória (TAKAHASHI, 1998; PEIXOTO & PEIXOTO, 2012; AJUZ *et al.*, 2014).

Com o quadro de resposta inflamatória aguda estabelecido, é característico o aumento da permeabilidade vascular e a migração de células de defesa para o local da infecção (PEIXOTO & PEIXOTO, 2012). Os neutrófilos são as células responsáveis pela primeira linha de defesa, porém apresentam um tempo de vida pequeno entre 48-72h, devido a persistência da agressão bacteriana, essas células são substituídas por uma linhagem macrófágica, sendo a segunda linha de defesa (PEIXOTO & PEIXOTO, 2012).

Os macrófagos apresentam receptores de superfície que reconhecem estruturas presente em bactérias, dando início a sinais que ativam funções antibacterianas e pró-inflamatórias (ABBAS *et al.*, 2007; AJUZ *et al.*, 2014). Essa ativação faz com que os macrófagos tenham um aumento na capacidade fagocítica e na função de célula apresentadora de antígeno, aumentam a estimulação de produção de mediadores químicos, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α (BASSET *et al.*, 2003; AJUZ *et al.*, 2014). Essas citocinas terão a capacidade de ativar osteoclastos, contribuindo para à reabsorção óssea (COLIC *et al.*, 2009; AJUZ *et al.*, 2014).

2.5.2. Mediadores químicos presentes nas Lesões Perirradiculares (LP)

As citocinas são mediadores importantes, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. As ações pró-inflamatórias (Th1) tem as interleucinas IL-1,IL-2,IL-6,IL-7 e TNF- α . Já as ações anti-inflamatórias (Th2) são as são IL-4, IL-10, IL-13 e TNF- β (CURFS *et al.*, 1997; LIN *et al.*, 2000; SOMMER & WHITE, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011). As células Th17, produzem as citocinas IL-17, IL-21 e IL-22, que estão envolvidas com indução de respostas pró-inflamatórias. (COLIC *et al.*, 2009; GUGLANI & KHADER, 2010, MACIEL, 2015).

A IL-17 tem papel de conexão entre resposta adaptativa e inata (YU & GAFFEN, 2008; MACIEL, 2015). A ativação dos osteoclastos, que vai ocasionar a reabsorção óssea e em consequência o crescimento da LP tem sua origem na diferenciação das células do sistema imune. Em resposta a colonização bacteriana no interior do canal radicular, macrófagos, linfócitos T e outros tipos de células liberam citocinas pro-inflamatórias, como também prostaglandinas e bradicinas, as quais ao atingirem níveis críticos vão ser responsáveis por estimular a osteoclastogênese (TAKAYANAGI, 2005a 2005b; AJUZ *et al.*, 2014).

A resposta imune inflamatória mediada por Th1, destacando a citocinas IL-1,TNF- α e IL-6, tem o papel de expansão da lesão como resultado da destruição óssea (AKANIME *et al.*,1994; KAWASHIMA & STASHENKO *et al.*,1999; AJUZ *et al.*, 2014). Estudos evidenciam o impacto que a IL-17 tem na remodelação óssea, especialmente em casos de artrite (NAKAE *et al.*, 2003;

GAFFEN, 2004; YU *et al.*, 2007; MACIEL, 2015). As citocinas que participam da resposta inflamatória aguda quanto da crônica pertencem à família da IL-17 (ROUVIER *et al.*, 1993; GU *et al.*, 2013; MACIEL, 2015).

2.5.3. IL-17

A IL-17 é uma glicoproteína secretada por células Th17, que tem a capacidade de estimular células epiteliais, endoteliais e fibroblastos a secretarem citocinas tais como IL-6 e IL-8 (FOSSIEZ *et al.*, 1996; AJUZ *et al.*, 2014). Tem papel na regulação da osteoclastogênese, possivelmente induzindo ação de reguladores na atividade osteoclasticas (FUKADA *et al.*, 2009; FERREIRA, 2013). Osteoblastos e fibroblastos sinoviais vão ser ativados pela IL-17 para expressar a RANKL importante para a diferenciação osteoclástica (KOTAKE *et al.*, 1999; SATO *et al.*, 2006; FERREIRA, 2013). A sua estimulação exacerbada leva ao dano tecidual (OUYANG *et al.*, 2008; KORN *et al.*, 2009, GU *et al.*, 2013; MACIEL, 2015). A IL-17 é responsável por ativar eventos sinalizados por citocinas, como TNF- α e IL-1 β , sendo apontado com uma molécula de ligação entre a resposta imune e adaptativa (YU *et al.*, 2007; YU & Gaffen, 2008; MACIEL, 2015).

A interação entre células precursoras de osteoclastos, células do estroma e osteoblastos é importante para a ocorrência das osteoclastogênese. O RANK expresso na superfície de células precursoras, vai interagir com RANKL, com essa união, inicia-se a atividade da cascata de transdução que leva a osteoclastogênese (SIQUEIRA, 2011; AJUZ *et al.*, 2014). As células T tem envolvimento na destruição óssea pela produção de IL-17, que tem papel

na indução da produção de RANKL (KOTAKE *et al.*, 1999; SATO *et al.*, 2006; MACIEL, 2015).

A osteoprotegerina (OPG) é uma molécula produzida pelos osteoblastos e pelas células do estroma, que tem o papel de competir com RANK, pelo RANKL, para impedir a osteoclastogênese e também a ativação os osteoclastos (BOYLE *et al.*, 2003; AJUZ *et al.*, 2014). A expressão entre RANKL e OPG em equilíbrio é que vai emitir a quantidade de osso a ser reabsorvido. Entretanto, no quadro de inflamação, esse equilíbrio pode ser afetado, ocorrendo um aumento de produção de RANKL e uma diminuição de OPG (SIQUEIRA, 2011; AJUZ *et al.*, 2014). Na existência de um estímulo inflamatório, aumenta a expressão de RANKL nos tecidos perirradiculares. Assim estimula atividade dos osteoclastos e a reabsorção óssea patológica (MENEZES *et al.*, 2008; GRAVES *et al.*, 2011; MACIEL, 2015).

A presença da IL-17 está ligada ao aumento da LP mediante a sua estimulação osteoclastica. Sendo, uma citocina importante para reabsorção óssea, por sua capacidade de estimular osteoclastos e na indução de sua diferenciação em osteoclasto (KOTAKE *et al.*, 1999; AJUZ *et al.*, 2014 FERREIRA, 2013). Com a reabsorção óssea cria-se espaço para um tecido de granulação. Células de defesa tentam confinar a infecção intraradicular e assim a impossibilitando sua disseminação pelo tecido ósseo. Enquanto a doença progredir, a reabsorção continuará (SIQUEIRA 2011, AJUZ *et al.*, 2014).

3. JUSTIFICATIVA

A AF é um distúrbio caracterizado pela modificação do formato das hemácias, de grande importância epidemiológica. Esta desordem sanguínea tem como característica crises vaso-oclusivas que provocam intensas respostas inflamatórias. Por isso, é provável que essa condição altere o desenvolvimento da LP.

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória de atuação relevante na iniciação e na manutenção das respostas inflamatórias que apresenta importante participação na fisiopatologia de LP. A determinação da imunoexpressão de IL-17 em LP de portadores de AF permitiria avaliar a capacidade deste distúrbio em influenciar o curso da doença perirradicular. Porém, ainda são escassas as evidências científicas que estabeleçam esta correlação.

5. OBJETIVO

Avaliar através de imuno-histoquímica a expressão de IL-17 em LP de portadores de AF.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Parecer Ético

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO), registrado e aprovado no cep Hemorio sob o número 402\16.

6.2. Seleção da Amostra

A amostra foi constituída por 40 LP (20 do grupo estudo e 20 do controle). Essas lesões foram obtidas por cirurgias anteriormente realizadas por motivos não relacionados a esta pesquisa, e estavam associadas a elementos dentários portadores de infecção endodôntica primária.

As LP de portadores de AF foram provenientes de pacientes inscritos na clínica odontológica do HEMORIO e aquelas pertencentes ao grupo controle (indivíduos sem alterações de hemácias) foram adquiridas do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Estácio de Sá.

Foram excluídos deste estudo LP de tamanhos insuficientes para fazer a montagem do corte na lâmina; de tabagistas, de portadores de doenças imunossupressoras (HIV positivos e diabéticos) ou autoimunes, de usuários de analgésicos, anti-inflamatórios e/ou antibióticos por período inferior a um mês. No grupo controle também foram excluídas LP de portadores de indivíduos com AF.

6.3. Diagnóstico das Lesões Perirradiculares (LP)

O diagnóstico de LP (Figura 1) foi realizado por dois avaliadores calibrados através da análise histopatológica das lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Foram classificadas como cistos as lesões que apresentaram uma cavidade parcial ou totalmente delimitada por epitélio.

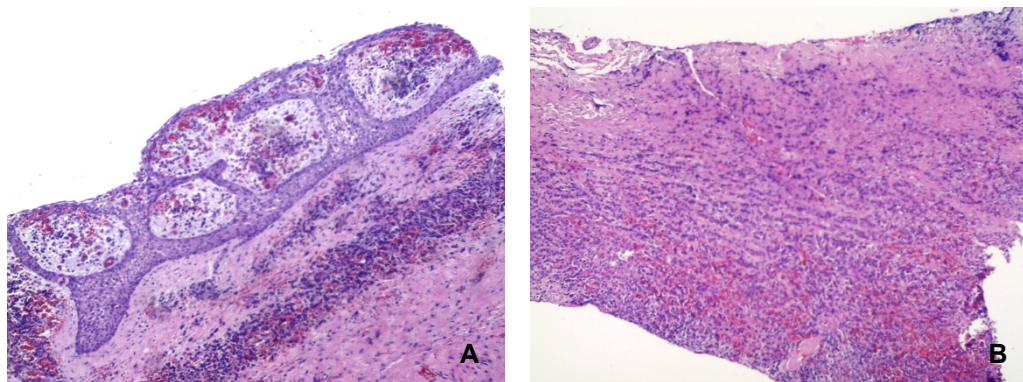


Figura 1: Cortes histológicos de lesões perirradiculares corados em hematoxilina e eosina (A) Cisto (B) Granuloma.

6.4. Reações Imuno-histoquímicas

Lâminas silanizadas receberam cortes histológicos de 3µm para a realização das reações de imuno-histoquímica, seguindo o protocolo de AJUZ *et al.* (2014). As lâminas foram desparafinizadas e os cortes hidratados. Em seguida, foi adicionado as lâminas o tampão citrato-ácido cítrico (Tampão Citrato pH 6.0, DBS, Pleasanton, CA, EUA) e levado ao microondas (BMX 35ARHNA - Maxi Gratine Inox, Brastemp, Joinville, SC) (com potência mínima de 850W) em um ciclo de 12 minutos na potência máxima, em temperatura

ambiente externa. Após o término do ciclo, foi realizado o resfriamento em temperatura ambiente por 20 minutos, para em seguida ser lavado em água corrente por 5 minutos.

Para a inativação da peroxidase endógena, foram feitos 5 banhos de 5 minutos cada com água oxigenada (H₂O₂) 20 volumes (Proquímios, Rio de Janeiro, RJ), em seguida as lâminas foram lavadas 3 vezes em água corrente. As lâminas, foram colocadas em solução de PBS 1x pH 7,4 (Laborclin, Pinhais, PR) e mantidas nesta solução.

Para fazer a diluição do anticorpo primário IL-17 (1:200, rabbit, sc-7927, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) foi utilizada a solução PBS/BSA a 1%. O anticorpo primário foi aplicado sobre os cortes e depois as lâminas foram colocadas na geladeira por 16 horas (overnight). Após este período, as lâminas foram retiradas da geladeira, os anticorpos primários descartados e 3 lavagens de 1 minuto cada com PBS 1x foram realizadas.

O anticorpo secundário (LSAB + system HRP – Dako K0690, DAKO, Carpinteria, CA, EUA) foi utilizado. O anticorpo secundário biotinilado foi aplicado e colocado em estufa a 37° C por 30 minutos. Após este prazo, foram realizadas 3 lavagens de 1 minuto cada, das lâminas em PBS 1x. Depois foi aplicado complexo estreptavidina-biotina, deixando posteriormente as lâminas na estufa por 30 minutos a 37° C. Depois deste intervalo, 3 lavagens de 1 minuto cada com PBS 1x foram realizadas.

Para a etapa do DAB líquido (Liquid DAB + Substrate Chromogen System - Dako K3468, DAKO, Carpinteria, CA, EUA) foi aplicada a solução de 20 µL de DAB líquido para 1000 µL de seu diluente específico, por 5 minutos

em temperatura ambiente. Depois dos 5 minutos o DAB foi descartado e a lavagem em água corrente realizada por 5 minutos.

Foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Carazzi por 2 minutos e depois lavagem em água corrente por 8 minutos. Por último, os cortes foram desidratados e passados pelo xilol de diafanização e pelo xilol de montagem, sendo posteriormente montados com lamininas de vidro e Entellan (Meck, Damstadt, Alemanha).

Foram realizados controles positivos e negativos para cada anticorpo utilizado, conforme instruções dos fabricantes.

6.5. Análise das Imagens

A análise das imagens (AJUZ *et al.*, 2014) foi realizada por dois avaliadores calibrados com auxílio de microscópio óptico (Leica DM500, Heerbrugg, Suécia) e cada lâmina subdividida em 5 campos de grande aumento (40x de aumento microscópico), onde avaliou-se o epitélio (apenas em casos de cistos perirradiculares) e o tecido conjuntivo.

De acordo com o número de marcações positivas para o anticorpo, atribuiu-se valores de 0 a 2 para cada campo. Considerou-se as áreas observadas negativas a focal, quando não houve células positivas ou menos de 5% das células coradas positivamente (0 ponto); fraco a moderado quando 5% a 50% das células foram coradas positivamente (1 ponto); e forte, quando mais de 50% das células foram consideradas positivas para cada marcador (2 pontos).

No final, cada zona de todas as lâminas estudadas recebeu cinco graus que, em conjunto representaram valores de 0 (quando todos os campos de alta potência analisados foram negativos) a 10 (quando todos os campos de alta potência analisados foram fortemente positivos). Como este número final resume o valor total dos cinco campos, foi obtida uma média referente à classificação de imunoexpressão, sendo: negativo a focal (média final que variava de 0 a 0,5), fraco a moderado (variando de 0,6 a 1,2) e forte (variando de 1,3 a 2,0).

6.6. Análise Estatística

A análise comparativa dos dados obtidos foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc, California, USA). Para a comparação da expressão do mediador entre os grupos foi utilizado o teste de hipótese não paramétrico de Mann-Whitney. A significância estatística levada em consideração foi de $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

A avaliação qualitativa (Figura 2) da expressão de IL-17 nas imagens obtidas através de imuno-histoquímica (Figura 3) revelou no grupo AF que 15% dos casos apresentava marcação de fraco a moderado e 85% forte.

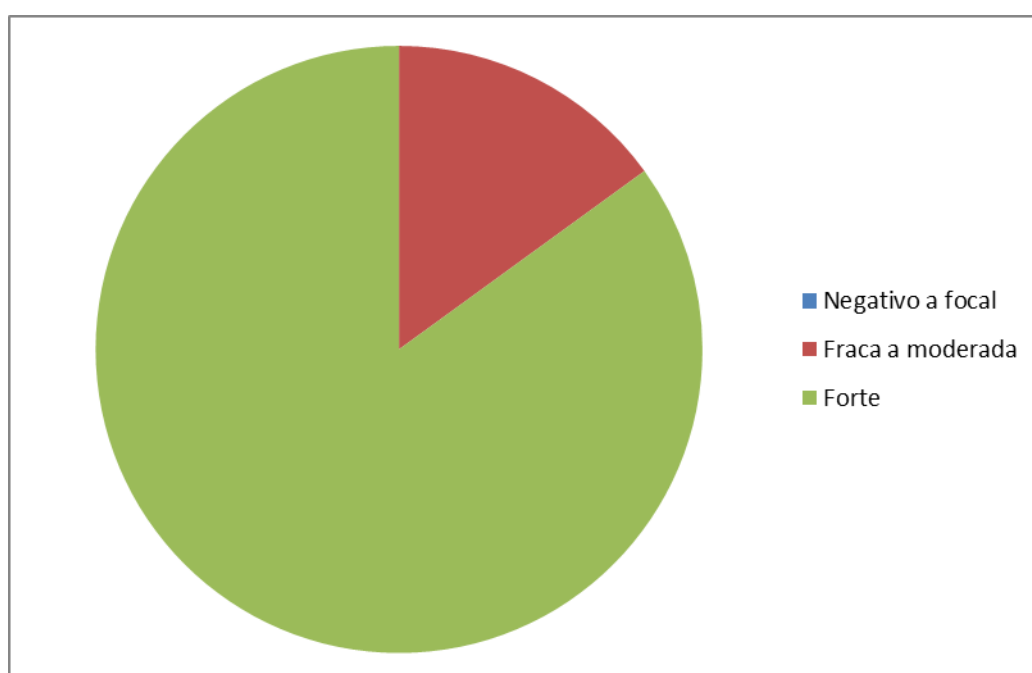


Figura 2: Expressão de IL-17 em lesões perirradiculares do grupo anemia falciforme.

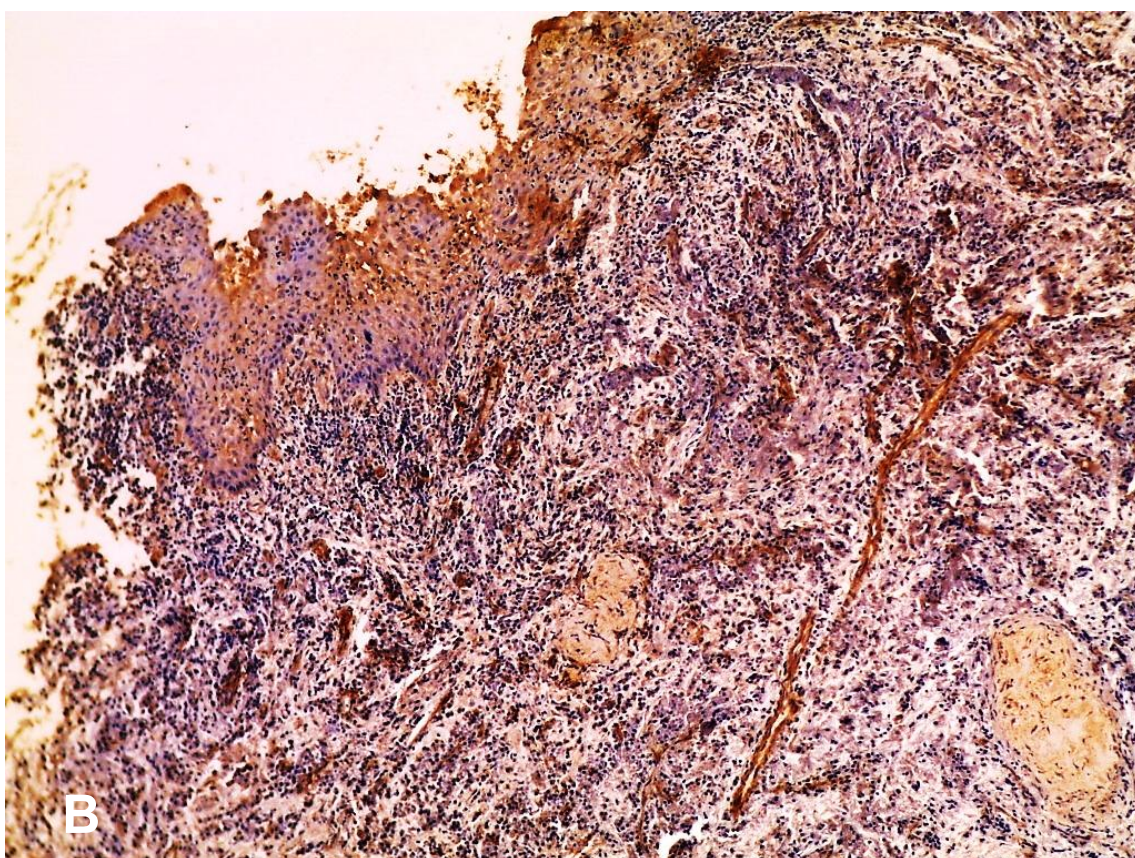
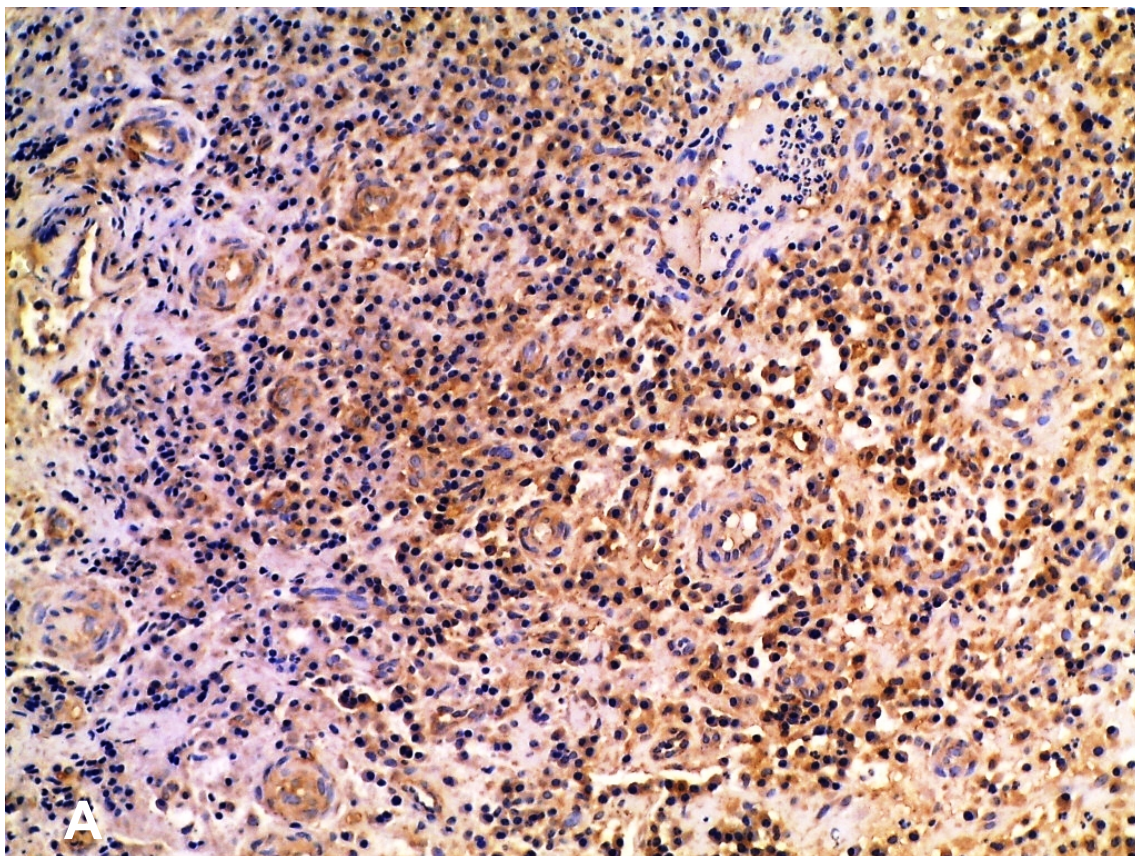


Figura 3: Fotomicrografia de cortes histológicos com marcação forte para IL-17 em lesão perirradicular do grupo anemia falciforme (imunoperoxidase; 40x). A: Granuloma. B: Cisto.

A avaliação qualitativa (Figura 4) da expressão de IL-17 nas imagens obtidas através de imuno-histoquímica (Figura 5) revelou no grupo C que 80% dos casos eram focais e 20% fracos a moderados.

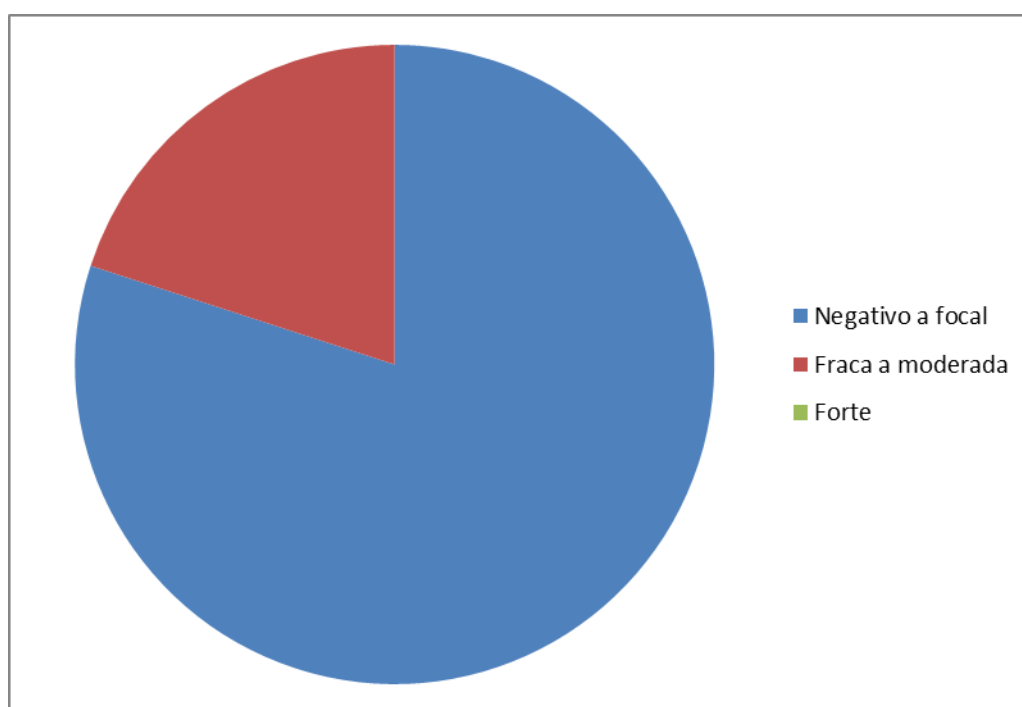


Figura 4: Expressão de IL-17 em lesões periradiculares do grupo controle.

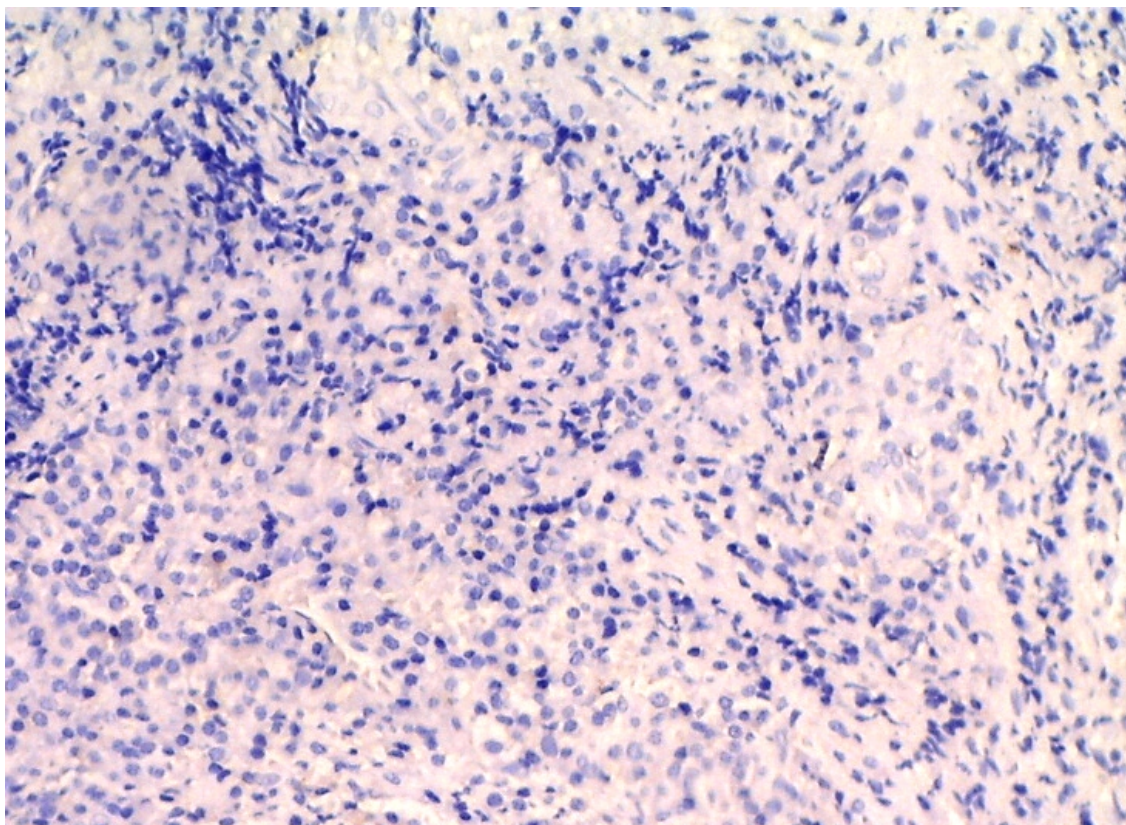


Figura 5: Fotomicrografia de corte histológico com marcação fraca para IL-17 em lesão perirradicular do grupo controle (imunoperoxidase; 40x).

A análise quantitativa de IL-17 em LP (figura 6) revelou maior expressão em casos de AF ($1,69 \pm 0,39$) quando comparado ao C ($0,35 \pm 0,19$), havendo diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$).

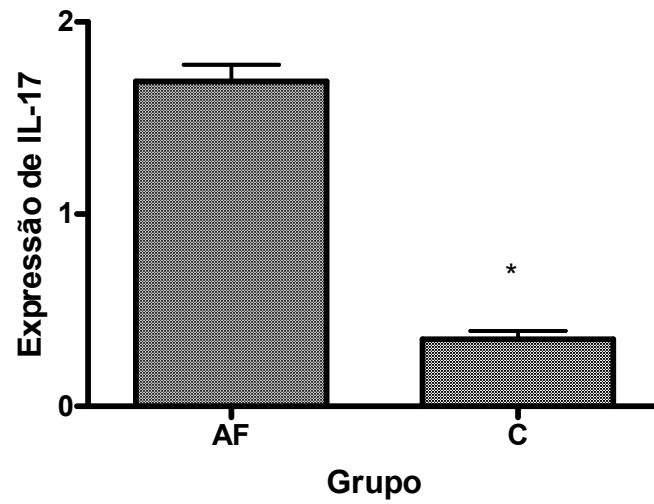


Figura 6: Comparação da expressão de IL-17 entre lesões perirradiculares dos grupos anemia falciforme (AF) e controle (C). *Mann-Whitney test*, * $p < 0,05$.

8. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a expressão de IL-17 em LP de portadores de AF. A escolha da IL-17 ocorreu devido ao fato desta citocina pró-inflamatória participar tanto do quadro inflamatório crônico característico da AF como do desenvolvimento de LP.

A avaliação de IL-17 foi realizada através de reações imuno-histoquímicas seguindo metodologia previamente estabelecida (AJUZ *et al.*, 2014). Este método permite a localização de citocinas e a análise histológica via microscopia óptica, no intuito de identificar dados individualizados sobre o progressão da LP em AF.

Foi possível verificar uma maior expressão de IL-17 em lesões do grupo AF quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$). Observou-se marcação forte na maioria dos casos do grupo AF e marcação focal na maioria dos casos do grupo C. Estes achados confirmaram a hipótese do estudo. Atualmente, existem poucas pesquisas sobre o papel da IL-17 em LP. Sabe-se da relação dessa citocina com a indução da reabsorção óssea e o desenvolvimento da doença perirradicular. Porém, não existem trabalhos que avaliem os níveis de IL-17 em LP de portadores de AF o que dificulta a comparação dos resultados.

A IL-17 apresenta-se associada ao aumento da resposta inflamatória nas LP, presença exacerbada de neutrófilos, além da estimulação da reabsorção óssea. A expressão dessa citocina na reativação constante da inflamação tem a função de eliminar microrganismos, promovendo consequentemente o aumento da LP (MARÇAL *et al.*, 2010).

COLIC *et al.* (2007) demonstraram produção de níveis elevados de IL-17 por células mononucleares de LP sintomáticas. O elevado número de neutrófilos e o aumento na produção de IL-8, aponta um papel desta citocina na exacerbação da inflamação de LP crônicas.

A relação da IL-17 com o TNF- α , possivelmente é reponsável pelas alterações óssea que ocorrem tanto nas LP, como em doenças sistêmicas (RUTGER *et al.*, 1999; AJUZ *et al.*, 2014). OSEKO *et al.* (2009) evidenciaram que a IL-17, através da estimulação da IL-8, tem capacidade de exarcebar a resposta inflamatória de LP crônicas. O estudo também aponta que o nível de IL-17 estava aumentando em lesões sintomáticas, assim como neutrófilos (AJUZ *et al.*, 2014).

Já a maior expressão de IL-17 em pacientes com AF ocorreu principalmente devido ao alto grau de complicações inflamatórias, principalmente processos crônicos, que é onde a citocina tem maior atuação. A literatura (KEIKHAEI *et al.*, 2013; BANDEIRA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014) demonstra que portadores de AF apresentam níveis elevados de IL-17 em comparação aos controles.

A AF é caracterizada por complicações sistêmicas devido a crises vaso-oclusivas, hemólise, estresse oxidativo e comprometimento de órgãos importantes como fígado e baço. O processo inflamatório mediado por citocinas é observado em diferentes etapas da fisiopatologia da doença (SHORES *et al.*, 2003; SEIXAS *et al.*, 2010; TEXEIRA, 2018). Mas ainda não existe um perfil definido destes marcadores no estado estável e durante crise vaso-oclusiva (MÁRTON & KISS, 2000; PITANGA *et al.*, 2013; TEXEIRA, 2018).

Os processos de vaso-oclusão tem como consequência a isquemia, devido ativação do endotélio através do estresse oxidativo. Acabam, por induzir continuas respostas inflamatórias na AF que se destacam por níveis elevados de citocinas (SILVA *et al.*, 2014).

Pacientes com AF apresentam altos níveis de IL-17, quando formado um quadro inflamatório crônico, que pode ocorrer mesmo no estado estacionário (BANDEIRA *et al.*, 2014). KEIKHAEI *et al.* (2013) observaram níveis altos de IL-17 em pacientes com AF em comparação aos controles, mas não houve diferença entre a AF em estado estacionário e em crise.

SILVA *et al.*, (2014) correlacionaram os níveis de citocinas relacionadas ao Th17 com os parâmetros clínicos e laboratoriais de portadores de AF. O estudo revelou uma elevada expressão de IL-17 na AF e demonstrou uma associação entre os fatores, revelando que IL-17 e IL-22 atuam como biomarcadores de alterações clínicas e hematológicas na AF.

Novos trabalhos avaliando on níveis de IL-17 em LP de portadores de AF são necessários para melhor compreender a influência desta condição na fiosiopatologia de LP

9. CONCLUSÃO

Concluiu-se através desse estudo que as LP de portadores de AF apresentaram maior expressão de IL-17 quando comparadas ao grupo controle. É provável que os frequentes quadros inflamatórios resultantes das crises de vaso-oclusão elevaram a exacerbação de citocinas pró-inflamatórias, interferindo assim no curso da doença perirradicular.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2007). *Cellular and Molecular Immunology*. 6^a ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 608p.

Ajuz NC, Antunes H, Mendonça TA, Pires FR, Siqueira JF, Armada L (2014). Immunoexpression of interleukin 17 in apical periodontitis lesions. *J Endod* 9:1400-1403.

Akamine, A, Hashiguchi, I, Toriya, Y, Maeda, K (1994). Immunohistochemical examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 10:121–128.

Alves PVM, Alves DKM, Souza MMGD, Torres SG (2006). Orthodontic treatment of patients with sickle cell anemia. *Angle Orthodontist* 2: 269-273.

Andrews CH, England MC, Kemp WB (1983). Sickle cell anemia: an etiological factor in pulpal necrosis. *J Endod* 9:249–252.

Azeredo SV, BRASIL SC, Antunes H, Marques FV, Pires FR, Armada L (2017). Distribution of macrophages and plasma cells in apical periodontitis and their relationship with clinical and image data. *J Clin Exp Dent* 9:1060-1065

Bandeira FMGC, Leal MC, Souza RR, Furtado VC, Gomes YM, Marques NM (1999). Hemoglobin S positive newborn detected by cord blood and its characteristics. *J Pediatr* 3: 167-171.

Bandeira ICJ, Rocha LBS, Barbosa MC, Elias DBD, Queiroz JAN, Freitas MVC, Gonçalves RP (2014). Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB*S haplotype. *Cytokine* 2:217-221.

Barros SADF, Assunção BRD, Santos CCD (2017). Sickle cell anemia: a review of disease, new diagnostic methods and treatment. *REAS* 9:856-863.

Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I (2003). Innate Immunity and pathogenhost interaction. *Vaccine* 21:12-23.

Bishop K, Briggs P, Kelleher M (1995). Sickle cell disease: a diagnostics dilemma. *Inst Edond J* 28:297-302.

Borges IG (2015). *Identificação da ausência de sensibilidade pulpar em dentes permanentes hígidos de pacientes com doença falciforme do município de Macapá, Amapá: Estudo de caso*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências (PPGCS), Universidade Federal do Amapá. 75p.

Botelho DS, Vergne AZ, Bittencourt S, Ribeiro EDP (2009). Sistemic profile and clinical dental procedures in pacientes with sickle cell disease. *Int J Dent* 1:28-35.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337-342.

Brandow, Amanda M, Liem, Robert IMD (2011). Sick Cell Disease in the Emergency Department: Atypical Complications and Management. *Clin Pediatr Emerg Med*. 3:202-12.

Cançado RD, Jesus JA (2007). Sick cell disease in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 3: 204-206.

Chekroun M, Chérifi, H, Fournier B, Gaultier F, Sitibon IY, Ferré FC, Gogly B (2019). Oral Manifestations of sickle cell disease. *Br Dent J* 27-31.

Colic M, Gazivoda D, Vucevic D, Vasilijic S, Rudolf R, Lukic A (2009). Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol* 47:101–113.

Colic M, Vasilijic S, Gazivoda D, Vucevic D, Marjanovic M, Lukic A (2007). Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. *Eur J Oral Sci* 115:315-320.

Cordeiro MS, Ramos RQ, Varanda LS, Scaloni RSK (2003). Sick cell anemia: clinical, laboratorial and radiographic aspects of interest to the dentist. *Rev do CROMG* 2:134-139.

Costa CPS, Thomas EBAF, Souza SDFC (2013). Association between Sick Cell Anemia and Pulp Necrosis. *J Endod* 39:177–181.

Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA (1997). A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Rev Clin Microbiol* 10:742-780.

Eaton W, Hofrichter J. Sick Hemoglobin Polymerization (1996). In: Embury S, Heibel R, Mohandas N, Steinberg S. *Sickle cell disease: basic principles and clinical practice*. Filadélfia: Lippincot-Raven, 53-87.

Ferreira LGV (2013). *Análise imuno-histoquímica e por imunofluorescência da expressão da interleucina 17 em abscessos e granulomas periapicais*. Tese de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Odontologia (PPGO), Universidade de São Paulo.84p.

Fonseca MD, Oueis Hs, Casamassino PS (2007). Sick cell anemia: a review for the pediatric dentist. *Pediatr Dent* 2:159-69.

Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 183:2593-2603.

Franco BDM, Gonçalves JCH, Santos CRRD (2007). Buccal manifestations of sickle cell anemia and their implications in the dentistry services. *Arq Odonto* 3: 92-96.

Friendlander AH, Genser L, Swerdloff M (1980). Mental nerve neuropathy: a complication of sickle-cell crisis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 49:175–177.

Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ (2009). Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol* 24:25-31.

Gaffen SL (2004). Interleukin-17: a unique inflammatory cytokine with roles in bone biology and arthritis. *Arth Res Ther* 6:240-247.

Gómez-Chiari M, Puigbert JT, Aramburu JO (2003). Sickle cell anemia: experience in a center. *An Pediatr* 58:95-99.

Graves DT, Oates T, Garlet GP(2011). Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol* 17:5304-5319.

Gregory G, Olujohungbe A (1994). Mandibular nerve neuropathy in sickle cell disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 77: 66–69.

Gu C, Wu L, Li X (2013). IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* 64: 477–485.

Guglani L, Khader S (2010). TH17 cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Curr Opin HIV AIDS* 2:120-127.

Hariri E, Mansour AEI, Alam A, Daaboul Y, Korjian S, Aoun BS (2018) . Sickle cell nephropathy: an update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Int Urol Nephrol* 50: 1075–1083.

Hosni JS, Fonseca MS, Silva LCPD, Cruz RDA (2008). Dental treatment protocol for sickle cell anemia patient. *Arq bras odontol* 2:104 – 112.

Kawashima, N, Stashenko, P (1999). Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol* 44:55–66.

Kaya AD, Aktener BO, Unsal Ç (2004). Pupal necrosis witch sickle cell anaemia. *Int Endod J* 37: 602- 606.

Keikhaei B, Mohseni AR, Norouzirad R, Norouzirad R, Alinejadi M, Ghanbari S, Shiravi F, Solgi G (2013). Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. *Eur Cytokine Netw* 1:45-52.

Kikuchi, BA (2003). Anemia Falciforme. *Manual para agentes de educação e saúde*. 2ª ed. Belo Horizonte: Editora Health, 80p.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2009) . IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 27:485–517.

Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T (1999). IL-7 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis in a potente stimulator of osteoclastogenesis. *J clin Invest* 103:1345-1342.

Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF (2009). Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of SCA patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol* 2: 235 -242.

Lin E, Calvano SE, Lowry SF (2000). Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 127:117-126.

Loureiro MM, Rozenfeld S (2005). Epidemiology of sickle cell disease hospital admissions in Brazil. *Rev Saúde Pública* 6: 943-951.

Maciel KF (2015). *Papel da IL-17 na imunopatogênese de lesões periapicais experimentais*. Dissertação de Doutorado, Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal de Minas Gerais. 122p.

Makis AC, Hatzimichael EC, KL Bourantas (2000). The role of cytokines in sickle cell disease. *Ann Hematology* 8: 407-413.

Manwani D, Frenette OS (2013). Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. *Blood* 3:892-898.

Marçal JRB, Samuel RO, Fernandes D, Araujo MS, Napimoga MH, Pereira SAL, Clemente-Napimoga JT, Alves PM, Mattar R, Rodrigues V, Rodrigues DBR (2010). T-helper Cell Type 17/ regulatory T-cells immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod* 36: 995-999.

Márton IJ, Kiss C (2000). Protective and destructive immune reactions in apical Periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 15:139-150.

Mendes PHC (2010). *Manifestações orofaciais em pacientes com anemia falciforme*. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde - PPGCS), Universidade Estadual de Montes Claros. 64p.

Menezes R, Garlet TP, Letra A, Bramante CM, Campanelli AP, Figueira R de C, Sogayar MC, Granjeiro JM, Garlet GP (2008). Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in 83

human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of lesions. *J Endod* 34:932-938.

Ministério da Saúde do Brasil (2007). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. *Manual de Saúde Bucal na Doença Falciforme*. 2ª ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 76p.

Ministério da Saúde do Brasil (2008). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. *Manual de Educação em Saúde*. Brasília: Ministério da Saúde. 1ª ed. Brasília: Editora MS, 72p.

Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y (2003). Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171:6173- 6177.

Napolitani G, Acosta-Rodriguez EV, Lanzavecchia A, Sallusto F (2009). E2 enhances Th17 responses via modulation of IL-17 and IFN-gamma production by memory CD4+T cells. *Eur J Immunol* 5: 1301 -1312.

Naufel CCS, Braga JAP, Cançado RD, Langhi Jr. DM, Bordin JO (2002). Hyper-hemolytic transfusional reaction in sickle cell patients: Two case reports. *Rev Bras Hematol Hemoter* 24:292-9.

Nuzzo DVPD, Fonseca SF (2004). Sickle cell disease and infection. *J Pediatr* 5:347-54.

Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R (2011). Cytokines and pain. *Rev Bras Anesthesiol* 61:260-265.

Oseko F, Yamamoto T, Akamatsu Y, Kanamura N, Iwakura Y, Imanishi J, Kita M (2009). IL-17 is involved in bone resorption in mouse periapical lesions. *Microbiol immunol* 53:87-294.

Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y (2008). The biological functions of T helper 17 effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28:454–467.

Patton LL, Brahim JS, Travis WD (1990). Mandibular osteomyelitis in a patient with sickle cell anemia: report of case. *JADA* 1:602-604.

Peixoto RF, Peixoto DF (2012). Etiopathogenic and immunologic aspects of chronic inflammatory periapical lesions. *Cient Ciênc Biol Saúde* 3:175-82.

Pitanga TN, Vilas-Boas W, Cerqueira BAV (2013). Cytokine profiles in sickle cell anemia: Pathways to be unraveled. *Scientific Research* 4:6-12.

Rankine MAE, Owusu OS (2017). Prophylactic antibiotics for preventing pneumococcal infection in children with sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev* 10: CD003427.

Roças IN, Siqueira JF jr, Lopes HP, Pires FR (2015). *Endodontia – Biologia e Técnica*. In: Lopes HP, Siqueira JF (eds). 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 15-45p.

Rodrigues DOW, Ferreira ACB, Pereira PM, Bustamante MTT, Campos EMS, OLIVEIRA CM (2010) Historical diagnosis about neonatal screening for sickle cell disease. *Rev APS* 1: 35.

Rodrigues MJ, Menezes VAD, Luna ACA (2013). Oral health in patients with cell anemia. *Rev Gaúcha Odontol* 61:505-510.

Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, Denizot F, Golstein P (1993). CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol* 152:5445–5456.

Rutger LVB, Hetty CMF, Socrates EP, Clemens WGML (1999). Interleukin-17: a new bone acting cytokine in vitro. *J Bone Miner Res* 14:1513-1531.

Sanger RG, Bystrom EB (1977). Radiographic bone changes in sickle cell anemia. *J Oral Med* 2:32-37.

Sanger RG, McTigue DJ (1978). Sickle cell anemia – Its pathology and management. *J Dent Handicap* 3: 9-21.

Santos RSL (2015). *Immunoexpression of CD4, CD25, IL-10, IL-17 and FOXP3 in radicular cysts*. Dissertação de Doutorado, Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. 65p.

Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation an bone destruction. *J Exp Med* 203:2673-2682.

Segura-Egea JJ, Jiménez-Pinzón A, Ríos-Santos JV, Velasco-Ortega E, Cisneros-Cabello R, Poyato-Ferrera M (2005). High prevalence of apical periodontitis amongst type 2 diabetic patients. *Int Endod J* 38: 564-569.

Segura-Egea JJ, Martín-Gonzalez J, Castellanos-Cosano L (2015). Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J* 48 :933–951.

Seixas MO, Rocha LC, Carvalho MB, Menezes JF, Lyra IM, Nascimento VM, Goncalves MS (2010). Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease. *Lipids Health Dis* 9: 91

Serjeant GR, Loy LL, Crowther M, Hambleton I, Thame M (2004). Outcome of Pregnancy in Homozygous Sickle Cell Disease. *Obstet Gynecol* 06:1278-1285.

Shnorhokian HI, Chapman DC, Nazif MM, Zullo TG (1984) . Cephalometric study of American black children with sickle-cell disease. *ASDC J Dent Child* 6:431-433.

Shores J, Peterson J, Vander Jagt D, Glew RH (2003). Reduced cholesterol levels in African-American adults with sickle cell disease. *J Natl Med Assoc* 9:813-817.

Silva RAD, Mendes SDO, Medeiros MO, Alves SM (2016). Population Genetic Assessment Of Sickle Cell Disease From Blood Donors In Rondonópolis, Mato Grosso, Brazil. *Biodiversidade* 3:111-120.

Silva DRR, Pereira MC, Rêgo MJB, Hatzlhoferd BL, Araújo ADS, Bezerra MAC, Pitta IDR, Pitta MGDR (2014). Evaluation of Th17 related cytokines associated with clinical and laboratorial parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine* 2:143-147.

Silva RBP, Ramalho AS, Cassoria RMS (1993). The sickle cell disease as a Public Health problem in Brazil. *Rev Saúde Pública* 1:54-58.

Siqueira JF Jr. *Treatment of endodontic infections*. 1ªed. Quintessence Publishing, 403p.

Soares EPB, Silva DSD, Xavier ASG, Carvalho ESDS, Cordeiro RC, Araújo EMD (2014). Cuidar de pessoas com doença falciforme na unidade de emergência: discurso de uma equipe multiprofissional. *Cienc Cuid Saude* 2:278-285.

Sommer C, White F (2010). Cytokines, Chemokines, and Pain. In: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson AH (eds). *Pharmacology of Pain*. Seattle,WA: IASP Press, 279-302.

Souza PHG, Oliveira RSMFD, Rocha MD, Gravina MA, Vitral RWF (2008). Alterações esqueléticas craniofaciais em portadores de anemia falciforme na cidade de Juiz de Fora. *HU Rev* 2:85-91.

Takahashi CRI, Santos JD, Nunes FD, Araújo NS (1993). Atendimento odontológico ao paciente com anemia falciforme. *Rev odontopediatr* 2: 215-218.

Takahashi K (1998). Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J* 31:311-325.

Takayanagi H (2005a). Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodont Res* 40:287–293.

Takayanagi H (2005b). Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* 83: 170-179.

Tapper M (1999). In the Blood: *Sickle Cell Anemia and the Politics of Race*. 1ª ed. Filadélfia: University of Pennsylvania Press, 160p.

Trowbridge HO, Emiling RC (1997). *Inflammation. A review of the process*. 5ªed. Chicago:Quintessence, 236p

Taylor LB, Nowak AJ, Giller RH, Casamassimo OS (1995). Sickle cell anemia: a review of the dental concerns and a retrospective study of dental and bony changes. *Spec Care Dentist* 15:38–42.

Taylor LEV, Stotts NA, Humphreys J, Treadwell MJ, Miaskowski C (2010). Review of the Literature on the Multiple Dimensions of Chronic Pain in Adults with Sickle Cell Disease. *J Pain Symptom Manage* 3:416- 435.

Texeira RDS (2018). *Higher Values of Triglycerides: HDL-Cholesterol Ratio - A Marked Potential for Vascular Injury in Children with Sickle Cell Anemia*. Dissertação de Doutorado do Curso Pós Graduação em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.161p.

Tsatala SK, Kolokytha O, Kaklamanos EG, Antoniadis K, Chasapopoulou E (2004). Mandibular lesions of vasocclusive origin in sickle cell hemoglobinopathy. *Odontology* 92: 62-72.

Vichinsky E (2017). Chronic organ failure in adult sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 1:435-439.

Walsh LJ (2003). Mast cells and oral inflammation. *Crit Ver Oral Biol Med* 14:188-198.

Wang MX, Pepin EW, Verma N, Mohammed TL (2018). Manifestations of sickle cell disease on thoracic imaging. *Clin Imaging* 48:1-6.

Yu, JJ, Gaffen SL (2008). Interleukin 17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Front Biosci* 13:170-177.

Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, Sfintescu C, Baker PJ, Smith JB, Evans RT, Gaffen SL (2007). An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood* 109:3794–3802.

Zago MA (2001). *Manual de Doenças Mais Importantes, por Razões Étnicas, na População Afro-descendente*. Secretaria de Políticas Públicas, org Brasília: Ministério da Saúde 78p.

11. ANEXOS



GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE


HEMORIO
INSTITUTO ESTADUAL DE HEMATOLOGIA
ARTHUR DE SIQUEIRA CAVALCANTI

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HEMORIO

Rio de Janeiro, 09 de novembro de 2016.

ASSUNTO: Parecer consubstanciado de projeto de pesquisa avaliado pelo CEP HEMORIO

Prezada Pesquisadora,

O projeto, "**Avaliação da influência de distúrbios de coagulação na manifestação de lesões perirradiculares**", registrado no CEP HEMORIO sob o número 402/16, foi apresentado de acordo com a Resolução 466/12. Assim, após apresentação e análise dos documentos recebidos, o Comitê de Ética em Pesquisa HEMORIO considera o projeto **APROVADO**.

Ressaltamos abaixo, algumas orientações fundamentais, as quais o pesquisador deve estar muito atento:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado;
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeira ação imediata;
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificações ao CEP e à ANVISA, junto com seu posicionamento;
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente até 09/05/2017 e ao término do estudo.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Frei Caneca, 8 – Centro – Rio de Janeiro – CEP 20211-030
Tel.: (21) 2299-9442 R. 2215 – Fax: 2242-4250 – www.hemorio.rj.gov.br – cep@hemorio.rj.gov.br



Sendo assim, por favor, contate a Coordenação do CEP HEMORIO (Sra. Marcia Villa Nova, Thaís Oliveira ou Joselaine Sousa) pelo telefone 2332-8612, ramal 2415, a fim de estabelecermos o fluxo de sua pesquisa e tomarmos outras providências pertinentes.

Atenciosamente,

Marcia Villa Nova
Coordenadora do CEP HEMORIO