

## **Valutazione morfologica ed immunoistochimica di una serie di granulomi apicali, risultati preliminari**

**Parola chiave: granulomi apicali - immunoistochimica**

### **Introduzione**

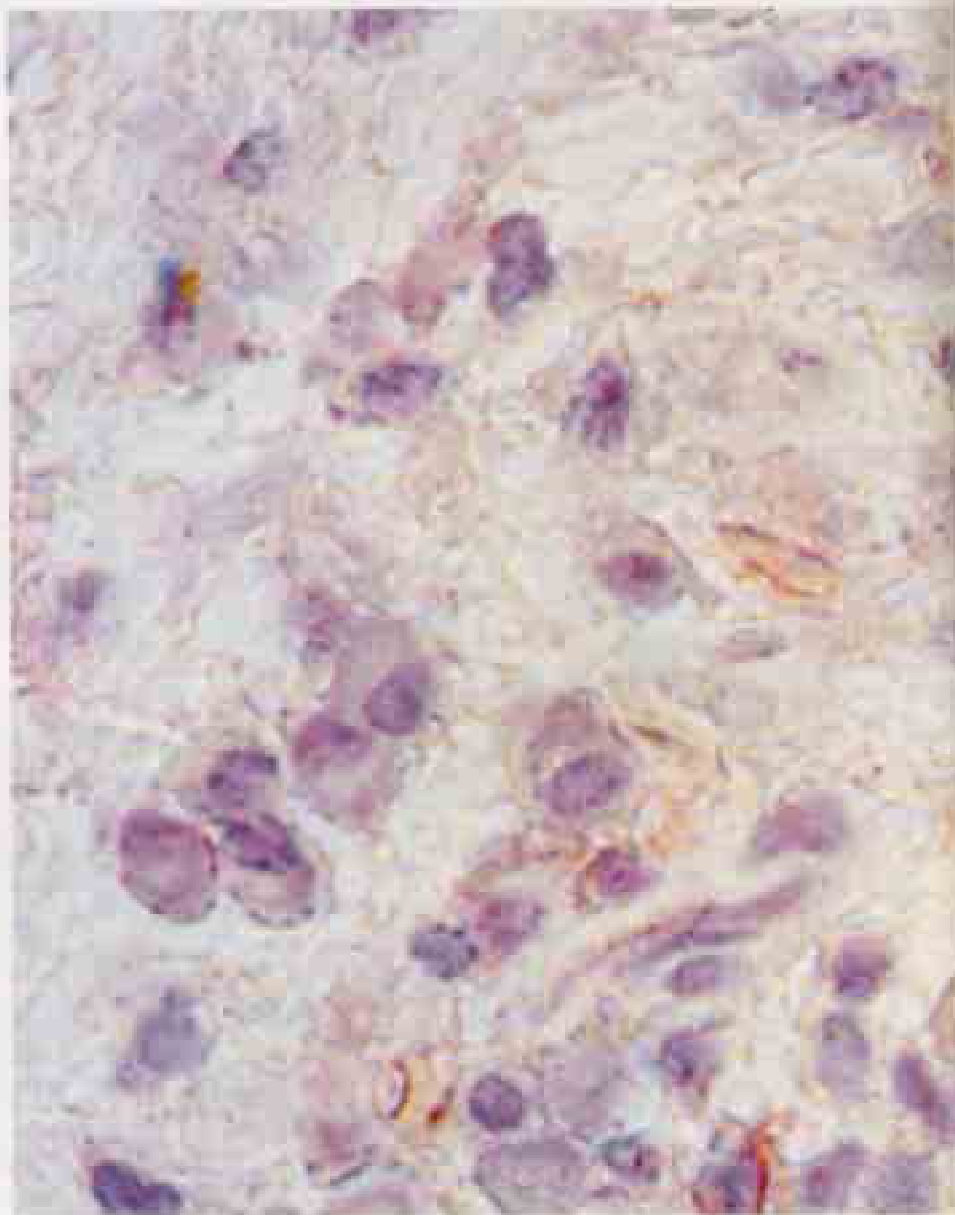
Il granuloma apicale è una conseguenza comune della necrosi pulpare.

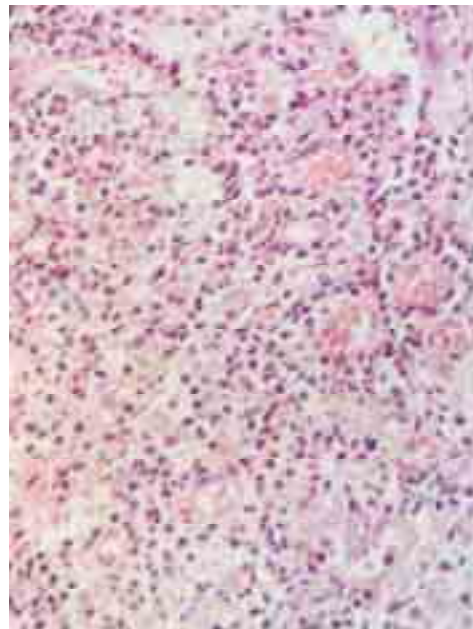
Istologicamente, la lesione si presenta come tessuto di granulazione ricco di cellule delimitato da una zona di tessuto connettivo fibroso.

Nel tessuto di granulazione sono presenti infiltrati di cellule mononucleate (linfociti, plasmacellule, monociti/macrofagi e mast-cells) e granulociti in numero variabile.

La presenza di linfociti e plasmacellule sta ad indicare il verificarsi di una risposta immunitaria locale. Una ulteriore caratterizzazione dei vari tipi cellulari può dare preziose informazioni sulla patogenesi delle sopra menzionate lesioni.

Gli anticorpi monoclonali possono riconoscere una ampia gamma di antigeni di superficie, la cui espressione è correlata all'ontogenesi ed agli stadi maturativi dei linfociti T e B (1, 2, 3). La determinazione di questi antigeni però, sino a non molto tempo fa, era possibile solo su sezioni criostatate, tranne rare eccezioni come l'antigene LEU IM, identificabile anche su sezioni fissate ed incluse in paraffina (4). Ciò ha rappresentato sovente un grosso limite, dal momento che non sempre vi sono le condizioni laboratoristiche ottimali per congelare il campione. La comparsa sul mercato di una serie di anticorpi monoclonali qua-

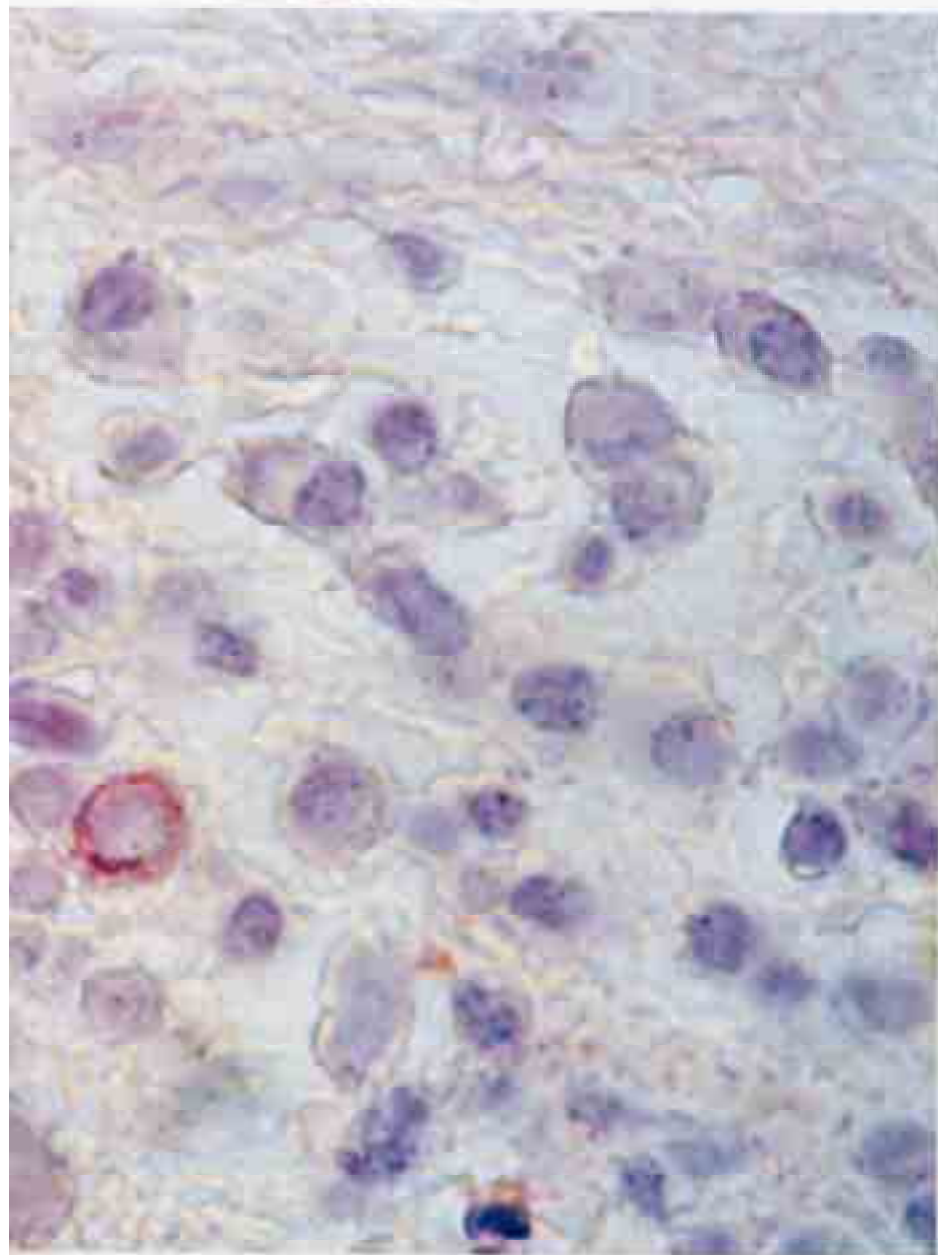




**G. Saccani Jotti\*, G. Lavagnoli, L. Fiamminghi, S. Frigeri, M. Bonanini, M. Fontanesi, G. Becchi**

\*Department of Anatomy and Pathology - University of Parma department Restorative Dentistry - University of Parma

## **Morphological and immuno histochemical of a series of apical granulomas: preliminary results**



### **Introduction**

Apical granuloma is a common consequence of pulp necrosis. From a histological standpoint, the lesion presents as granulation tissue with abundant cells; it is surrounded by an area of fibrous connective tissue.

The granulation tissue also contains mononuclear cell infiltrates (lymphocytes, plasma cells, monocytes, macrophages and mast cells) and varying numbers of granulocytes.

The presence of lymphocytes and plasma cells is proof of a local immune response. Further characterization of the various cell types may provide useful information about the pathogenesis of these lesions.

Monoclonal antibodies can identify a wide variety of surface antigens whose appearance is correlated with ontogenesis and the maturation stages of T- and B-lymphocytes (1, 2, 3). Until just a short time ago, however, detection of these antigens was only feasible on frozen sections. Identification on paraffin-embedded sections was only possible in rare cases, such as that of the antigen LEV 1M (4). This fact often represented a serious obstacle since optimal laboratory conditions for freezing samples are not always available. Thus, the marketing of a series of monoclonal antibodies which are also effective on paraffin-embedded tissue (see Table 1) has opened up new horizons (5).

⇒

**Tabella 1.** Esempi di reattività degli anticorpi monoclonali della serie Clonab con cellule leucocitarie impiegando sezioni di tessuto incluse in paraffina.

	Classe Ig	MW (kD)	Positività nei linfonodi
CLONAB ML	IgG1	200 190 110 100	tutti i leucociti
CLONAB MT1	IgG1	190 110 100	cellule T, istiociti
CLONAB MT2	IgG1	200 190	cellule T e B mature
CLONAB MB1	IgG1	200 110 100	tutte le cellule B, alcune cellule T
CLONAB MB2	IgG1	28	tutte le cellule B
CLONAB LN1	IgM	45 - 85	cellule B del centro germinale
CLONAB LN2	IgG1	31	cellule B, istiociti
CLONAB LN3	IgG2a	29 - 33	HLA-DR (Ia)

li quelli riportati nella Tabella 1, efficaci anche su tessuti fissati ed inclusi in paraffina, ha aperto quindi nuove prospettive (5).

Una serie di 30 lesioni periapicali è stata studiata da un punto di vista morfologico ed immunohistochimico, al fine di meglio caratterizzare le differenti popolazioni cellulari e comprendere quindi l'etiopatogenesi delle lesioni stesse.

## Materiali e metodi

La casistica è stata fornita dalla Cattedra di Odontoiatria Conservatrice dell'Università degli Stati di Parma e lo studio morfologico ed immunohistochimico è stato eseguito presso l'Istituto di Anatomia ed Istologia Patologica dell'Università stessa. L'indagine immunohistochimica con anticorpi monoclonali è stata effettuata con il metodo avidin-biotin (ABC, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Ca., USA) (6) su tessuto fissato e routinariamente incluso in paraffina; come cromogeno si è utilizzato il 3-amino-9-etil carbazolo (AEC, Sigma, St. Louis, USA). Solo in tre casi è stato possibile il congelamento del campione e quindi l'esame di sezioni criostatate. Sono stati testati i seguenti anticorpi:

- su sezioni criostatate: T Cell Panel Kit, fornito dalla Becton-Dickinson Co (Mountain View, CA)
- su sezioni incluse in paraffina: MT1, MT2, MB1, MB2, MB3, LN1, LN2, forniti dalla Clonab,

**Tabella 2.** Casistica

Diagnosi Istopatologica	N. Casi	C	P
Granulomi	28	3	25
Cisti	2	/	2

C: sezioni crostate; P: sezioni incluse in paraffina.

## Risultati

La casistica è riassunta nella Tabella 2. Tutte le lesioni sono risultate positive per entrambi i linfociti (T e B). I T, che rappresentano la componente predominante, sono stati riscontrati in numero estremamente variabili non solo da sezione a sezione,

ma anche da una zona all'altra di una stessa sezione e talora anche sottoforma di "clusters". L'analisi delle sottopopolazioni ha evidenziato una netta prevalenza dei T helper sui T suppressor (rapporto 2:1). Positività immunohistochimica si è avuta inoltre per i granulociti, le plasmacellule ed i macrofagi.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Bahn A.K.: Application of monoclonal antibodies to tissue diagnosis. In: *Advances in Immunohistochemistry* (De Lellis R.A., ed.) pp. 1-29 New York, Masson Publishing Inc. 1984.
- 2) Cohen C., Jimenez J.F. and Horn H.V.: Monoclonal antibodies for detection of lymphocyte markers: comparison of three commercial kits. *Amer. J. Clin. Pathol.* 85: 438-444, 1986.
- 3) Warnke R. and Levy R.: Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish-peroxidase method. *J. Histochem. Cytochem.* 28: 771-776, 1980.
- 4) Kornstein M.J., Bonner H., Gee B. et al.: Leu M 1 and S-100 in Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphomas. *Amer. J. Clin. Pathol.* 85: 433-437, 1986.
- 5) Poppema S., Hollema H., Vixter H. et al.: Monoclonal antibodies (MT1, MT2, MB1, MB2, MB3) reactive with leucocyte subsets in paraffin-embedded tissue sections. *Amer. J. Pathol.* 127: 418-429, 1987.
- 6) Hsu S.M., Raine L. and Fanger H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-580, 1981.



**Table 1.** Esempio of monoclonal antibody (Clonab series) reactivity with leukocytes utilizing sections embeshled in paraffin.

	Class Ig	MW (kD)	Lymponode Positivity
CLONAB ML	IgG1	200 190 110 100	All leukocytes
CLONAB MT1	IgG1	190 110 100	T-cells, histiocytes
CLONAB MT2	IgG1	200 190	Mature T- and B- cells
CLONAB MB1	IgG1	200 110 100	All B- cells, some T-cells
CLONAB MB2	IgG1	28	All B- cells
CLONAB LN1	IgM	45 - 85	Germinal center B-cells
CLONAB LN2	IgG1	31	B- cells, histiocytes
CLONAB LN3	IgG2a	29 - 33	HLA-DR (Ia)

A series of 30 periapical lesions was analyzed from both a morphological and immunohistochemical perspective in order to better characterize the various cell populations and thereby gain an understanding of the etiopathogenesis of the lesion.

## Material and Methods

The case series was provided by the Department Restorative Dentistry at the University of Parma. Morphological and immunohistochemical tests were performed by the Department of Anatomy and Pathology at the same University. Immunohistochemical analysis with monoclonal antibodies was carried out on tissue fixed and embedded in paraffin using the avidinbiotin method (ABC, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) (6); 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC, Sigma, St. Louis, MO, USA) was used as chromogen. Freezing of the sample, and subsequent examination of the frozen sections, was only possible in three cases.

The following antibodies were tested: a) on frozen sections: T-cell Panel Kit, supplied by Becton-Dickenson Co. (Mountain View, CA, USA); b) on paraffin-embedded sections: MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub>, MB<sub>1</sub>, MB<sub>2</sub>, LN<sub>1</sub>, LN<sub>2</sub>, supplied by Clonab.

**Table 2.** Case series

Histopathologic Diagnosis	N. of Cases	Sections	
		Frozen	Paraffin
Granulomas	28	3	25
Cysts	2	/	2

## Results

Table 2 presents the case series. All lesions were positive for both T- and B-lymphocytes occasionally appeared in the form of clusters. Analysis of the su-

bpopulations demonstrated the clear predominance of T-helper, as opposed to T-suppressor, lymphocytes; the ratio was 2:1. The histochemical stain was also positive for granulocytes, plasma cells and macrophages.

## REFERENCE

- 1) Bahn A.K.: Application of monoclonal antibodies to tissue diagnosis. In: *Advances in Immunohistochemistry* (De Lellis R.A., ed.) pp. 1-29 New York Masson Publishing Inc. 1984.
- 2) Cohen C., Jimenez J.F. and Horn H.V.: Monoclonal antibodies for detection of Lymphocyte markers: comparison of three commercial kits. *Amer. J. Clin. Pathol.* 85: 438-444, 1986.
- 3) Warnke R. and Levy R.: Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish-peroxidase method. *J. Histochem. Cytochem.* 28: 771-776, 1980.
- 4) Kornstein M.J., Bonner H., Gee B. et al.: Leu M 1 and S-100 in Hodgkin's disease and non-Hodgkin's Lymphomas. *Amer. J. Clin. Pathol.* 85: 433-437, 1986.
- 5) Poppema S., Hollma H., Visser H. et al.: Monoclonal antibodies (MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub>, MB<sub>1</sub>, MB<sub>2</sub>, MB<sub>3</sub>) reactive with leucocyte subsets in paraffin-embedded tissue sections. *Amer. J. Pathol.* 127: 418-429, 1987.
- 6) Hsu S.M., Raine L. and Fanger H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-580, 1981.