



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



José Flávio Affonso de Almeida

Identificação imunohistoquímica de células imunológicas e inflamatórias em polpas dentais normais e inflamadas

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Doutor em Clínica Odontológica - Área de Endodontia.

**Piracicaba
2006**

José Flávio Affonso de Almeida

Cirurgião-Dentista

**Identificação imunohistoquímica de células
imunológicas e inflamatórias em polpas dentais
normais e inflamadas**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Doutor em Clínica Odontológica - Área de Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia

Banca Examinadora:

Prof Dr. Celso Luiz Caldeira

Profa. Dra. Márcia Carneiro Valera

Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia

Profa. Dra. Brenda Paula F. de Almeida Gomes

Prof Dr. Francisco José de Souza Filho

Piracicaba

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

AL64i	<p>Almeida, José Flávio Affonso de. Identificação imunohistoquímica de células imunológicas e inflamatórias em polpas dentais normais e inflamadas. / José Flávio Affonso de Almeida. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Alexandre Augusto Zaia Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p style="text-align: center;">1. Polpa dentária. 2. Imunohistoquímica. 3. Células imunocompetentes. 4. Pulpite. I. Zaia, Alexandre Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(mg/fop)</p>
-------	---

Título em inglês: Immunohistochemical identification of immunocompetent and inflammatory cells in healthy and inflamed dental pulps

Palavras-chave em inglês (Keywords): 1. Dental pulp. 2. Immunohistochemistry. 3. Immunocompetent cells. 4. Pulpitis

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora: Celso Luiz Caldeira, Márcia Carneiro Valera, Alexandre Augusto Zaia, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Francisco José de Souza Filho

Data da defesa: 03/05/2006

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	
V	EX
TOMBO BC/	68621
PROC.	16.123.06
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	1,00
DATA	06/06/06

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

AL64i Almeida, José Flávio Affonso de.
Identificação imunohistoquímica de células imunológicas e inflamatórias em polpas dentais normais e inflamadas. / José Flávio Affonso de Almeida. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.

Orientador: Alexandre Augusto Zaia
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Polpa dentária. 2. Imunohistoquímica. 3. Células imunocompetentes. 4. Pulpite. I. Zaia, Alexandre Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em inglês: Immunohistochemical identification of immunocompetent and inflammatory cells in healthy and inflamed dental pulps

Palavras-chave em inglês (Keywords): 1. Dental pulp. 2. Immunohistochemistry. 3. Immunocompetent cells. 4. Pulpitis

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora: Celso Luiz Caldeira, Márcia Carneiro Valera, Alexandre Augusto Zaia, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Francisco José de Souza Filho

Data da defesa: 03/05/2006



DEDICATÓRIA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



À minha família: meus pais Honor e Vera, meus irmãos Neto, Ana e João e meu sobrinho Gustavo. Fazer parte de uma família amável e coesa me traz paz para lutar por meus objetivos. Amo muito vocês!

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 03 de Maio de 2006, considerou o candidato JOSÉ FLÁVIO AFFONSO DE ALMEIDA aprovado.

PROF. DR. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

PROF. DR. CELSO LUIZ CALDEIRA

PROFa. DRa. MÁRCIA CARNEIRO VALERA GARAKIS

PROFa. DRa. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

PROF. DR. FRANCISCO JOSE DE SOUZA FILHO

DEDICATÓRIA

À minha família: meus pais **Honor e Vera**, meus irmãos **Neto, Ana e João** e meu sobrinho **Gustavo**. Fazer parte de uma família amável e coesa me traz paz para lutar por meus objetivos. Amo muito vocês!

À **Danna**. Pelo amor, carinho, respeito e atenção durante todos os momentos de nossa convivência e da busca de meus ideais. É muito gratificante poder estar ao seu lado.

Aos meus amigos **João Paulo, Ricardo, Rafael, Paulo Henrique e Guilherme**. Uma amizade concisa torna maiores os braços de uma família. Nossa convivência me deu força pra transpor os momentos difíceis distante de minha família.

Ao meu orientador, **Prof. Alexandre Augusto Zaia**, um exemplo de paciência e generosidade. Sou muito grato pelos ensinamentos transmitidos, pela amizade e por acreditar em meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que me ilumina e me faz companhia por toda vida.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Thales de Mattos Rocha Filho**.

Ao **Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen**, coordenador geral do curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Ao **Prof. Dr. Roger William Fernandes Moreira**, coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Aos docentes da Disciplina de Endodontia **Prof. Luiz Valdrighi, Prof. Francisco José de Souza Filho, Profa. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e Prof. Caio Cezar Randi Ferraz** por terem singelamente transmitido sua experiência e fraternidade.

Aos membros da banca de qualificação **Profa. Ericka Tavares Pinheiro, Profa. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e Prof. Jacks Jorge Júnior** por compartilhar seus conhecimentos.

À Profa. **Glaucia Maria Bovi Ambrosano** por gentilmente me auxiliar na estatística desse trabalho.

Aos colegas de doutorado **Adriana de Jesus Soares, Juliana Nascimento Santos, Luciano Tavares Ângelo Cintra, Neylla Teixeira Sena, Thais Accorsi Mendonça, Vanessa Bellocchio Berber**, pela amizade construída, pelo aprendizado em conjunto e pela convivência pacífica durante esses anos de nossa formação.

Aos colegas do mestrado **Ana Carolina Machado Rocha Lima, Danna Mota Moreira, Frederico Canato Martinho e Maráisa Greggio Delboni** pela harmonia e amizade durante esses anos.

Aos colegas de pós-graduação **Douglas Giordani Negreiros Cortez, Daniel Pinto de Oliveira, Rogério Jacinto Castilho, Helena Campos Habbang, Morgana Eli Viana, Fábio Roberto Dametto, Iadasa de Quadros, Renata Ribeiro Bruzadelli, Tetis Serejo Sauáia e Cláudio Maniglia Ferreira**, pela amizade compartilhada.

Aos estagiários da Disciplina de Endodontia **Francisco Montagner e Giselle Priscilla Cruz Abi Rached** pela ajuda e atenção dispensadas.

Aos funcionários da Disciplina de Endodontia **Adailton dos Santos Lima, Rubens Marques Payão e Wanderly Lima de Almeida Pavinatto**, pelo auxílio no trabalho diário e amizade.

À **Ana Cristina do Amaral Godoy** por me orientar nos procedimentos de imunohistoquímica e pelo carinho que dispensou a mim, como o faz a todas as pessoas que se aproximam de você. Sua presença foi crucial para a elaboração desse trabalho.

Aos colegas da Disciplina de Patologia **Jorge Esquiche León e Dawton Abranches Pulhes**, pela ajuda nos procedimentos de imunohistoquímica.

À **CAPES** e à **FAPESP** pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Linfócitos T	7
2.2 Linfócitos B	8
2.3 Macrófagos	9
2.4 Mastócitos	10
2.5 Presença de células imunológicas e inflamatórias na polpa dental	11
2.6 Sintomatologia clínica e inflamação pulpar	17
3 PROPOSIÇÃO	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Amostras	20
4.2 Remoção das polpas	22
4.3 Imunohistoquímica	25
5 RESULTADOS	29
5.1 Coloração em hematoxilina e eosina	29
5.2 Marcação imunohistoquímica	31
5.2.1 Polpas normais	31
5.2.2 Polpas inflamadas	32
6 DISCUSSÃO	42
6.1 Linfócitos T	42
6.2 Linfócitos B	45
6.3 Macrófagos	48
6.4 Mastócitos	51
6.5 Correlação entre os aspectos clínicos e imunohistoquímicos	54
7 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	68

RESUMO

Este estudo teve como objetivos identificar por técnica de imunohistoquímica linfócitos T4, linfócitos T8, linfócitos B, macrófagos e mastócitos em tecidos pulpare normais e inflamados de dentes humanos e correlacionar a presença dessas células com os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes e aspectos clínicos dos dentes. Após a determinação do diagnóstico clínico das condições pulpare, 24 polpas normais e 18 polpas inflamadas foram coletadas de dentes extraídos clivados ou por extirpação em dentes que foram submetidos à endodontia. As polpas foram processadas histologicamente, sendo que uma secção tecidual de cada amostra foi corada por hematoxilina e eosina e as demais foram utilizadas para a imunohistoquímica. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz. Cinco campos com maior intensidade de marcação foram capturados, tiveram suas áreas mensuradas e o número de células contado. Em polpas normais, os linfócitos T8 apresentaram maior número de células marcadas, seguidos pelos linfócitos T4, macrófagos, linfócitos B e mastócitos. Diferenças significantes foram encontradas, com maior número de linfócitos T8 quando comparados aos linfócitos B e mastócitos (Kruskal-Wallis - $p < 0,05$). Em polpas inflamadas, os macrófagos apresentaram maior número de células positivas seguidos dos linfócitos T8, T4, B e mastócitos. Não houve diferença estatística significante entre as densidades das células estudadas em polpas inflamadas (Kruskal-Wallis - $p > 0,05$). Dessa forma, concluiu-se que os linfócitos T4, T8 e B, macrófagos e mastócitos podem ser identificados em diferentes proporções nos tecidos pulpare normais e inflamados. Entretanto, não houve correlação entre a sintomatologia apresentada pelos pacientes e o aumento do número dessas células em todos os tecidos pulpare classificados clinicamente como inflamados.

ABSTRACT

The aim of this study was to identify by immunohistochemical technique T4 lymphocytes, T8 lymphocytes, B lymphocytes, macrophages and mast cells in normal and inflamed human dental pulps and to correlate the presence of these cells to the signals and symptoms presented by the patients and the teeth clinical aspects. After the clinical diagnoses, 24 normal dental pulps and 18 inflamed dental pulps were collected from extracted teeth or by extirpation during endodontic procedures. After dental pulp histological procedures, one tissue section from each specimen was stained with hematoxylin and eosin and the other sections were used to immunohistochemical analyses. The slides were analyzed by light microscopy. Five fields with more intensive immunostaining were captured, measured and the positive cells were counted. In normal pulps, T8 lymphocytes presented more positive cells followed by T4 lymphocytes, macrophages, B lymphocytes and mast cells. Statistical significance was founded with more T8 lymphocytes than B lymphocytes and mast cells (Kruskal-Wallis – $p < 0.05$). In inflamed dental pulps, macrophages presented more positive cells, followed by T8, T4, B lymphocytes and mast cells. These data were not statistically significant (Kruskal-Wallis – $p > 0.05$). It was concluded that T4, T8 and B lymphocytes, macrophages and mast cells could be identified with different rates in normal and inflamed dental pulps. However, no correlation was detected between the patient's symptomatology and these cells increase in all inflamed dental pulps.

1 INTRODUÇÃO

A polpa dental é um tecido conjuntivo frouxo que apresenta a peculiaridade de estar envolta por tecido mineralizado (Carvalho & Figueiredo, 1999). Por esse motivo, pode apresentar algumas diferenças em relação aos outros tecidos durante a inflamação, como a dificuldade de expandir em consequência de extravasamento de fluidos após a vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular (Estrela & Figueiredo, 1999). A regulação inicial e tardia dos processos inflamatórios é realizada por células imunológicas e inflamatórias como os linfócitos T, linfócitos B e macrófagos e seus mediadores químicos (Cotran *et al.*, 2000). Dessa forma, a presença dessas células em tecidos pulpaes sadios ou inflamados é de fundamental importância para que o processo inflamatório possa ser desencadeado corretamente e a função de defesa do tecido pulpar seja realizada com eficiência.

Anos atrás, sugeria-se a ausência de resposta imune mediada por células na polpa dental humana (Eleazer *et al.*, 1975). Entretanto, com a utilização de reações específicas como as reações tipo antígeno-anticorpo, foi possível identificar a presença de linfócitos T em polpas dentais inflamadas (Pekovic & Fillery, 1984). Outros estudos que utilizaram a técnica de imunohistoquímica também demonstraram a presença de linfócitos em polpas humanas inflamadas, com a ocorrência de pequenas discrepâncias nos resultados obtidos (Hahn *et al.*, 1989; Izumi *et al.*, 1995).

Apesar desses trabalhos identificarem linfócitos T em polpas inflamadas, a presença de células imunológicas ou inflamatórias na polpa dental sadia ainda era questionada (Seltzer & Bender, 1984). Os estudos realizados em polpas normais demonstraram a presença de algumas células (Jontell *et al.*, 1987; Hahn *et al.*, 1989; Izumi *et al.*, 1995), entretanto, divergências foram encontradas principalmente quanto à presença de células como os linfócitos B e macrófagos. Jontell *et al.* (1987) não puderam identificar linfócitos B em nenhum dos espécimes analisados de polpas normais, enquanto que Hahn *et al.* (1989) identificaram uma pequena quantidade desse tipo celular. Da mesma forma, Izumi

et al. (1995) não identificaram a presença de macrófagos em polpas normais como evidenciado por Jontell *et al.* (1987).

Outra célula importante no processo inflamatório, o mastócito, secreta mediadores químicos como a histamina que participa da regulação da fase inicial da inflamação, atuando na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (Miller *et al.* 1978; Cotran *et al.*, 2000). Como a secreção de histamina pode acarretar a formação do edema e conseqüentemente aumento da pressão intrapulpar, a presença dos mastócitos na polpa dental, principalmente sadia, não é tida como certa (Dockrill, 1961; Jontell *et al.*, 1998). Diversos estudos histoquímicos foram realizados para a identificação desse tipo celular na polpa (Wislocki *et al.*, 1947; Wislocki & Sognnaes, 1950; Dockrill, 1961; Aneroth & Branstron, 1964; Eda & Langeland, 1970; Zachrisson, 1971; Zachrisson & Skogedal, 1971; Miller *et al.*, 1978), entretanto, devido à inespecificidade dessas técnicas histoquímicas, ainda perduram dúvidas em relação à sua presença em polpas dentais.

Pequenas divergências são encontradas quando a presença de células imunológicas e inflamatórias é estudada em tecidos pulpare alterados. Não obstante, um aumento nas diferenças dos achados de diversos estudos que analisaram a presença dessas células em polpas dentais normais, gera maiores dúvidas que justificam a realização de novos estudos para o conhecimento da população celular que desempenha a função de defesa pulpar, através da inflamação.

Assim como a presença de determinadas células é questionada no tecido pulpar, a relação entre as mesmas e a sintomatologia clínica apresentada pelos pacientes também pode gerar dúvidas. Apesar de alguns estudos indicarem que nem todos os dentes sintomáticos apresentam tecidos pulpares com processo inflamatório organizado (Seltzer *et al.*, 1963; Seltzer, 1972), é necessário investigar a possibilidade de um pequeno aumento de células imunológicas ou inflamatórias na polpa ser um dos fatores que causam dor clinicamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo, de origem mesenquimal, constituída de células, substância fundamental, fibras, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Como ocupa a posição central do dente, é praticamente toda envolvida pela dentina (Carvalho & Figueiredo, 1999).

Do ponto de vista anatômico a polpa pode ser dividida em coronária e radicular. A primeira ocupa a câmara pulpar no interior da dentina coronária e a última preenche os canais radiculares desde as embocaduras até a região apical radicular (Carvalho & Figueiredo, 1999; Souza, 1999; Torneck, 2001).

Histologicamente, a divisão desse tecido se dá pela observação das características morfológicas de cada região. A zona odontoblástica é composta principalmente pelos corpos celulares dos odontoblastos, já que seus processos penetram para o interior de túbulos dentinários. Essas células estão organizadas de maneira regular por toda a periferia pulpar em contato com a pré-dentina. A zona acelular, também chamada de camada subodontoblástica ou zona de Weil, localiza-se logo abaixo dos odontoblastos e na verdade, não é desprovida de células, pois contêm ramificações de processos citoplasmáticos de fibroblastos e ramificações terminais de fibras nervosas. A zona rica em células ou zona celular subjacente é composta por uma alta densidade de células que se localizam adjacentes à zona acelular e em sua face interna e é contínua com a porção central da polpa. A zona central caracteriza-se pela presença de abundante substância fundamental, fibras colágenas, fibras reticulares e células como odontoblastos, fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas e de defesa (Carvalho & Figueiredo, 1999; Souza, 1999; Torneck, 2001).

O tecido pulpar apresenta várias funções. É responsável pela nutrição das células que constituem esse tecido; indiretamente, é responsável pela formação da dentina pela ação dos odontoblastos; registra sensações dolorosas através de nervos sensitivos que acabam por culminar em uma função de proteção do tecido; e ainda, é responsável pelo processo de defesa com a

presença de células que impedem ou retardam a destruição pulpar (Carvalho & Figueiredo, 1999; Torneck, 2001).

A resposta protetora dos tecidos, de uma maneira geral, é caracterizada pelo processo inflamatório que tem como objetivo livrar o organismo da causa inicial e das conseqüências de uma lesão celular. Essa resposta ocorre em tecidos conjuntivos vascularizados, envolvendo mediadores químicos e células imunológicas e inflamatórias como neutrófilos, macrófagos, linfócitos, basófilos, eosinófilos, mastócitos e plasmócitos (Cotran *et al.*, 2000).

Por estar envolvida entre paredes rígidas, a polpa dental é considerada um órgão especial (Smulson, 1984) e apresenta alterações em seus processos fisiológicos e patológicos. Sua função de defesa representada pela inflamação, possui características diferentes dos outros processos inflamatórios, principalmente quando se considera sua capacidade de expansão em conseqüência da vasodilatação ou aumento de permeabilidade vascular (Estrela & Figueiredo, 1999).

A polpa dental humana parece ter uma resposta defensiva ampla por células inflamatórias envolvendo células imunológicas assim como em outros tecidos (Izumi *et al.*, 1995). Entretanto, a localização do tecido pulpar e o fato do forame apical representar o único meio de entrada para vasos sangüíneos, proporciona uma falta de suprimento sanguíneo adequado durante injúrias severas. Da mesma forma, a menor atividade metabólica desse tecido em relação aos outros, faz com que o reparo seguido de fibrose não possa ocorrer facilmente (Trowbridge & Kim, 2000).

Dessa forma, a presença de determinados tipos celulares e suas principais funções tem um papel importante para que o processo inflamatório pulpar exerça sua função sem lesar ao extremo o tecido.

Como as principais células efetoras da resposta imune são os linfócitos T e B e essas células dependem diretamente da atuação do macrófago para o processo de apresentação de antígenos (Calich & Vaz 1989), a presença ou ausência de algum desses tipos celulares pode ser crucial para o desenrolar da

resposta inflamatória pulpar, seguida ou não de reparo. Os mastócitos também secretam importantes mediadores químicos que participam da regulação da fase inicial do processo inflamatório (Cotran *et al.*, 2000) e sua presença nos tecidos pulpares também pode desempenhar papel fundamental no desenvolvimento da doença pulpar.

2.1 Linfócitos T

Os linfócitos T recebem essa denominação por sofrerem processo de maturação no Timo. Seus precursores originam-se na medula óssea, são transportados pelo sangue, proliferam e então, sofrem processo de maturação no Timo. Após a maturação, essas células são novamente transportadas pelo sangue para ocupar áreas definidas em outros órgãos linfáticos. Os linfócitos T representam aproximadamente 65 a 75% dos linfócitos do sangue (Junqueira & Carneiro, 2004). Com o advento de novas metodologias, descobriu-se que os linfócitos T não são uma única célula, mas sim uma família de células com morfologias semelhantes, porém, com funções diferentes e bem definidas. Atualmente, os linfócitos podem ser divididos em linfócitos T auxiliares, que apresentam uma proteína de superfície chamada CD4; linfócitos T citotóxicos e T supressores, que apresentam uma proteína de superfície chamada CD8. Essas proteínas são usadas para a identificação dessas sub-populações de linfócitos através de técnica imunohistoquímica, que utiliza anticorpos específicos para seu reconhecimento (Abbas *et al.*, 2002).

As principais funções dos linfócitos T auxiliares, também conhecidas como linfócitos CD4 ou linfócitos T4, são o estímulo para o crescimento e diferenciação das células B e a ativação de macrófagos através da secreção de citocinas; proteínas produzidas por muitos tipos celulares principalmente linfócitos e macrófagos ativados (Cotran *et al.*, 2000; Junqueira & Carneiro, 2004). Os linfócitos T citotóxicos e T supressores são chamados de CD8 ou linfócitos T8. Os T supressores têm a função de inibir a resposta humoral e celular e apressar o término da resposta imune (Junqueira & Carneiro, 2004). Já os T citotóxicos,

atuam na lise de células estranhas e nas infectadas por vírus, células tumorais e de aloenxertos (Abbas *et al.*, 2002).

Os linfócitos T não reconhecem antígenos nativos (não processados) e, para sua ativação, necessitam do processamento de antígenos, pois só reconhecem antígenos associados a moléculas (MHC-II) expressas pelas células apresentadoras de antígenos. De outra forma, os linfócitos B são capazes de reconhecer diretamente moléculas antigênicas (proteínas, pequenos peptídeos, lipídios, polissacarídeos e moléculas menores), sem necessidade de processamento prévio (Junqueira & Carneiro, 2004).

2.2 Linfócitos B

Os linfócitos B foram assim chamados pelo fato de amadurecem na bolsa de Fabricius das aves. Nos mamíferos, como não existe um órgão semelhante ao encontrado nas aves, essas células originam-se e sofrem processo inicial de maturação na medula óssea. Por isso, o “B” de sua denominação refere-se da sua derivação da bolsa ou da medula óssea, que em inglês diz-se “bone marrow”. Após originarem-se na medula óssea, esses linfócitos penetram nos capilares sangüíneos, são transportados pelo sangue para instalarem-se em órgãos linfáticos secundários, com exceção do Timo (Junqueira & Carneiro, 2004). Constituem em torno de 5 a 10% dos linfócitos presentes no sangue e depois de estimulados pela ação de determinados mediadores químicos liberados principalmente por linfócitos T4, sofrem uma modificação morfológica onde o núcleo celular desloca-se para a periferia da célula, diferenciando-se em plasmócitos. Os plasmócitos têm uma função específica de produzir anticorpos. Os anticorpos são proteínas que se ligam de forma específica a um único antígeno. Cada plasmócito tem a capacidade de produzir apenas um único tipo de anticorpo para apenas um determinado antígeno (Abbas *et al.*, 2002). O anticorpo age ligando-se a sítios específicos (epítomos) nas células estranhas e liberando sinais químicos que indicam a presença de um invasor às outras células imunológicas. Certos anticorpos podem atuar na agregação de células para

facilitar a fagocitose e precipitar moléculas agressivas estranhas, tornando-as inócuas. Alguns linfócitos B não se diferenciam em plasmócitos, constituindo os linfócitos B de memória que podem reagir de maneira rápida a uma segunda exposição ao mesmo antígeno (Junqueira & Carneiro, 2004).

Os linfócitos B e T não podem ser diferenciados morfológicamente ao microscópio de luz e nem ao microscópio eletrônico. Dessa forma, a diferenciação dessas células e de seus subtipos pode ser realizada através proteínas específicas de membrana que podem ser reconhecidas por técnicas imunohistoquímicas (Junqueira & Carneiro, 2004).

2.3 Macrófagos

Os macrófagos são derivados de células produzidas na medula óssea que alcançam a corrente sanguínea ainda na forma imatura, fase em que são chamados de monócitos. Após saírem dos vasos para o tecido conjuntivo, sofrem um processo de amadurecimento e adquirem características morfológicas de macrófagos. Essas células podem proliferar localmente nos tecidos e dar origem a novas células. Os macrófagos localizam-se no tecido conjuntivo de todos os órgãos, onde podem receber nomes específicos como células de Kupffer no fígado, células Gliais no sistema nervoso central, células de Langerhans na pele e osteoclastos no tecido ósseo. Essas células desempenham várias funções como a de participar do sistema de defesa através da fagocitose, promover a apresentação de antígenos para os linfócitos T e produzir citocinas que recrutem e ativem outras células inflamatórias. Depois de estimulados por infecções, por exemplo, essas células sofrem alterações morfológicas e metabólicas que lhes conferem maior capacidade para fagocitose e digestão de partículas estranhas. Nesse estágio de diferenciação são chamados de macrófagos ativados (Abbas *et al.*, 2002; Junqueira & Carneiro, 2004).

2.4 Mastócitos

Os mastócitos são derivados de células precursoras hematopoiéticas presentes na medula óssea, que geralmente sofrem seu processo de maturação nos tecidos. Embora sejam semelhantes aos basófilos em muitos aspectos, originam-se de células-tronco diferentes. Os mastócitos apresentam importante função nas reações inflamatórias agudas e persistentes (Cotran *et al.*, 2000), na hipersensibilidade imediata e nas doenças alérgicas (Abbas *et al.*, 2002). Quando estimuladas, secretam mediadores químicos (Miller *et al.*, 1978) e atuam nas reações inflamatórias agudas e em processos de reparação de feridas (Bonelli *et al.*, 2003).

Apesar de apresentarem características morfológicas semelhantes, duas populações de mastócitos podem ser distinguidas com base em sua distribuição tecidual, propriedades tintoriais e conteúdo das proteases. Os mastócitos do tecido conjuntivo (CTMC) são encontrados ao redor de vasos sanguíneos na maioria dos tecidos. Os mastócitos das mucosas (MMC) apresentam maior concentração em humanos na mucosa do intestino médio e nos pulmões. Ambas as populações de mastócitos possuem histamina e serotonina em seus grânulos, entretanto maior quantidade de histamina tem sido atribuída aos mastócitos do tecido conjuntivo (CTMC) (Roitt *et al.*, 1999; Junqueira & Carneiro, 2004). Outra característica dessas populações é que os mastócitos das mucosas são reativos para anticorpos contra a triptase e não para quimase (MC_T). Já os mastócitos do tecido conjuntivo expressam positividade para triptase e também para quimase (MC_{TC}) (Walsh, 2003).

A histamina, seu principal mediador químico, tem seu efeito prioritário desencadeado no estágio inicial do processo inflamatório, estimulando as células endoteliais a se modificarem promovendo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular que poderá acarretar a formação do edema inflamatório (Miller *et al.* 1978; Cotran *et al.*, 2000).

2.5 Presença de células imunológicas e inflamatórias na polpa dental

Até que se pudesse realizar uma identificação celular confiável, a presença de células imunológicas ou inflamatórias na polpa dental sadia era questionada (Seltzer & Bender, 1984).

A utilização de anticorpos monoclonais em reações tipo antígeno-anticorpo confere às identificações dos tipos celulares presentes na polpa grande especificidade, independentemente da técnica utilizada. A identificação dos linfócitos T através da técnica indireta de imunofluorescência em polpas com cárie avançada foi descrita pela primeira vez por Pekovic e Fillery (1984); contradizendo assim a sugestão de ausência de resposta imune mediada por células na polpa dental humana (Eleazer *et al.*, 1975). A utilização de anticorpos monoclonais em conjunto com a imunohistoquímica também é uma boa ferramenta para a identificação e quantificação de células imunológicas e inflamatórias nos tecidos (Jontell *et al.*, 1987) e pode auxiliar na descrição dos tipos celulares presentes na polpa dental sadia e inflamada.

Nos tecidos pulpares humanos em condições normais os linfócitos T, B e macrófagos podem ser identificados e quantificados por imunohistoquímica. Jontell *et al.* (1987) realizaram um estudo onde utilizaram polpas de dentes que não apresentavam restaurações, cáries ou envolvimento periodontal para a identificação de células imunocompetentes. A técnica imunohistoquímica e a microscopia eletrônica foram utilizadas para descreverem a presença de linfócitos T e subtipos (T4 e T8), macrófagos e algumas células com aparência de células dendríticas em todos os espécimes avaliados. Apesar de utilizarem anticorpos específicos para a identificação de linfócitos B, não ocorreu marcação desse grupo celular em nenhum dos espécimes analisados. Entre os linfócitos T, os citotóxicos/supressores foram as células que apresentaram maior número de células marcadas. Apesar dos linfócitos T auxiliares serem encontrados em menor número quando comparados aos linfócitos T8, mostraram marcação pouco maior que os macrófagos.

A não identificação de linfócitos B em polpas normais contradiz os achados de Hahn *et al.* (1989) que identificaram não apenas esse grupo celular como outras células imunocompetentes em tecidos pulparem com diagnóstico de polpa normal, pulpíte reversível e pulpíte irreversível. Os linfócitos T4, T8 e B puderam ser identificados, mesmo que em pequena quantidade, em polpas com características de normalidade. De maneira semelhante ao estudo de Jontell *et al.* (1987), dentre os tipos celulares identificados, a grande maioria das células pertenciam à linhagem de linfócitos T. Novamente os linfócitos T8 apresentaram marcação de maior número de células quando comparados aos linfócitos T4.

Izumi *et al.* (1995) também puderam identificar a presença de linfócitos T e B em polpas de dentes intactos ou que apresentavam níveis superficiais de cárie. Os linfócitos T8 apresentaram-se em maior número quando comparados aos linfócitos T4, que se apresentaram em maior quantidade em relação aos linfócitos B.

A presença de linfócitos T espalhados por toda a polpa de dentes intactos também foi demonstrada por Sakurai *et al.* (1999). Menor número de linfócitos T de memória foi encontrado na população celular das polpas dentais saudáveis. Apesar de serem encontrados ocasionalmente, os linfócitos B puderam ser identificados, assim como demonstrado por Hahn *et al.* (1989).

A identificação de macrófagos em polpas dentais que não apresentavam cáries ou que apresentavam níveis superficiais de cárie; ou seja, polpas com ausência ou discreta presença inflamatória não pôde ser demonstrada por Izumi *et al.* (1995). Esses resultados são contrários aos observados por Jontell *et al.* (1987), que descrevem a presença de macrófagos em polpas normais. Segundo Izumi *et al.* (1995), essa divergência de resultados pode ser conseqüência de diferentes anticorpos primários utilizados para detectar esse grupo celular. A presença de macrófagos também foi demonstrada em polpas dentais humanas saudáveis de dentes permanentes (Nakanishi *et al.*, 2001; 2005) e de dentes decíduos (Angelova *et al.*, 2004).

Polpas de dentes intactos também apresentam população com padrão de células dendríticas predominantemente distribuídas em área perivascular e região para-odontoblástica; algumas dessas células localizadas na periferia da polpa e dentina na polpa coronária apresentaram freqüentemente processos citoplasmáticos dentro dos túbulos dentinários (Sakurai *et al.*, 1999). Essa população celular foi identificada através de alguns marcadores eficazes em identificar células que possuem a função de apresentação de antígenos (anti-HLA-DR; anti-CD14; anti-fator XIIIa). O marcador CD14 é reativo para macrófagos, células dendríticas e granulócitos ativados. Muitas das células similares a macrófagos pareceram dominantes entre as células dendríticas pulpares, pois expressaram a marcação pelo CD14. De maneira semelhante ocorreu no estudo de Okiji *et al.* (1997), onde procurando analisar a presença de células dendríticas na polpa dental de ratos, encontraram que aproximadamente 87% das células que se expressavam HLA-DR positiva e fator XIIIa positivo, também expressaram marcação para CD68, que também é reativo para macrófagos. Dessa forma, uma grande parte das células identificadas como células dendríticas possui características fenotípicas de macrófagos, o que pode ocasionar dificuldades na análise da presença desse tipo celular no tecido pulpar.

A diferenciação entre células dendríticas e macrófagos pode ser realizada com a observação da localização apresentada por essas células no tecido pulpar e de suas capacidades de realizar fagocitose. Sabe-se que as células que exibem características de células dendríticas tendem a localizar-se na periferia do tecido pulpar (Jontell *et al.*, 1988; Sakurai *et al.*, 1999) enquanto que as células que expressam características de macrófagos se localizam principalmente na porção central do tecido conjuntivo (Jontell *et al.*, 1988). Quanto à capacidade de fagocitose, as células dendríticas apresentam pequena atividade de fagocitose para uma variedade de substâncias (Steinman & Nussenzweig, 1980), enquanto que os macrófagos têm capacidade de fagocitar pronunciada (Jontell *et al.*, 1988; Jontell & Bergenholtz, 1992).

Durante um processo inflamatório, nota-se um aumento no número de linfócitos T4, T8 e B em polpas com diagnóstico de pulpíte irreversível, quando comparadas com polpas normais ou com polpas com diagnóstico de pulpíte reversível (Hahn *et al.*, 1989). Esses dados concordam com os achados de Mendoza *et al.* (1987), onde através de um estudo em microscopia eletrônica das mudanças ultra-estruturais que ocorrem no terço apical de dentes com pulpites irreversíveis, foram capazes de demonstrar que os macrófagos e linfócitos são as células predominantes no infiltrado inflamatório.

Em polpas normais, a população de linfócitos T8 é demonstrada em maior quantidade do que a população de linfócitos T4 (Jontell *et al.*, 1987; Hahn *et al.*, 1989; Izumi *et al.*, 1995). As polpas com diagnóstico de pulpíte irreversível estudadas por Hahn *et al.* (1989) demonstraram aumento proporcional dessas células, ou seja, os linfócitos T8 caracterizaram as células mais incidentes no processo inflamatório quando comparados aos linfócitos T4 e linfócitos B. O aumento da sintomatologia pulpar demonstrou também um aumento nos níveis de linfócitos B, chegando a ultrapassar o número de linfócitos T4 presentes nas polpas inflamadas.

Essa distribuição dos linfócitos T não é encontrada em dentes decíduos. A população de linfócitos T4 já é maior em relação à de T8 mesmo em polpas de dentes intactos. Durante a evolução no processo de reabsorção desses dentes há um aumento na densidade de macrófagos, linfócitos T e B nos tecidos pulpares e a proporção entre a quantidade dessas células é mantida, com maior número de macrófagos seguidos pelos linfócitos T4, linfócitos T8 e linfócitos B (Angelova *et al.* 2004).

Ao analisar o estágio de inflamação pulpar em relação à profundidade de lesões cariosas, Izumi *et al.* (1995) também constataram um aumento no número de linfócitos T e B e de macrófagos com o aumento da profundidade da lesão. Os linfócitos T8 demonstraram aumento maior quando comparados aos linfócitos T4, que também se apresentaram em maior quantidade que os linfócitos B. De acordo com progressão das lesões de cárie, os macrófagos foram

identificados e mostraram aumento que geralmente não ultrapassava os níveis de linfócitos B encontrados. Dessa forma, esses autores relatam que a extensão da reação imune da polpa frente ao estímulo de cárie deve ser dividida em duas partes: fase inicial (quando a lesão de cárie atingiu até metade da espessura de dentina que separa o esmalte da polpa) - há um aumento no número de células T e a ocorrência de resposta imune celular; fase avançada (quando a lesão de cárie pode chegar a atingir a polpa) - há um aumento no número de células T4 seguido pelo aumento de células B e plasmócitos, fato que sugere um aumento na resposta humoral no tecido pulpar.

Embasados nos achados de um aumento da população de linfócitos em polpas de dentes cariados, sendo a maioria células T de memória; Sakurai *et al.* (1999) justificam o conceito também relatado por Izumi *et al.* (1995) que a imunidade mediada por linfócitos T perfaz o principal papel nas fases iniciais da defesa imune em polpas de dentes cariados.

Os mastócitos são tidos como amplamente distribuídos pelo tecido conjuntivo, incluindo os tecidos moles da cavidade oral (Miller *et al.* 1978; Cobb *et al.*, 1976; Cotran *et al.*, 2000). Entretanto, sua presença em polpas dentais é bastante discutida na literatura. A maioria dos trabalhos que buscou identificar essas células na polpa dental utilizou corantes como o azul de toluidina (Dockrill, 1961; Zachrisson, 1971; Zachrisson & Skogedal, 1971; Miller *et al.*, 1978; Farnoush, 1984), que demonstram a metacromasia de grânulos citoplasmáticos específicos presentes nos mastócitos e que são classicamente utilizados para ressaltar a presença dessas células em cortes teciduais (Cobb *et al.*, 1976; Walsh, 2003).

Miller *et al.* (1978) ressaltam que como os mastócitos estão presentes no tecido conjuntivo dos tecidos moles da cavidade oral, parece ser enigmático que, naquela época, poucos estudos demonstrassem a presença dessas células na polpa dental. Wislocki *et al.* (1947), após pesquisarem a presença dessas células em diversos animais, inclusive no homem, descreveram a identificação de

uma célula semelhante ao mastócito em apenas um espécime de polpa dental de macaco.

De maneira semelhante, Dockrill (1961) descreveram a presença de mastócitos em abundância em tecidos normais do lábio e da mucosa oral, mas não encontraram essas células no disco articular, nem em tecidos pulparem normais ou em condições patológicas. Entretanto, puderam verificar mastócitos em pólipos pulpares e ressaltam que essas células puderam ser identificadas em polpas dentais que não estavam circundadas por tecido duro e que teriam a oportunidade de edemaciar.

Os mastócitos são tidos como células normais de tecidos gengivais humanos saudáveis (Carranza & Cabrini, 1955; Helton & Hall, 1968), porém foram tidos como ausentes em todos os tecidos pulpares analisados em outros estudos (Wislocki & Sognnaes, 1950; Eda & Langeland, 1970). De outra forma, Aneroth & Branstron (1964) relatam a presença de células com grânulos metacromáticos, sugerindo serem mastócitos, em todos os espécimes de gengiva e apenas um de polpa dental humana.

Segundo outros trabalhos realizados com colorações histoquímicas, os mastócitos puderam ser identificados em alguns espécimes de polpas dentais que apresentavam intensos infiltrados inflamatórios, mas não foram detectados em nenhuma das amostras de polpa dental humana sadia de dentes decíduos e permanentes (Zachrisson, 1971; Zachrisson & Skogedal, 1971; Miller *et al.* 1978). A dificuldade na observação dessas células pode estar associada à sua fragilidade, a dificuldades na fixação e nos procedimentos de coloração e à sua similaridade com macrófagos; reduzindo as chances de realizar uma adequada identificação morfológica em polpas dentais (Miller *et al.* 1978; Farnoush, 1984), principalmente através da utilização de métodos de coloração histológica, que são menos sensíveis.

A presença dos mastócitos na polpa dental é de difícil detecção, pois a injúria tecidual e a liberação de neuropeptídeos durante os procedimentos de obtenção das amostras causam a degranulação dessas células, o que traz

dificuldades para sua identificação através das colorações histoquímicas tradicionais (Farnoush, 1984; Walsh, 2003). Diferentemente das colorações tradicionais, a utilização de técnicas como a imunohistoquímica e a microscopia eletrônica são eficientes em demonstrar mastócitos degranulados (Kaminer *et al.*, 1991), o que confere maior credibilidade a essas técnicas para a identificação dessa célula.

Devido às dificuldades na identificação dos mastócitos por técnicas histoquímicas e a variabilidade dos resultados obtidos por vários estudos, ainda persiste a dúvida quanto à presença desse tipo celular principalmente na polpa dental sadia (Jontell *et al.*, 1998). Esse fato pode causar divergências na descrição de resultados de trabalhos realizados como o de Ohkubo *et al.* (1993). Esses autores concluem seu trabalho sugerindo que a substância P age no sistema vascular do lábio de ratos através de liberação de histamina pelos mastócitos, entretanto, afirmam que como na polpa dental não existem mastócitos, esse neuromediador (substância P) pode causar resposta vascular diretamente.

Os dados encontrados na literatura sugerem que apesar da concordância de resultados em relação à presença de células imunológicas na polpa e quanto ao seu aumento em tecidos inflamados, com exceção dos mastócitos, existem diferenças entre metodologias e nos resultados apresentados que ainda perduram e justificam a realização de novos estudos para que os mecanismos de defesa que se desenvolvem nos tecidos pulpares possam ser melhor esclarecidos.

2.6 Sintomatologia clínica e inflamação pulpar

O diagnóstico clínico das condições pulpares foi realizado, durante anos, buscando relacionar os sinais e sintomas apresentados com os aspectos histológicos da evolução dos processos inflamatórios da polpa (Thoma, 1929; Stephan, 1937; Herbert, 1945; Vargas & Viovaldi, 1959). Os clínicos tinham dificuldade em realizar um correto diagnóstico, pois necessitavam caracterizar o estado histológico da polpa baseados em dados clínicos. A dificuldade encontrada

para o correto diagnóstico foi explicada por diversos estudos (Seltzer *et al.*, 1963; Seltzer, 1972; Morse *et al.*, 1977, Mendoza *et al.*, 1987) que puderam evidenciar a falta de correlação entre os aspectos histológicos e clínicos apresentados pela polpa dental. Dessa forma, alguns autores propuseram outros tipos de classificação dos estados clínicos da polpa, buscando embasar seu diagnóstico em dados e testes clínicos e evidenciar a necessidade ou não de intervenção na polpa dental (Seltzer *et al.*, 1965; Seltzer 1971; Smulson, 1984).

A execução de testes clínicos e a observação da sintomatologia têm sido utilizadas até os dias de hoje como referencial para a realização do diagnóstico da condição pulpar (Figueiredo *et al.*, 1999; Cohen, 2000; Costa-Filho, 2004). Segundo Seltzer (1972), o diagnóstico da extensão da inflamação pulpar é mais difícil que a detecção da necrose pulpar e é necessário evidenciar se os aspectos observados pelos testes e sintomatologia indicam a reversibilidade ou irreversibilidade do processo inflamatório pulpar.

Apesar dos dados clínicos serem capazes de indicar a evolução da inflamação pulpar e conseqüentemente a necessidade de tratamento, a presença de dor severa, muitas vezes, encoraja o cirurgião dentista a remover o tecido pulpar antes que possa organizar uma resposta frente ao agente agressor e, talvez, reparar a área lesionada (Izumi *et al.*, 1995). Essa afirmação poderia ser confirmada pelos achados de Seltzer *et al.* (1963) que nem sempre puderam relacionar a presença de dor com a instalação de infiltrado inflamatório organizado na polpa dental.

Sabe-se que a polpa dental apresenta algumas células imunológicas e inflamatórias mesmo quando em estágio de normalidade (Jontell *et al.*, 1987; Hahn *et al.*, 1989, Izumi *et al.*, 1995). A atuação dessas células já presentes na polpa ou um pequeno aumento populacional para a regulação ou exacerbação de um processo inflamatório pulpar através dos mediadores químicos, poderia ser um dos fatores a determinar a presença de dor em polpas que não apresentam infiltrados inflamatórios característicos, e por esse motivo, merecem ser investigados.

3 PROPOSIÇÃO

Esse trabalho tem por objetivos identificar por técnica de imunohistoquímica, células presentes na resposta imunológica e inflamatória do tecido pulpar normal e inflamado de dentes humanos e correlacionar a presença dessas células com os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes e aspectos clínicos dos dentes. As células a serem identificadas são: linfócitos T-auxiliares (CD4), linfócitos T-citotóxicos/supressores (CD8), linfócitos B, macrófagos e mastócitos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras:

Para a realização desse estudo foram coletadas polpas dentais de dentes humanos com extração indicada por motivo ortodôntico, razão protética, doença periodontal ou ausência de função. A coleta de tecidos pulparez também foi realizada por extirpação em dentes submetidos ao tratamento endodôntico.

Previamente à coleta das amostras, o projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em humanos da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (protocolo n° 025/2003 - anexo 1). Um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 2) foi dado aos pacientes para orientá-los quanto ao motivo da realização do trabalho e após seus consentimentos, as amostras foram coletadas.

O diagnóstico clínico das condições pulparez foi definido através da análise dos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes e dos aspectos clínicos e radiográficos dos dentes. Clinicamente, foram efetuados testes térmicos de sensibilidade pulpar em dentes com isolamento relativo (roletes de algodão), utilizando-se de líquido congelante (Endo-Frost¹) em pequenos chumaços de algodão e aplicados próximo a região cervical do dente até que o paciente relatasse sintomatologia. As respostas frente a esses testes, a sintomatologia observada e as informações obtidas da anamnese foram armazenadas em ficha clínica específica para cada paciente (anexo 3).

O diagnóstico pulpar foi definido em polpa normal ou inflamada de acordo com as características clínicas encontradas como: presença de dor espontânea; presença de cáries extensas, exposição da polpa dental; resposta normal ou exacerbada frente ao teste térmico ao frio. Dessa forma, as amostras foram separadas em dois grupos distintos: 24 polpas normais e 18 polpas inflamadas. As amostras foram classificadas como inflamadas quando apresentaram episódios de sintomatologia dolorosa espontânea, resposta

¹ Roeko – Coltène whaledent – Langenau, Baden-Württemberg, Germany

exacerbada durante aplicação do teste térmico e/ou exposição pulpar por cárie. As polpas classificadas como normais não apresentaram qualquer tipo de sintomatologia e demonstraram resposta normal ao teste térmico de sensibilidade pulpar.

As 24 polpas normais foram obtidas de 15 pacientes que apresentavam idade entre 16 e 49 anos. Já as 18 polpas inflamadas foram obtidas de 17 pacientes com idade entre 10 e 60 anos.

As amostras classificadas clinicamente em polpas normais foram obtidas de 21 dentes com a coroa íntegra. Outros dois dentes apresentavam restaurações satisfatórias e um apresentava lesão de cárie incipiente. Em relação ao motivo que possibilitou a exodontia do dente, 11 dentes apresentavam doença periodontal avançada sem envolvimento do ápice dental, 8 eram dentes que não apresentavam função (terceiros molares ou dentes sem antagonistas), dois dentes foram extraídos por finalidade ortodôntica e dois por finalidade protética. Um tecido pulpar foi extirpado de um dente indicado para tratamento endodôntico por finalidade protética (Tabela 3 – anexo 4).

Já as amostras classificadas clinicamente como inflamadas foram obtidas de 11 dentes que apresentavam cáries e 7 restaurações extensas. As 8 polpas removidas de dentes extraídos ou mesmo as que foram extirpadas estavam sempre relacionadas com presença de sintomatologia dolorosa ou exposição pulpar por cárie. A resposta frente aos testes de sensibilidade pulpar ao frio foi exacerbada em todos os casos. Apenas um dente extraído possuía doença periodontal (Tabela 4 – anexo 4).

Foram excluídos os dentes decíduos, os dentes que apresentaram diagnósticos de necrose pulpar, os que possuíam reabsorção radicular, os que apresentaram fraturas durante a exodontia, os que apresentavam perda óssea que envolvia o ápice radicular e os que apresentaram extrema dificuldade para a remoção de suas polpas na fase laboratorial ou clínica.

Após a exodontia e limpeza rápida, os dentes foram imersos em soro fisiológico à temperatura aproximada de 4°C (geladeira) e transportados

rapidamente para o laboratório de endodontia para remoção imediata dos tecidos pulpare.

4.2 Remoção das polpas

Em dentes extraídos unirradiculares, o tecido pulpar foi removido com auxílio de disco diamantado de dupla face. Foram confeccionados sulcos longitudinais nas faces vestibular e lingual dos dentes, tomando-se o cuidado para que o disco não atingisse o tecido pulpar (Figuras 1 A e B). Após a realização dos sulcos longitudinais, a ponta ativa de um cinzel reto foi posicionada no centro do sulco e com leve pressão os dentes foram clivados (Figuras 1 C e D). As polpas foram então cuidadosamente removidas com auxílio de pinças ou curetas clínicas, preservando-se ao máximo a integridade do tecido (Figura 1 E). Em dentes multirradiculares, fez-se primeiramente a remoção da porção da coroa dental localizada acima da câmara pulpar e, em seguida, a fragmentação das raízes separadamente. Nesses dentes foi coletado principalmente o tecido pulpar coronário em conjunto com o tecido do canal mais amplo.

Em dentes que foram submetidos à endodontia, a extirpação das polpas foi realizada após a remoção de todo tecido cariado presente no elemento dental, isolamento absoluto do campo operatório e abertura coronária com remoção cuidadosa do teto da câmara pulpar para não danificar o tecido (Figura 2 A). Seguiu-se com a colocação de um instrumento tipo Kerr n° 25 no interior do canal radicular até que se ajustasse levemente às paredes do canal (Figura 2 B), em aproximadamente 2/3 do comprimento radiográfico do dente. Fizeram-se duas ou três rotações completas desse instrumento no sentido horário e tração para a remoção do tecido pulpar (Figura 2 C). As polpas coletadas por extirpação apresentavam ao menos a polpa coronária e o terço cervical do tecido pulpar intactos. Não foram utilizadas se houvesse perda de grande parte do tecido. Essas polpas foram apenas lavadas em solução salina fisiológica 0.9% e seguiu-se com o processo de fixação.

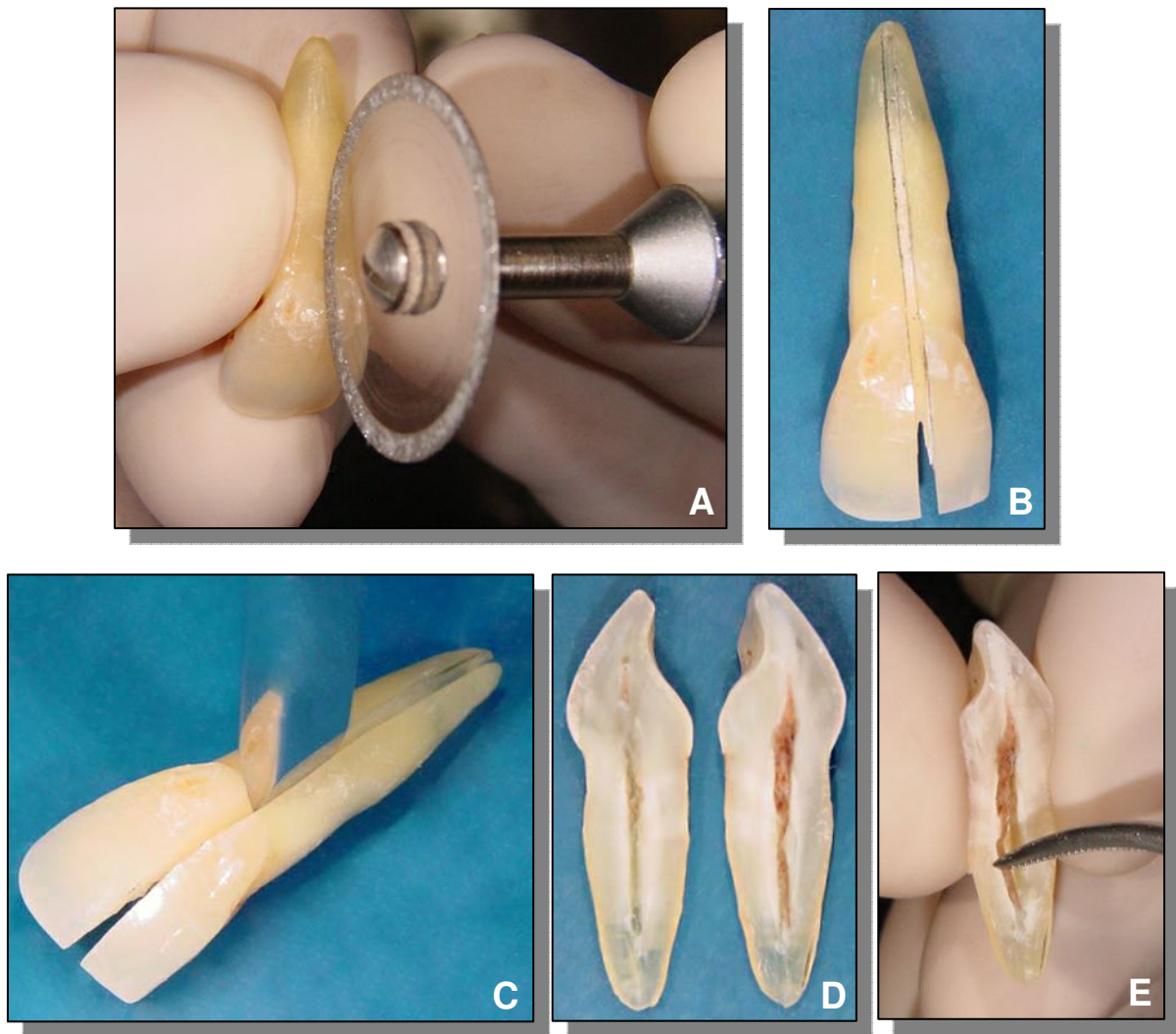


Figura 1 – **(A)** confecção de sulco longitudinal na estrutura dental com disco diamantado; **(B)** sulco longitudinal; **(C)** clivagem do dente com cinzel reto posicionado no sulco longitudinal; **(D)** partes dentais após a clivagem; **(E)** remoção do tecido pulpar através de pinça ou cureta clínica.

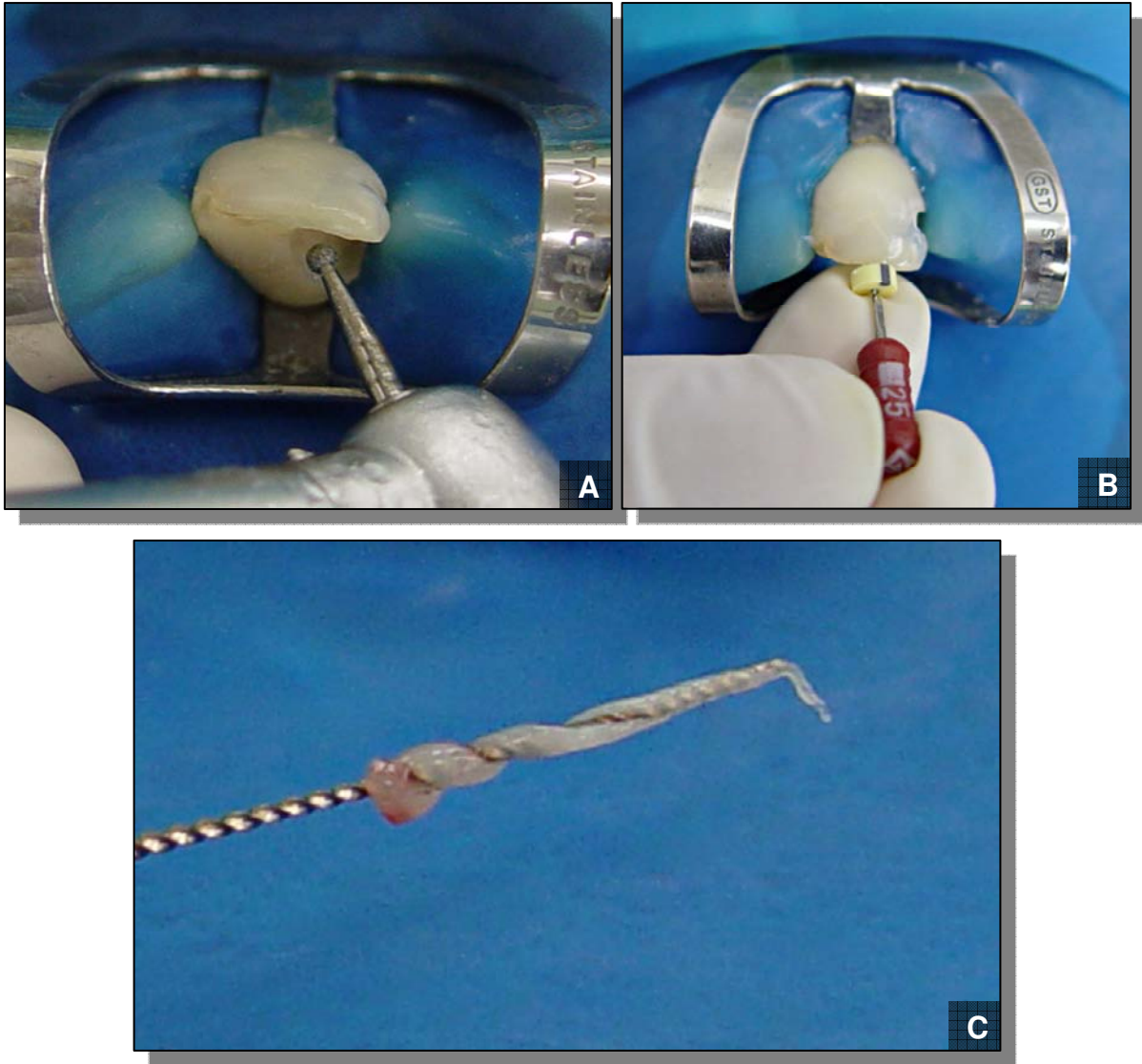


Figura 2 – **(A)** remoção de tecido cariado, isolamento absoluto e abertura coronária cuidadosa para não danificar o tecido pulpar; **(B)** introdução de instrumento tipo Kerr n° 25 no interior do canal radicular até a obtenção de leve ajustamento; **(C)** tecido pulpar removido após rotações no sentido horário e tração do instrumento inserido no canal radicular.

4.3 Imunohistoquímica

Após a remoção, as polpas foram imersas isoladamente e devidamente identificadas em solução de formol 10% tamponado, durante o período de 18 horas para a fixação dos tecidos. Os espécimes foram lavados em água corrente e desidratados em banhos de álcool 70%, 90% e dois banhos em álcool absoluto à temperatura ambiente, seguido de diafanização em xilol e inclusão em parafina.

Secções de 3 micrometros de espessura foram obtidas e estendidas em lâminas de vidro para histologia, preparadas com adesivo organo-silano (3-aminopropyl-triethoxysilane² - anexo 7 – quadro 1). Um corte de cada amostra foi corado por Hematoxilina e Eosina (HE) para análise histológica em microscopia de luz.

Para a análise imunohistoquímica foi empregado o método da estreptavidina-biotina conforme os passos abaixo descritos:

1. desparafinização dos cortes em dois banhos de xilol de 10 minutos cada à temperatura ambiente;
2. hidratação em cadeia descendente de etanol, a partir de etanol absoluto, seguido por etanol 90%, 70%, 50%, lavagem em água corrente e destilada;
3. recuperação antigênica específica para cada anticorpo:
 - anticorpos anti-linfócitos T4 e B, macrófagos e mastócitos - solução de ácido cítrico 10 mM (pH 6 – anexo 7 – quadro 2) por 20 minutos em Banho Maria à temperatura de 95 a 99°C. Resfriamento em meio ambiente por 20 minutos na mesma solução e lavagem em água corrente e destilada;
 - anticorpo anti-linfócitos T8 - solução de EDTA³ + Trizma Base⁴ (pH 9,9 – anexo 7 – quadro 2) por 30 minutos em Banho Maria à temperatura de 95 a 99°C. Resfriamento por 20 minutos na mesma solução e lavagem em água corrente e destilada;

² Sigma Aldrich – St Louis, MO, USA

³ Nuclear – São Paulo, SP, Brasil

⁴ Sigma Aldrich – St Louis, MO, USA

4. bloqueio da peroxidase endógena tecidual, através de 5 trocas de 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 15% (50 volumes)⁵;
5. lavagem em água corrente, água destilada e tampão PBS (phosphate-buffered saline – anexo 7 – quadro 3);
6. incubação dos anticorpos primários monoclonais diluídos em solução de albumina sérica bovina (BSA)⁶ 1% em PBS, específicos para as células a serem identificadas (tabela 01), durante o período de 18 horas (“over night”) sobre esponja umedecida em recipiente adequado e em temperatura de 4°C (geladeira);
7. três lavagens em tampão PBS;
8. incubação com anticorpo secundário biotilado (Link – Kit LSAB⁷) sobre esponja umedecida em recipiente adequado e temperatura ambiente:
 - anticorpos anti-linfócitos T4 e B, macrófagos e mastócitos – 10 minutos;
 - anticorpo anti-linfócitos T8 - 30 minutos;
9. três lavagens em tampão PBS;
10. incubação com complexo Estreptavidina-biotina-peroxidase (Strept - Kit LSAB⁸), sobre esponja umedecida em recipiente adequado e temperatura ambiente:
 - anticorpos anti-linfócitos T4 e B, macrófagos e mastócitos – 10 minutos;
 - anticorpo anti-linfócitos T8 - 30 minutos;
11. três lavagens em tampão PBS;
12. revelação do substrato cromogênico (60 mg de diaminobenzidina (DAB)⁹ em 100 ml de PBS + 1 ml de água oxigenada¹⁰ 6% + 1 ml de dimetilsulfóxido - DMSO¹¹): 5 minutos em temperatura ambiente;
13. lavagem em água corrente e destilada;

⁵ Dinâmica – São Paulo, SP, Brasil

⁶ Sigma Aldrich – St Louis, MO, USA

⁷ DakoCytomation – Glostrup, Copenhagen, Denmark

⁸ DakoCytomation – Glostrup, Copenhagen, Denmark

⁹ Sigma Aldrich – St Louis, MO, USA

¹⁰ Dinâmica – São Paulo, SP, Brasil

¹¹ Sigma Aldrich – St Louis, MO, USA

14. contra-coloração com hematoxilina de Carazzi¹² por 2 minutos;
15. lavagem em água corrente e destilada;
16. desidratação em três passagens de etanol absoluto;
17. diafanização em 2 banhos de xilol;
18. montagem com bálsamo e lamínula.

O controle negativo da coloração imunohistoquímica foi obtido com a omissão da fase de incubação dos anticorpos primários em duas amostras de cada grupo e o controle positivo através da coloração de cortes histológicos de tonsila amigdalina para os anticorpos anti-linfócitos CD4, CD8 e linfócitos B; mucocele para o anticorpo anti-macrófago e um tumor intestinal para o anticorpo anti-mastócito. Tecidos esses cedidos pela Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP e que contêm grandes quantidades dos tipos celulares estudados.

Os cortes foram analisados em microscópio de luz modelo Axioplan 2¹³ e as imagens transferidas a um computador através de câmera de vídeo (DFC 280¹⁴). Em aumento de 40x, foram selecionados 5 campos ($\approx 22.000\mu\text{m}^2$) que apresentavam maior intensidade de marcação celular e as imagens foram capturadas. Através de “software” apropriado - Image manager¹⁵ (IM50), as áreas das imagens foram mensuradas e o número de células marcadas foi contado. Após a obtenção dos resultados, os dados foram calculados para a verificação da densidade celular, ou seja, a obtenção do número de células por milímetro quadrado (células/mm²).

Devido à distribuição não-normal dos resultados da contagem celular, os dados foram submetidos ao teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis, através do programa Bioestat 3.0¹⁶. Foram comparadas as densidades celulares

¹² Nuclear - São Paulo, SP, Brasil

¹³ Carl Zeiss - Germany

¹⁴ Leica Microsystems – Wetzlar, Germany

¹⁵ Leica Microsystems – Wetzlar, Germany

¹⁶ Ayres M – Belém, Pará, Brasil

apresentadas pelos diferentes células em cada grupo de polpas: normais e inflamadas.

Tabela 1 - Relação de anticorpos primários monoclonais utilizados segundo o clone, diluição, especificidade e marca comercial.

Anticorpo	Clone	Diluição	Especificidade	Marca
Anti-T Cell, CD45RO	OPD4	1:200	Linfócitos T-CD4	Dako ¹⁷
Anti-T Cell, CD8	C8/144B	1:50	Linfócitos T-CD8	Dako
Anti-B Cell, CD20	L26	1:10000	Linfócitos B	Dako
Anti-Macrophage, CD68	PG-M1	1:600	Macrófagos	Dako
Anti- Mast Cell Tryptase	AA1	1:12000	Mastócitos	Dako

¹⁷ DakoCytomation – Glostrup, Copenhagen, Denmark

5 RESULTADOS

5.1 Coloração em Hematoxilina e Eosina

A maioria das amostras com diagnóstico clínico de polpa normal apresentou população celular compatível com a normalidade. Maior quantidade de células foi encontrada em 8 casos relacionados a pacientes jovens. A análise histológica não apresentou focos inflamatórios em nenhuma das polpas classificadas clinicamente como polpa normal (figura 3 A e B).

Calcificações distróficas estavam presentes em todos os casos (figura 3 C). A maior parte dessas calcificações ocorreu na polpa radicular e em maior intensidade (figura 3 D) em dentes que foram extraídos por doença periodontal ou por finalidade protética.

Também foram observadas calcificações distróficas em polpas inflamadas, porém diferentemente das polpas normais, não foram encontradas em todos os casos. Focos inflamatórios constituídos principalmente de células mononucleares (figura 3 E, F e G) foram encontrados em parte dos casos de polpas inflamadas, entretanto, algumas amostras apresentavam apenas alterações vasculares e discreto aumento celular difuso (figura 3 H). Em nenhum caso pode-se observar a presença de micro-abscessos.

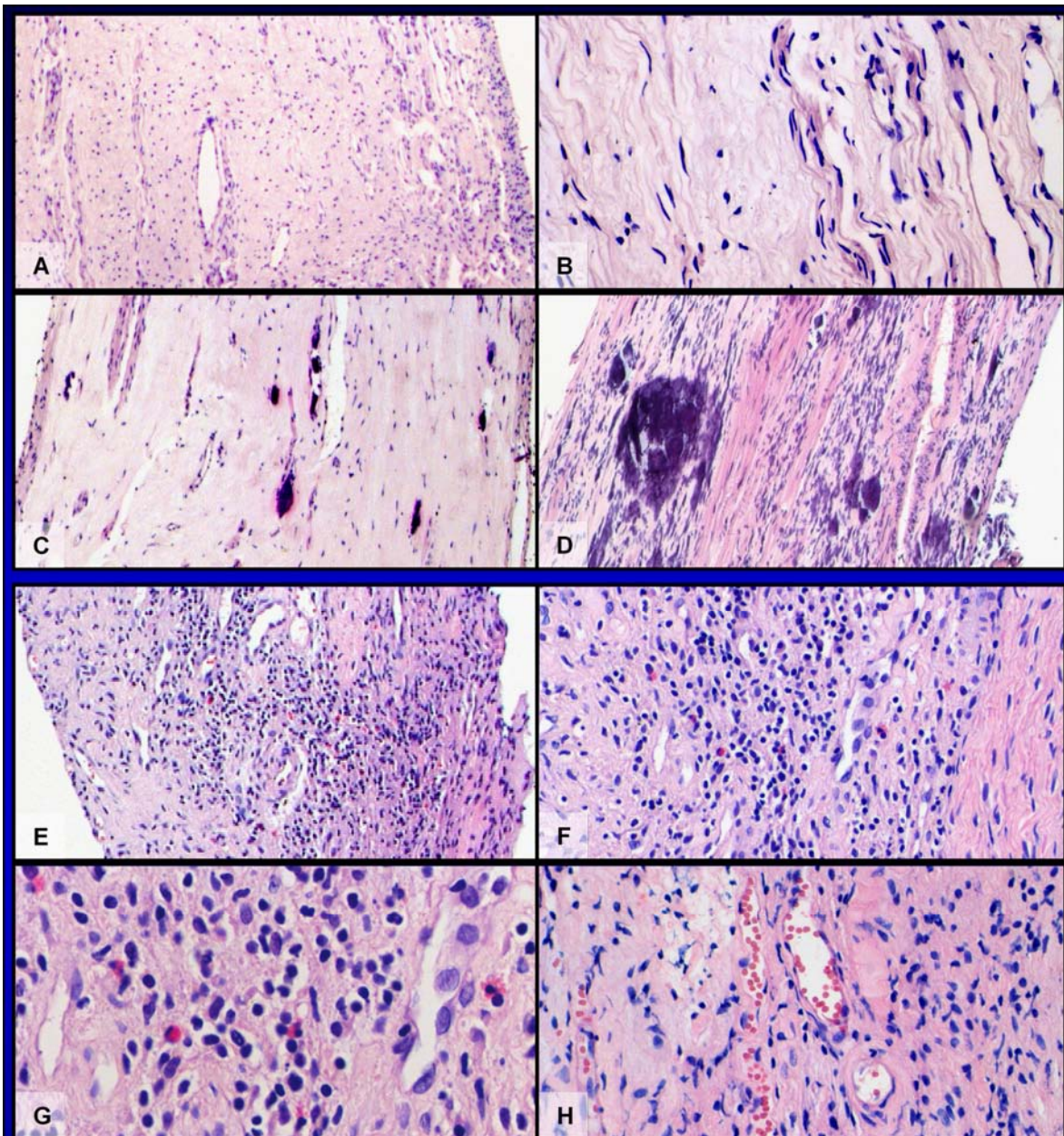


Figura 3 – Coloração em Hematoxilina e Eosina - (A) amostra com diagnóstico clínico de polpa normal – notar população celular normal na polpa coronária (aumento original 50x); (B) figura anterior (200X); (C) presença de calcificações distróficas na porção radicular de uma polpa normal (50x); (D) calcificação distrófica de maior intensidade na porção radicular de uma polpa normal (50x); (E) amostra com diagnóstico clínico de polpa inflamada – maior população celular no centro da polpa coronária (aumento original 50x); (F) figura anterior (200x); (G) notar predomínio de células mononucleares e presença de alguns eosinófilos em polpa inflamada (400x); (H) polpa inflamada com alterações vasculares e aumento celular difuso (200x).

5.2 Marcação imunohistoquímica

5.2.1 Polpas normais

Os cortes de polpas normais apresentaram marcação positiva em aproximadamente 58% das amostras para macrófagos, 50% das amostras para linfócitos T8 e 43% das amostras para linfócitos T4. Os linfócitos B e mastócitos foram encontrados em duas amostras (8%) de polpas normais.

A análise das densidades celulares (células/mm²) encontradas demonstrou que os linfócitos T8 apresentaram em 75% das amostras (terceiro quartil) valores menores ou iguais a 42,5. Os linfócitos T4 e macrófagos apresentaram valores menores ou iguais a 10 e os linfócitos B e mastócitos apresentaram 75% de valores zero (Figura 4). A comparação entre os maiores valores apresentados (quarto quartil) demonstrou medianas maiores para os linfócitos T4 e T8, intermediária para os macrófagos e menores para os linfócitos B e mastócitos (Figura 5).

A comparação estatística entre as densidades celulares (células/mm²) apresentadas mostrou diferenças significantes com maior número de linfócitos T8 quando comparados aos linfócitos B e mastócitos (Kruskal-Wallis - $p < 0,05$). As outras comparações não apresentaram diferenças estatísticas significantes (Tabela 2).

Os macrófagos foram encontrados por todo tecido, entretanto, pode-se notar ligeira predileção para periferia do tecido pulpar, na maioria das vezes localizando-se distantes da camada odontoblástica. A marcação imunohistoquímica positiva apresentou aspecto granular e marcação citoplasmática de moderada intensidade nas células encontradas nos tecidos pulpares normais (Figura 6).

Os linfócitos T4 e T8 foram encontrados dispersos por todo tecido pulpar e assim como os linfócitos B não apresentaram distribuição característica no tecido. As células positivas apresentaram marcação de membrana, citoplasmas reduzidos e formas circulares ou ovais (Figuras 7, 8 e 9).

Os mastócitos, apesar de serem encontrados em número reduzido, estavam geralmente localizados próximos a vasos sanguíneos. As células positivas apresentaram marcação citoplasmática de intensidade moderada (Figura 10).

Quando são cruzados os dados do número de células encontrado nas polpas normais (Tabela 5 – anexo 5) e dos aspectos clínicos dos dentes (Tabela 3 – anexo 4), pode-se verificar que a marcação de células imunológicas e inflamatórias não pode ser correlacionada com a presença ou ausência de restaurações nas coroa dentais, com a razão da exodontia ou da extirpação da polpa, ou mesmo com a idade do paciente.

5.2.2 Polpas inflamadas

Os cortes de polpas inflamadas apresentaram marcação positiva em aproximadamente 64% das amostras para linfócitos T4, 58% das amostras para macrófagos e 57% das amostras para linfócitos T8. Os linfócitos B foram encontrados em 29% das amostras e os mastócitos em 27% das polpas inflamadas.

Os linfócitos T4 e macrófagos apresentaram 75% dos valores (terceiro quartil) menores ou iguais a 80, enquanto que os linfócitos T8 menores ou iguais a 77,5. Já os linfócitos B apresentaram valores inferiores ou iguais a 40 e os mastócitos menores ou iguais a 7,5 (Figura 4). Os macrófagos apresentaram maior mediana quando os dados das polpas com infiltrado inflamatório mais intenso (quarto quartil) foram comparados, seguidos dos linfócitos T8, T4 e B. Os mastócitos apresentaram menor mediana no quarto quartil em polpas inflamadas (Figura 5). A análise estatística dos dados não mostrou diferença significativa entre as densidades das células estudadas em polpas inflamadas (Kruskal-Wallis - $p > 0,05$) (Tabela 2).

Nos tecidos pulparem inflamados as diferentes células foram encontradas principalmente circunscritas aos focos inflamatórios. Os macrófagos e mastócitos apresentaram morfologicamente citoplasma mais circular e distendido,

com marcação citoplasmática mais intensa em polpas inflamadas do que a marcação encontrada em polpas normais (Figuras 6 e 10). Já os linfócitos não apresentaram diferenças na morfologia e marcação imunohistoquímica entre as células marcadas em polpas normais e inflamadas (Figuras 7, 8 e 9).

Nas polpas inflamadas, o número de células imunológicas e inflamatórias marcadas foi maior nos dentes que apresentavam cáries quando comparados com aqueles que estavam apenas restaurados (Tabela 4 – anexo 4 e Tabela 6 – anexo 5). Entretanto, todas as amostras apresentavam sintomatologia e nem todas apresentaram expressivo aumento de células, que foi encontrado apenas nas amostras que apresentavam infiltrados inflamatórios característicos. Assim como a sintomatologia do paciente, a resposta muito acentuada frente ao teste térmico e a idade do paciente não puderam ser correlacionadas com um aumento do número de células em todos os casos.

As amostras de polpas normais e inflamadas utilizadas como controle negativo, não apresentaram nenhum tipo de marcação imunohistoquímica (Figura 11).

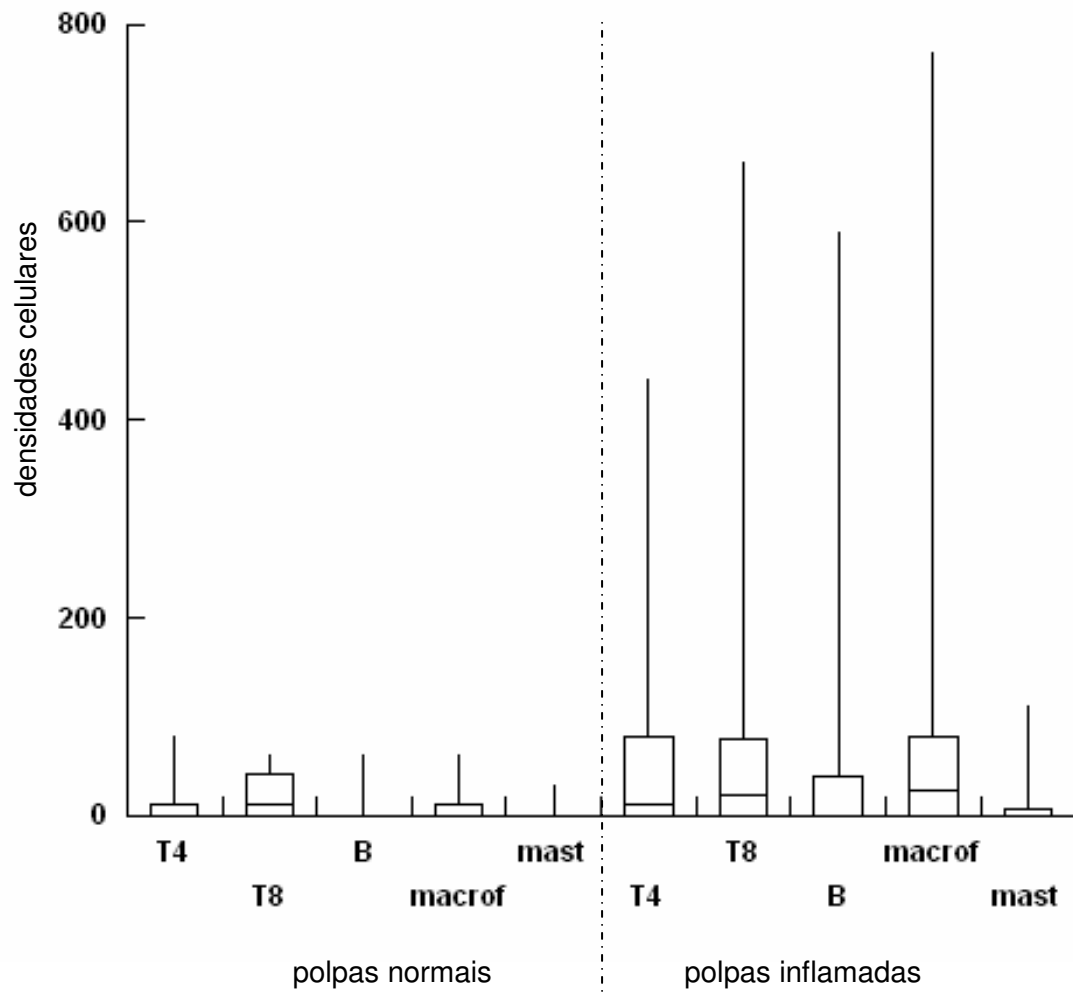


Figura 4 – Box-Plot das medianas e quartis apresentados pelos linfócitos T4 (T4), linfócitos T8 (T8), linfócitos B (B), macrófagos (macrof) e mastócitos (mast) em polpas normais e inflamadas.

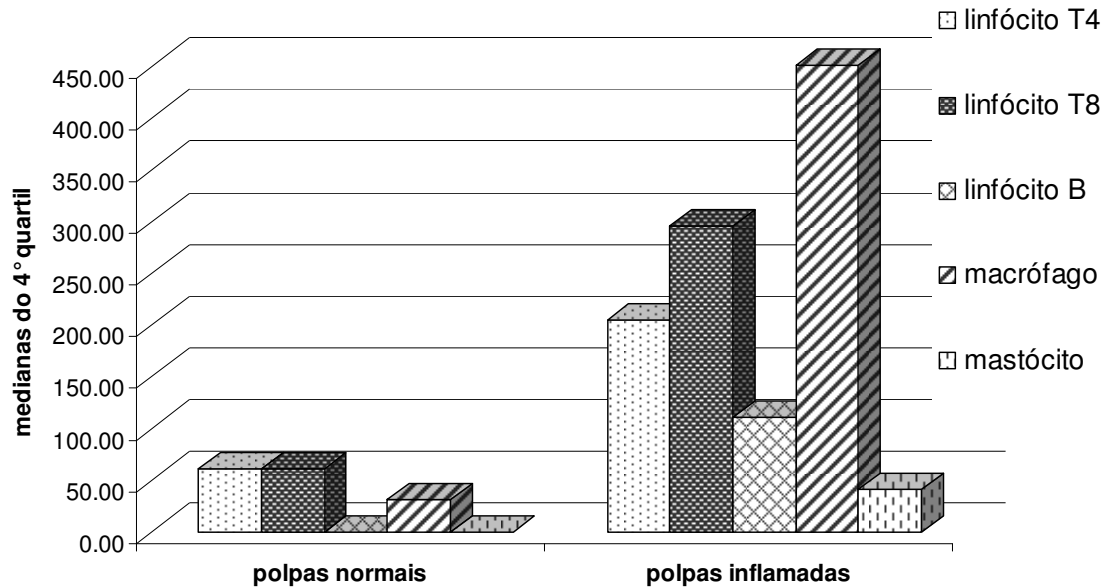


Figura 5 – Medianas dos valores do 4º quartil apresentadas pelos vários tipos celulares em polpas normais e inflamadas.

Tabela 2 – Medianas e intervalo de variação apresentados pelas diferentes células em polpas dentais normais e inflamadas.

Células	Polpas normais		Polpas inflamadas	
	Mediana	Intervalo de variação (células/mm ²)	Mediana	Intervalo de variação (células/mm ²)
Linfócitos T4	0 ^{ab}	0 – 80	10 ^a	0 - 440
Linfócitos T8	10 ^a	0 – 60	20 ^a	0 - 660
Linfócitos B	0 ^b	0 – 60	0 ^a	0 - 590
Macrófagos	10 ^{ab}	0 – 60	25 ^a	0 - 770
Mastócitos	0 ^b	0 – 30	0 ^a	0 - 110

Medianas seguidas de letras iguais na vertical não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis (p>0,05).

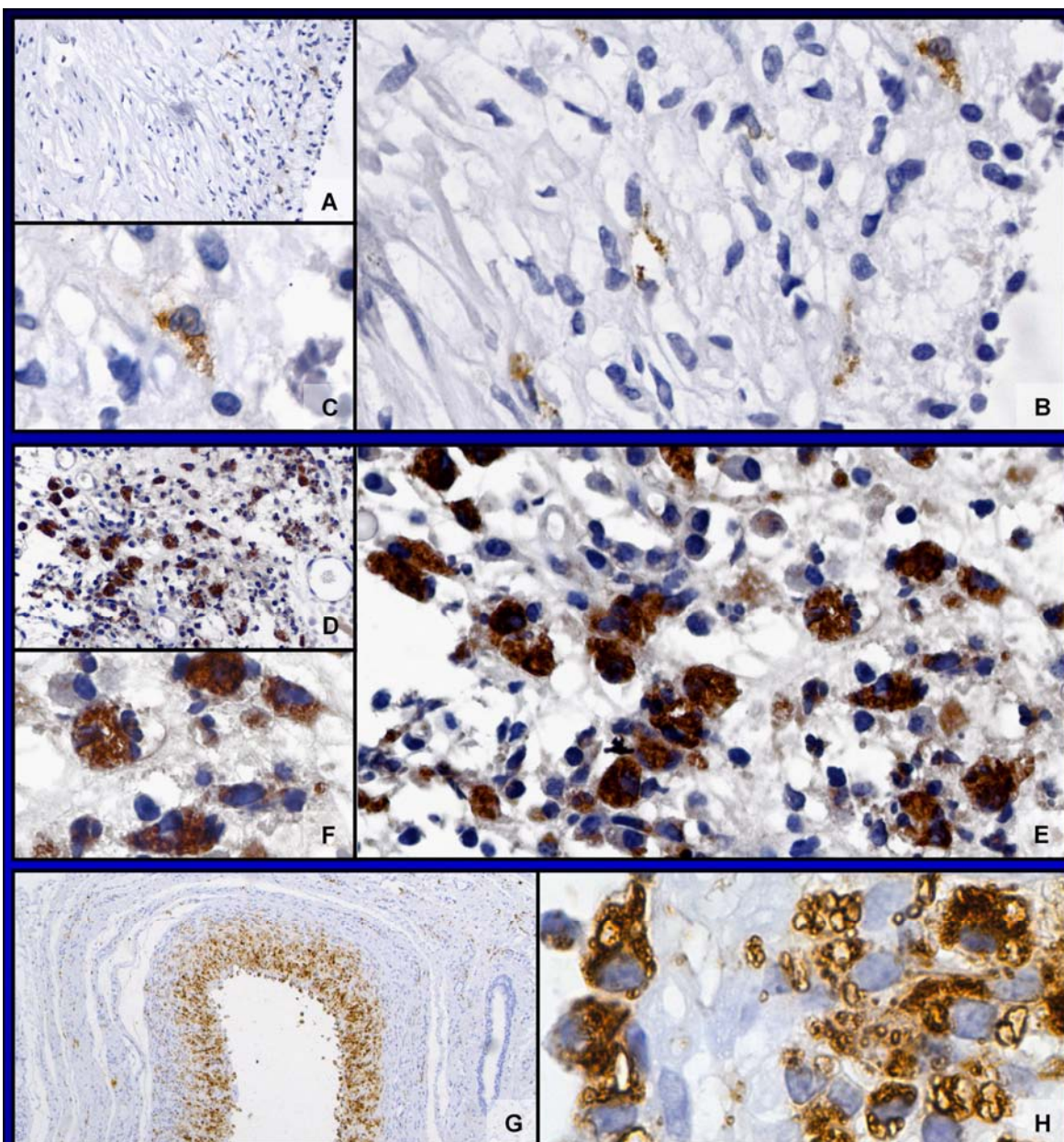


Figura 6 – Marcação imunohistoquímica para macrófagos - (A) amostra com diagnóstico clínico de polpa normal (aumento original 200x); (B) poucas células marcadas na periferia do tecido pulpar, notar distanciamento da camada odontoblástica desorganizada (400X); (C) marcação citoplasmática de aspecto granular (1000x); (D) amostra com diagnóstico clínico de polpa inflamada – várias células marcadas no centro da polpa coronária (aumento original 200x); (E) figura anterior (400x); (F) especificidade da marcação citoplasmática mais intensa (1000x); (G) mucocele utilizada como controle positivo – marcação intensa junto ao muco extravasado no tecido (aumento original 50x); (H) figura anterior - especificidade da marcação citoplasmática (1000x).

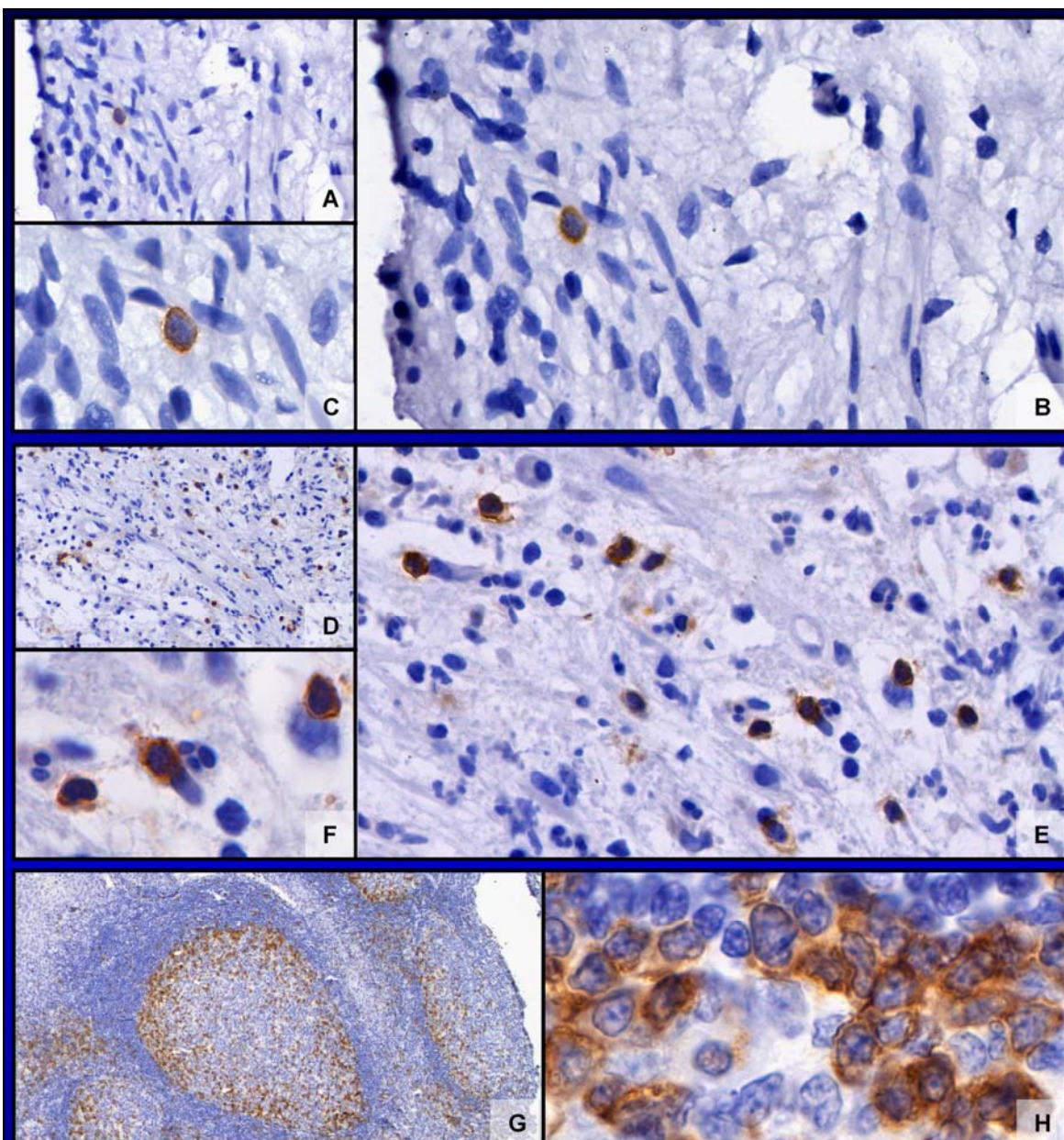


Figura 7 – Marcação imunohistoquímica para linfócitos T4 - (A) amostra com diagnóstico clínico de polpa normal – célula marcada na periferia do tecido pulpar (aumento original 200x); (B) figura anterior (400X); (C) célula com núcleo ovalado, citoplasma reduzido e marcação de membrana (1000x); (D) amostra com diagnóstico clínico de polpa inflamada – várias células marcadas no centro da polpa coronária (aumento original 200x); (E) figura anterior (400x); (F) figura anterior - especificidade da marcação de membrana (1000x); (G) tonsila amigdaliana utilizada como controle positivo – marcação mais intensa na periferia do centro germinativo (aumento original 50x); (H) figura anterior - especificidade da marcação de membrana (1000x).

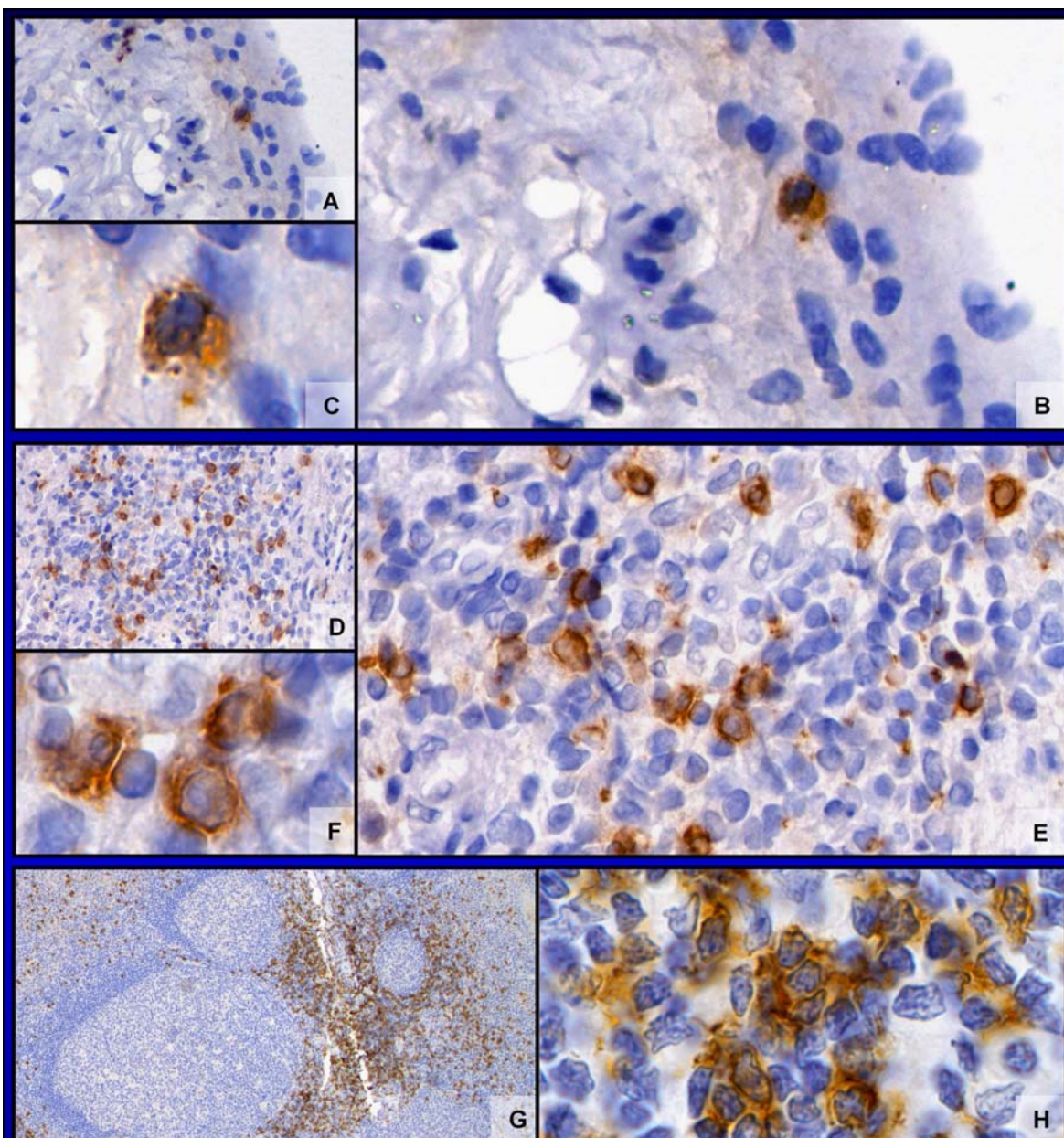


Figura 8 – Marcação imunohistoquímica para linfócitos T8 - (A) amostra com diagnóstico clínico de polpa normal – célula marcada na periferia do tecido pulpar, distante da camada odontoblástica desorganizada (aumento original 200x); (B) figura anterior (400X); (C) figura anterior - especificidade da marcação de membrana (1000x); (D) amostra com diagnóstico clínico de polpa inflamada – maior quantidade de células marcadas no centro da polpa coronária (aumento original 200x); (E) figura anterior (400x); (F) figura anterior - especificidade da marcação de membrana (1000x); (G) tonsila amigdaliana utilizada como controle positivo – marcação fora do centro germinativo (aumento original 50x); (H) figura anterior - especificidade da marcação de membrana (1000x).

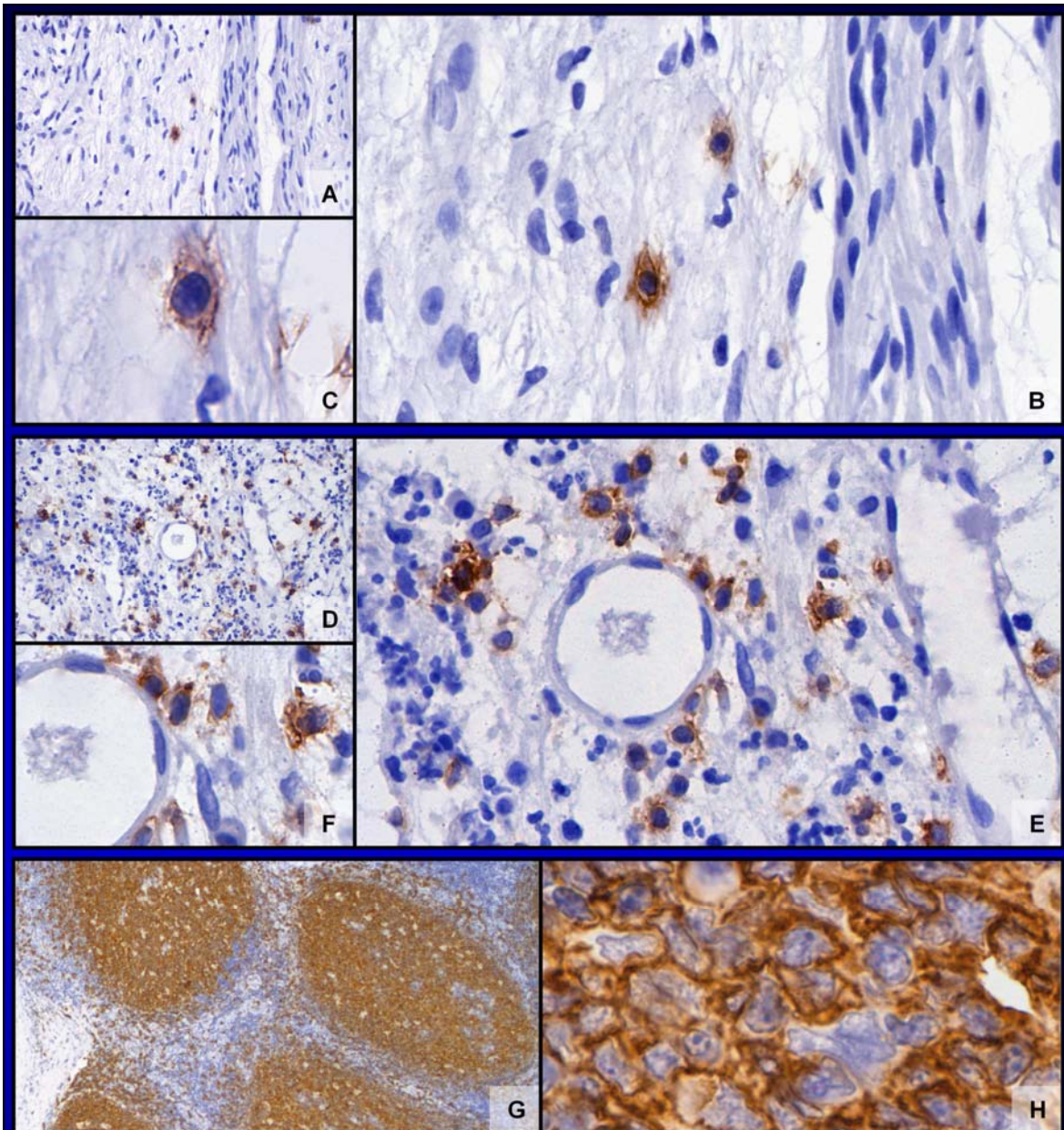


Figura 9 – Marcação imunohistoquímica para linfócitos B - (A) amostra com diagnóstico clínico de polpa normal – células marcadas no centro do tecido pulpar (aumento original 200x); (B) notar proximidade das células marcadas a fibra nervosa (400X); (C) célula marcada com citoplasma reduzido e núcleo ovalado, com especificidade da marcação de membrana (1000x); (D) amostra com diagnóstico clínico de polpa inflamada – maior quantidade de células marcadas no centro da polpa coronária (aumento original 200x); (E) figura anterior (400x); (F) células marcadas adjacentes a um vaso sanguíneo (1000x); (G) tonsila amigdaliana (controle positivo) – marcação mais evidente no centro germinativo (aumento original 50x); (H) figura anterior - especificidade da marcação de membrana (1000x).

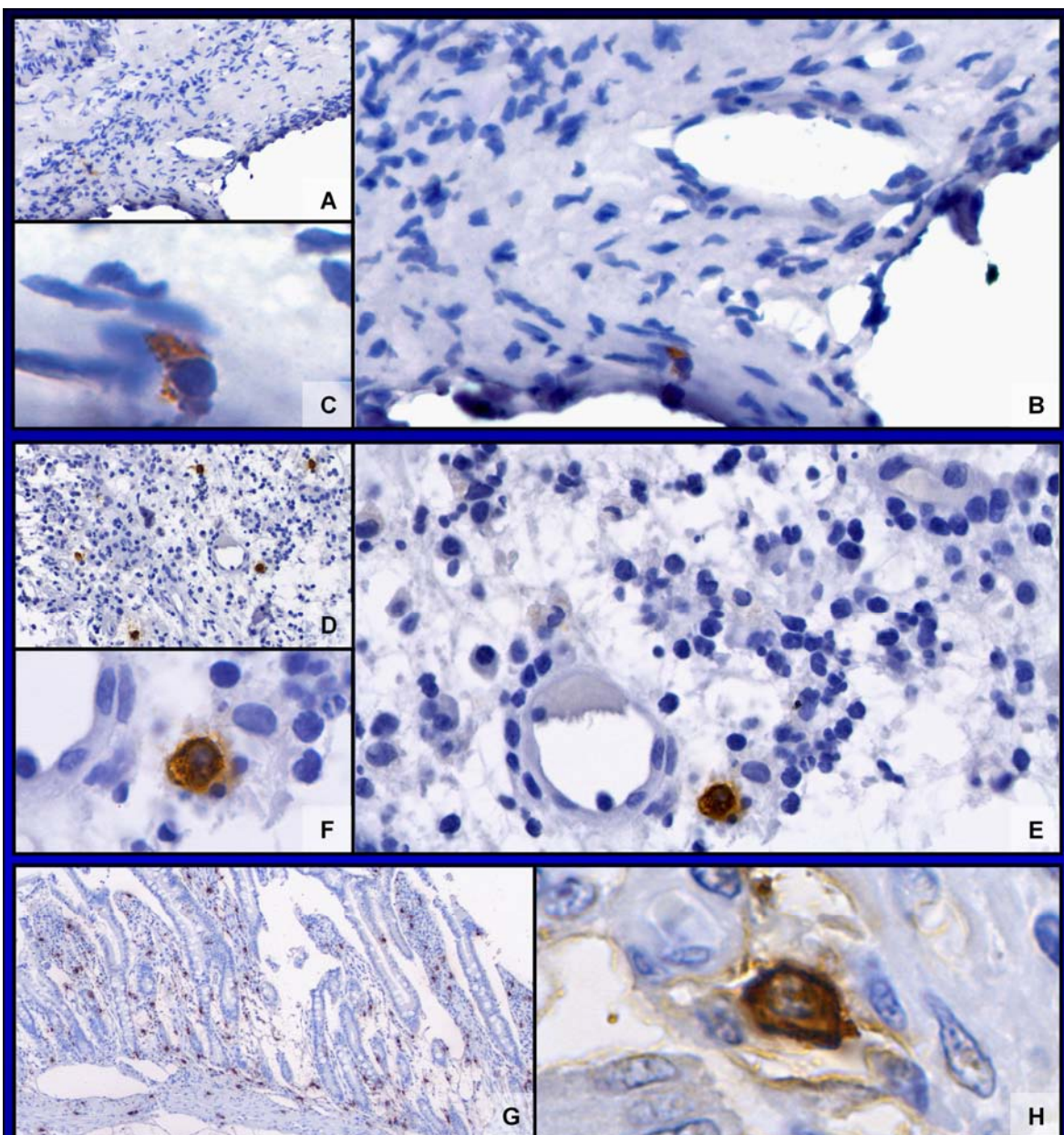


Figura 10 – Marcação imunohistoquímica para mastócitos - (A) amostra com diagnóstico clínico de polpa normal (aumento original 200x); (B) célula marcada na periferia do tecido pulpar, próxima a um vaso sanguíneo (400X); (C) marcação citoplasmática específica (1000x); (D) amostra com diagnóstico clínico de polpa inflamada – algumas células marcadas no centro da polpa coronária (aumento original 200x); (E) célula marcada adjacente a um vaso sanguíneo (400x); (F) marcação citoplasmática mais intensa (1000x); (G) tumor intestinal utilizado como controle positivo – marcação dispersa pelas alças intestinais (aumento original 50x); (H) especificidade da marcação citoplasmática (1000x).

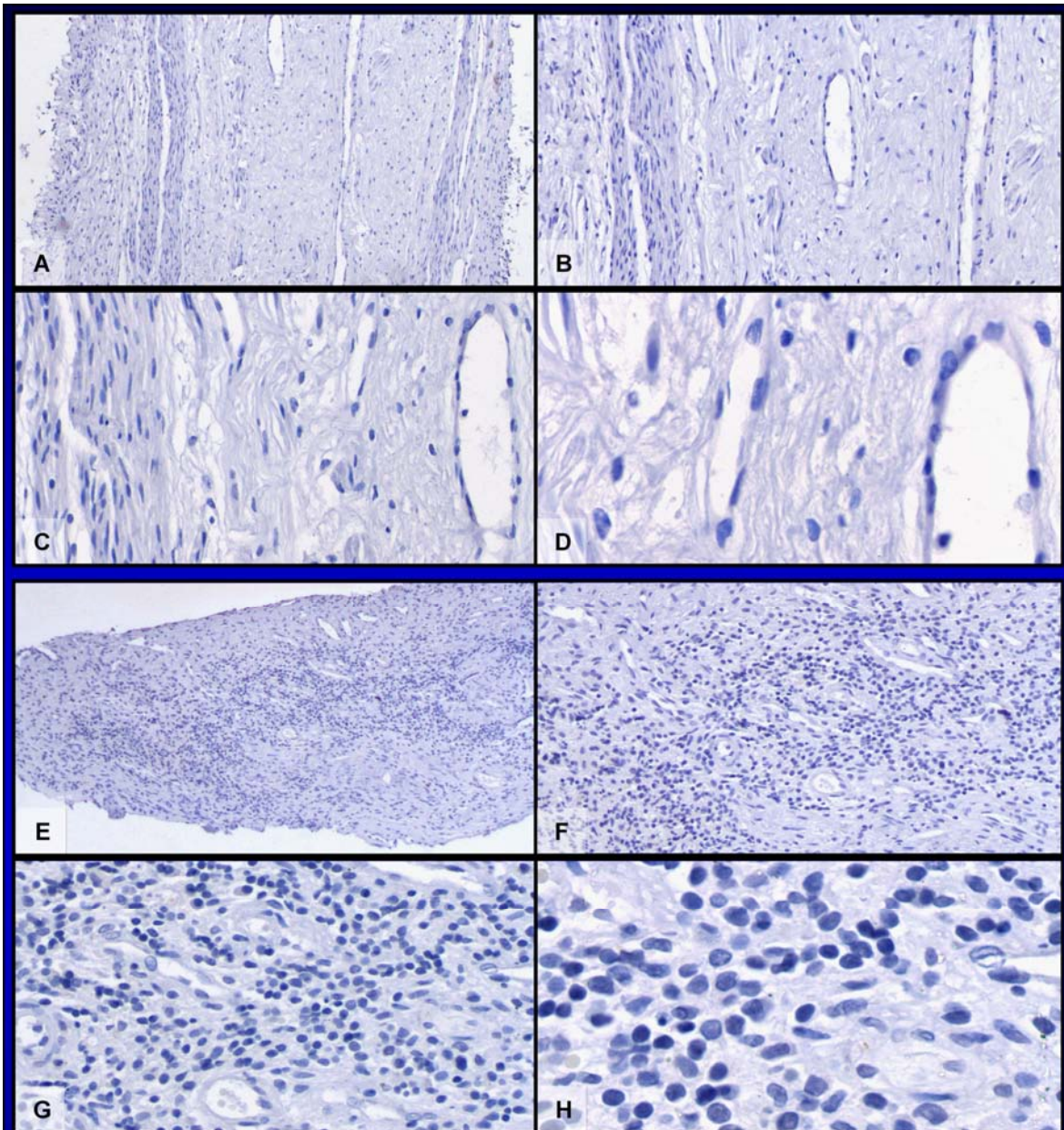


Figura 11 – Controles negativos das reações imunohistoquímicas - omissão da fase de incubação com anticorpo primário, substituído por solução tampão PBS - (A) amostra com diagnóstico clínico de polpa normal – notar ausência de marcações celulares ou mesmo marcações inespecíficas (aumento original 50x); (B) figura anterior (100X); (C) figura anterior (200x); (D) figura anterior (400x); (E) amostra com diagnóstico clínico de polpa inflamada – maior população celular no centro da polpa coronária e ausência de marcações celulares ou inespecíficas (aumento original 50x); (F) figura anterior (100x); (G) figura anterior (200x); (H) figura anterior (400x).

6 DISCUSSÃO

A imunohistoquímica tem sido muito utilizada para a identificação celular em diferentes tecidos, assim como na polpa dental. Devido à sensibilidade da técnica imunohistoquímica, tem-se admitido que o processamento de peças histológicas com tempos excessivos de fixação e descalcificação pode danificar os sítios de ligação dos anticorpos nos tecidos e interferir na marcação com o aparecimento de falso-negativo (Pertot *et al.*, 1997). Dessa forma, os estudos em imunohistoquímica têm utilizado rotineiramente tecidos pulparem removidos de dentes extraídos e clivados para a análise da presença de células inflamatórias (Jontell *et al.*, 1987; Hahn *et al.*, 1989; Grégoire & Terrié, 1990; Izumi *et al.*, 1995), assim como a interação entre mediadores químicos e células inflamatórias (Nakanishi *et al.*, 2001, 2005). A clivagem dos dentes para a remoção do tecido pulpar evita o processo de descalcificação. Sabe-se que esse processo de remoção da polpa se dá na camada de odontoblastos sem alterações significativas dos vasos ou células imuno-competentes (Davis *et al.*, 1994) e por esse motivo, pode ser utilizado para estudar a presença de células inflamatórias na polpa dental.

6.1 Linfócitos T

A presença de linfócitos T em polpas dentais inflamadas foi detectada por Pekovic e Fillery em 1984. Entretanto, Seltzer & Bender (1984) ainda acreditavam que polpas dentais não inflamadas não possuíam linfócitos. Alguns anos após, vários estudos utilizando a imunohistoquímica foram realizados e constataram a presença de linfócitos e sub-populações, tanto em polpas normais quanto em polpas inflamadas (Jontell *et al.*, 1987, Hahn *et al.* 1989, Okiji *et al.*, 1992, Izumi *et al.*, 1995; Sakurai *et al.*, 1999).

Os resultados desse trabalho também demonstraram que linfócitos T são identificados em polpas normais. Entre as células analisadas por esse estudo, os linfócitos T foram os que apresentaram maior número de células marcadas no tecido pulpar saudável. Esses achados são similares aos encontrados por outros

estudos realizados em polpas de dentes humanos (Jontell *et al.*, 1987, Hahn *et al.* 1989, Izumi *et al.*,1995) e também em tecidos pulpare de ratos (Okiji *et al.* ,1992). Como os linfócitos T representam 1 a 2% da população total de células em uma polpa normal, foi sugerido que a imunidade mediada por células T constitui o principal papel da imunidade da polpa dental (Mangkornkarn *et al.*, 1991).

Entre os linfócitos T, os citotóxicos/supressores apresentaram maior valor no 3º quartil e mediana do 4º quartil semelhante aos linfócitos T4, o que evidencia maior número de células marcadas quando os linfócitos T8 são comparados com os auxiliares. Da mesma forma, os linfócitos T4 apesar de apresentarem valor do 3º quartil semelhante aos macrófagos, sua mediana do 4º quartil é superior à apresentada por eles. Assim, apesar de não apresentar diferença estatística, os dados encontrados demonstram maior marcação para os linfócitos T4 em relação aos macrófagos e também aos linfócitos B e mastócitos.

Maior número de linfócitos T8 em relação ao T4 também foi verificado em polpas normais de dentes permanentes através da técnica imunohistoquímica (Jontell *et al.*, 1987, Hahn *et al.* 1989, Gregoire & Terrie, 1990; Okiji *et al.* ,1992, Izumi *et al.*,1995), mas não ocorreram em polpas normais de dentes decíduos (Angelova *et al.*, 2004). Em dentes permanentes, apenas o estudo de citometria de fluxo (Mangkornkarn *et al.*, 1991) encontrou quantidade de linfócitos T4 superior a de linfócitos T8 em tecidos pulpare normais. As diferentes metodologias utilizadas poderiam explicar as divergências dos resultados apresentados.

A taxa T4/T8 tem sido largamente utilizada para caracterizar a proporção regulatória da população de linfócitos T em doenças auto-imunes e em lesões inflamatórias (Hunninghake *et al.*, 1981; Duke *et al.*, 1982). Hahn *et al.* (1989) encontraram um aumento no número de linfócitos T4 em polpas classificadas como pulpites reversíveis, entretanto, ainda identificaram maior número de linfócitos T8 com taxa T4/T8 de 0,56. Observando esses resultados, os autores sugerem que após o controle da resposta antigênica inicial, o papel regulador dos linfócitos T8 atenuaria o processo inflamatório e seria responsável

pela reversibilidade da patologia pulpar. Essa função regulatória também poderia ser encarada como uma das razões de polpas normais, analisadas por imunohistoquímica, apresentarem mais linfócitos T8 do que linfócitos T4.

A observação dos dados desse trabalho demonstrou aumento do número de linfócitos T4 e T8 em polpas classificadas como inflamadas. O aumento apresentado pelos linfócitos T foi maior do que o aumento de linfócitos B. O predomínio de linfócitos T sobre os linfócitos B também foi demonstrado em polpas inflamadas (Izumi *et al.*, 1995; Sakurai *et al.*, 1999) e em lesões periapicais (Lukic *et al.*, 1990; Liapatas *et al.*, 2003). O maior número de linfócitos T em relação aos linfócitos B pode ser explicado pela ação inibitória que o aumento de linfócitos T8 tem sobre os linfócitos B em tecidos inflamados (Grégoire & Terrié, 1990), ou mesmo pela diferenciação de linfócitos B em plasmócitos para a produção de anticorpos na área inflamada, o que diminuiria a identificação de células CD20 positivas (linfócitos B).

Os linfócitos T8 apresentaram valor do 3º quartil muito próximo ao apresentado pelos linfócitos T4, entretanto demonstrou maior mediana nas amostras de polpas com infiltrado inflamatório mais intenso (4º quartil). Esses dados evidenciam um maior número de linfócitos T8 em relação aos T4 encontrados em polpas inflamadas nesse trabalho, o que também foi relatado por outros estudos (Grégoire & Terrié, 1990; Izumi *et al.*, 1995). A determinação da taxa entre linfócitos T4 e T8 também tem sido utilizada como parâmetro para representar o papel regulador das sub-populações de linfócitos T em polpas inflamadas. O estudo de Hahn *et al.* (1989), apesar de demonstrar em seus resultados maior número de linfócitos T8 do que linfócitos T4 em polpas inflamadas, estranhamente descreveram taxa T4/T8 de 1,14. De qualquer forma, o maior número de trabalhos que utilizaram imunohistoquímica demonstra maior densidade de linfócitos T8 em polpas inflamadas. Esse predomínio de linfócitos T8 na inflamação pulpar não é encontrado em lesões periapicais inflamatórias (Nilsen *et al.* 1984; Marton & Kiss, 1993; Liapatas *et al.*, 2003). Assim, a taxa T4/T8

encontrada em polpas inflamadas indica que os linfócitos T8 apresentam um papel regulador mais predominante na polpa do que em outros tecidos.

Os linfócitos T8 são frequentemente descritos com atuação citotóxica, entretanto, ainda não está claro se as células CD8 positivas (linfócitos T8) possuem como principal função exercer papel supressor, atenuando excessos em reações imunes, ou destruindo células que transportam antígenos (Marton & Kiss, 2000).

O acúmulo de células dendríticas (apresentadoras de antígenos) subjacente a túbulos dentinários expostos por cárie apresenta, na maioria das vezes, concentração de linfócitos T ao seu redor. Entretanto, os plasmócitos e neutrófilos são pouco encontrados (Sakurai *et al.*, 1999). Esses achados indicam um papel inicial importante da interação entre os linfócitos T e as células dendríticas. Essa interação pode resultar em ativação dessas células e conseqüentemente facilitar a mobilização e interação de diferentes tipos de células efetoras e desencadear eventos imuno-patológicos envolvidos no processo de patologia pulpar associada à cárie (Jontell *et al.*, 1998).

Dessa forma, a necessidade de interação com células dendríticas ou mesmo macrófagos é de fundamental importância para a apresentação de antígenos aos linfócitos T e conseqüentemente para desencadear reações imunológicas iniciais. Essa observação deixa claro que apesar dos linfócitos T serem tidos como principais responsáveis pela imunidade inicial da polpa dental (Mangkornkarn *et al.*, 1991; Jontell *et al.*, 1998), a interação com outros tipos celulares tem igual importância para o correto desencadeamento da resposta imune desse tecido.

6.2 Linfócitos B

A presença dos linfócitos B em polpas dentais normais ainda tem gerado controvérsias na literatura. Jontell *et al.* (1987) não foram capazes de detectar esse tipo celular em polpas saudáveis. Entretanto, Hahn *et al.* (1989) puderam identificar um linfócito B nas polpas normais analisadas em seu trabalho.

Esse número pequeno de células identificadas fez com que Mangkornkarn *et al.* (1991) afirmassem que a presença de uma única célula identificada é insignificante e que nenhum estudo teria demonstrado diretamente, naquela época, a presença desse tipo celular em tecidos pulpares saudáveis. Outros estudos, além do realizado por Jontell *et al.* (1987) também não foram capazes de localizar esse linfócito em polpas normais de dentes permanentes (Mangkornkarn *et al.*, 1991) e polpa normais de dentes decíduos (Angelova *et al.*, 2004). Assim, com os dados dispostos na literatura, Jontell *et al.* em 1998, afirmaram que era difícil de detectar um papel significativo para linfócitos B em polpas dentais normais.

A presença de linfócitos B foi demonstrada em duas amostras de polpas normais desse trabalho. Apesar da baixa incidência entre as 24 amostras analisadas e uma das menores densidades celulares, está em acordo com outros estudos (Hahn *et al.*, 1989; Izumi *et al.*, 1995; Sakurai *et al.*, 1999) que também as encontraram em poucas amostras e em pequena quantidade.

A identificação imunohistoquímica desse tipo celular em polpas normais pode estar restrita a fases de diferenciação dessa célula. Mangkornkarn *et al.* (1991) afirmam que a liberação de linfocinas por linfócitos T presentes na polpa, promove vasodilatação e possivelmente, linfócitos B circulantes migram para o tecido pulpar, proliferam e se diferenciam em plasmócitos para produção de anticorpos em estágios tardios da inflamação pulpar. Os anticorpos utilizados nas técnicas imunohistoquímicas são diferentes para a identificação de linfócitos B e plasmócitos. Dessa maneira, a identificação de linfócitos B em polpas normais pode ser ocasional e dependente do estágio de diferenciação dessa célula.

Jontell *et al.* (1987) como não detectaram esses linfócitos em polpas normais, sugerem que essas células não são residentes permanentes do tecido conjuntivo de polpas dentais saudáveis. Entretanto, devemos considerar também que a utilização de cortes teciduais de polpas dentais em estudos imunohistoquímicos, mesmo que secções seriadas sejam realizadas, não representam todo o tecido, pois partes podem ser perdidas durante o

processamento (Mangkornkarn *et al.*, 1991). Assim, afirmar que linfócitos B não são residentes permanentes da polpa saudável (Jontell *et al.*, 1987) e que a resposta imunológica inicial da inflamação pulpar é feita apenas por linfócitos T (Mangkornkarn *et al.*, 1991) pode não ser real.

A identificação de linfócitos B realizada em polpas normais foi verificada em duas amostras de dentes que continham coroa íntegra e foram extraídos por motivo de doença periodontal que não atingia o ápice radicular. A presença dessas células não deve ser justificada pela ocorrência de periodontite, já que Hahn *et al.* (1989) também não puderam constatar através da imunohistoquímica relação direta entre a presença de doença periodontal e alterações da composição celular do tecido pulpar. Da mesma forma, nos resultados desse trabalho ficou evidente que a presença de doença periodontal não foi responsável por um aumento no número células imunológicas e inflamatórias.

A presença de linfócitos B em polpas inflamadas foi constatada em 29% das amostras, com maior número de células (mediana 110 no 4º quartil) quando comparada aos tecidos normais (mediana 0 no 4º quartil) e com menor número de células marcadas quando comparada a linfócitos T em polpas com inflamação mais intensa (medianas 295 e 205 para T8 e T4 no 4º quartil). Menor número de linfócitos B em relação aos linfócitos T também foi constatado por outros autores que estudaram dentes permanentes com polpas saudáveis ou inflamadas (Izumi *et al.*, 1995; Pertot *et al.*, 1997; Sakurai *et al.*, 1999). Diferentemente desses achados, Hahn *et al.* (1989) descrevem aumento no número de linfócitos B em polpas com diagnóstico de pulpite irreversível maior, inclusive, do que os apresentados por linfócitos T4. Essa divergência poderia ter sido ocasionada pela diferenciação de linfócitos B em plasmócitos em diferentes estágios de inflamação estudados, ou mesmo devido à modificação da resposta inflamatória em diferentes estágios de cárie (Izumi *et al.*, 1995; Sakurai *et al.*, 1999). Entretanto, esse aumento do número de linfócitos B em polpas inflamadas, em maior ou menor grau, sugere que em estágios mais avançadas da inflamação, há aumento da resposta humoral desse tecido (Izumi *et al.*, 1995). O aumento de imunoglobulinas

como IgG, IgA e IgE em polpas dentais inflamadas também indica a presença de resposta imune humoral, com a possibilidade da síntese local de imunoglobulinas (Pulver *et al.*, 1977, Speer *et al.*, 1977).

Nas amostras de polpas inflamadas, a presença de linfócitos B foi aparentemente inferior à presença de linfócitos T8. Como citado anteriormente, sabe-se que o aumento de linfócitos T8 em tecidos inflamados inibe a presença de linfócitos B e outras sub-populações de linfócitos T, a fim de evitar respostas imunes excessivas (Grégoire & Terrié, 1990). Essa relação inibitória justificaria os níveis inferiores de linfócitos B em relação aos linfócitos T8, já que o aumento de linfócitos B ocorre mais tardiamente na inflamação pulpar de dentes permanentes acometidos por cárie (Izumi *et al.*, 1995). Essa relação entre linfócitos T e B também pode ser encontrada em dentes decíduos com diferentes níveis de reabsorção radicular fisiológica (Angelova *et al.*, 2004).

O aumento de linfócitos T desde o início do processo inflamatório e o aumento mais tardio de linfócitos B, confere à resposta imune mediada por linfócitos T papel principal na iniciação da imunidade pulpar após exposição a antígenos. A liberação de mediadores químicos por linfócitos T provavelmente é pré-requisito para ativação de outras células como os linfócitos B (Jontell *et al.*, 1998).

6.3 Macrófagos

A identificação de macrófagos, assim como os linfócitos B, também mostra resultados divergentes quando polpas saudáveis são analisadas. Jontell *et al.* (1987) identificaram a presença de macrófagos em polpas normais, entretanto, Izumi *et al.* (1995) não foram capazes de identificar essa célula em polpas que não apresentavam cáries ou até mesmo em polpas que apresentavam níveis superficiais de cárie.

Os resultados encontrados nesse estudo mostram que foi possível identificar macrófagos em polpas normais, o que está em acordo com outros trabalhos realizados em polpas humanas (Jontell *et al.*, 1987, Nakanishi *et al.*,

2005) e também em polpas dentais de ratos (Jontell *et al.*, 1988; Okiji *et al.*, 1992). Essas células apresentaram número de marcações positivas inferior a de linfócitos T, como encontrado por Jontell *et al.* (1987). Apesar dos macrófagos serem menos numerosos que os linfócitos T, foram encontrados em maior número (58%) de amostras, o que reforça a presença dessas células em tecidos pulpare normais.

Sabe-se que células dendríticas podem ser identificadas na polpa dental humana (Yoshida *et al.* 1996; Sakurai *et al.*, 1999) e de ratos (Jontell *et al.*, 1988). Uma grande parte dessas células possui características fenotípicas de macrófagos (Okiji *et al.*, 1992) e apresentam marcação com os anticorpos utilizados para a identificação de macrófagos, como o CD 14 ou CD 68 (Nestle *et al.* 1993). Dessa maneira, a separação das células dendríticas dos macrófagos durante a identificação celular pode apresentar dificuldades mesmo com a utilização de técnicas sensíveis como a imunohistoquímica. Porém, como as células dendríticas não são especializadas em fagocitose, Jontell *et al.* (1988) puderam verificar que 77% das células marcadas com anticorpo para células dendríticas e/ou macrófagos em polpas normais de ratos possuem a capacidade de fagocitar e, portanto, podem ser descritas como macrófagos.

A localização das células CD68 positivas (macrófagos) mostrou ligeira predileção para a periferia do tecido pulpar normal, uma característica apresentada pelas células dendríticas (Jontell *et al.*, 1988; Okiji *et al.* 1992; Yoshida *et al.*, 1996; Sakurai *et al.*, 1999). Entretanto, nenhuma dessas células se apresentou na camada sub-odontoblástica ou mesmo no meio da camada odontoblástica, o que também é encontrado para as células dendríticas (Okiji *et al.* 1992; Ohshima *et al.*, 1994; Sakurai *et al.*, 1999). Outra característica dessas células dendríticas não apresentada pelas células CD68 positivas encontradas nesse trabalho, foi seu padrão de morfologia com aparência dendrítica ou estrelada (Jontell *et al.* 1988; Okiji *et al.*, 1992; Ohshima *et al.*, 1994; Sakurai *et al.*, 1999). Dessa forma, pode-se ressaltar que a marcação apresentada pelo

anticorpo CD68 caracterizou principalmente a população de macrófagos nos tecidos pulpares analisados.

Em polpas inflamadas, os macrófagos apresentaram um dos maiores valores no 3º quartil e a maior mediana dos valores em polpas com infiltrado inflamatório mais intenso (4º quartil). Maior expressão de macrófago em polpas inflamadas não foi encontrada por Izumi *et al.* (1995), que apesar de detectarem aumento dessas células com a progressão da lesão cariosa, a quantidade de células identificadas foi bem inferior a de linfócitos T8 e T4. A razão da divergência entre esses resultados pode, além de estar nos procedimentos técnicos, estar na utilização de um anticorpo primário policlonal feita por Izumi *et al.* (1995), já que esses anticorpos são menos específicos que anticorpos monoclonais, principalmente para a identificação celular. Deve-se ressaltar que esses autores também não foram capazes de identificar macrófagos em polpas normais.

A presença de grande quantidade de macrófagos (células CD68 positivas) em polpas inflamadas também foi relatada por Nakanishi *et al.* (2001; 2005). Entretanto, não foi realizada comparação com os níveis de linfócitos T, já que não constituía como proposta de seus trabalhos. Poucos são os trabalhos realizados em polpas inflamadas de dentes permanentes que relacionaram o número encontrado de macrófagos, linfócitos e mastócitos. Angelova *et al.* (2004) também notaram maior aumento na população de macrófagos em relação a linfócitos T ou B em dentes decíduos com níveis de reabsorção radicular fisiológica mais avançados.

O aumento acentuado de macrófagos em polpas inflamadas, principalmente restrita às áreas de infiltrado inflamatório, pode ser justificado por alguns fatores. Em estágios mais avançados de cárie há um aumento de produtos bacterianos que geram o desenvolvimento de uma reação imune local, com destruição de componentes celulares (Izumi *et al.*, 1995). Assim, esses macrófagos presentes no foco inflamatório poderiam estar exercendo a fagocitose do tecido pulpar degradado (Nakanishi *et al.*, 2001), o que também é sugerido para o acúmulo de macrófagos em dentes decíduos com reabsorção fisiológica

(Angelova *et al.*, 2004). Outra função que poderia ser exercida por essas células é a apresentação de antígenos. Sabe-se que células dendríticas podem apresentar antígenos diretamente (Steinman, 1981), entretanto, certos antígenos requerem processamento intracelular pelos macrófagos para que possam ser apresentados (Unanue, 1981). Assim como ocorre em lesões periapicais (Márton *et al.*, 1998), além da função de fagocitose, os macrófagos podem digerir e apresentar antígenos a linfócitos T na polpa dental inflamada. E por fim, em polpas inflamadas, os macrófagos podem atuar como células reguladoras participando da produção de prostaglandinas através da expressão da Ciclooxigenase-2 (COX-2) (Nakanishi *et al.*, 2001) e liberando mediadores químicos (MIP-3 α - proteína inflamatória do macrófago) para recrutamento de células T (Nakanishi *et al.*, 2005).

6.4 Mastócitos

A presença de mastócitos em polpas dentais tem gerado controvérsias na literatura. Estudos histoquímicos realizados em polpas dentais não conseguiram identificar esse tipo celular (Miller *et al.*, 1978). A utilização de colorações histoquímicas que visam a coloração dos grânulos presentes em seu citoplasma, mostra dificuldades na identificação dessa célula devido à sua fragilidade e conseqüente degranulação durante procedimentos como fixação e/ou descalcificação (Zachrisson & Skogedal, 1971; Farnoush, 1984).

Durante a realização da revisão literária, dois trabalhos merecem destaque: o trabalho publicado em 1984 por Farnoush e outro publicado em 1995 por Walsh *et al.* O primeiro, exibe uma foto com a presença de mastócitos em polpas normais; entretanto, Almeida OP observou que essa foto era proveniente de uma publicação anterior em tecido gengival (Nuki & Farnoush, 1975) e descreveu o ocorrido à revista *Journal of Endodontics*. Assim, anos após (Farnoush, 1987) foi publicada uma errata buscando esclarecer a troca das ilustrações. Já o estudo de Walsh *et al.* (1995), apesar de ter realizado identificação imunohistoquímica, não descreve com transparência os resultados

obtidos em polpa dental e também não publica foto alguma, assim como realizado para os outros tecidos estudados por eles. Sabendo que a presença de mastócitos é discutida, principalmente em polpas normais, a publicação de fotos erroneamente e a apresentação deficiente de resultados referentes a achados tão importantes e discutidos pode trazer dúvida a essas publicações.

Dessa forma, talvez devido à inespecificidade das colorações utilizadas no passado e à incoerência desses artigos, Jontell *et al.* em 1998, ainda relatam que os mastócitos estão ausentes em polpas dentais, ao menos nos tecidos saudáveis.

Contrariando essa afirmação, a presença de mastócitos foi demonstrada por esse estudo em duas amostras de polpas classificadas clinicamente como normais. A coloração com Azul de Toluidina, freqüentemente utilizada para identificação de mastócitos em diferentes tecidos, é menos sensível que a utilização de anticorpos monoclonais (anti-triptase) em imunohistoquímica e subestima o número de mastócitos e de mastócitos degranulados (Zochodne *et al.*, 1994). Dessa forma, a utilização da técnica imunohistoquímica pode ter sido o fator primordial para a identificação desse tipo celular em polpas normais.

É válido ressaltar que os mastócitos, quando corados por Azul de Toluidina em seções histológicas, aparentam ter forma circular. Entretanto, sabe-se que quando são analisados por microscopia eletrônica de transmissão ou imunohistoquímica, evidenciam forma mais estrelada ou dendrítica (Kaminer *et al.*, 1991; Walsh *et al.*, 1991), assim como observado na Figura 10.

Essas células foram demonstradas em duas amostras que não apresentavam nenhum tipo de sintomatologia dolorosa. Uma das amostras foi removida de um dente com coroa íntegra, que foi extraído por demonstrar doença periodontal avançada. Entretanto, histologicamente essa amostra demonstrou aspectos compatíveis com polpas saudáveis. A outra amostra foi removida de um dente que apresentava cárie incipiente, mas com ausência total de sintomatologia e infiltrado inflamatório quando analisada histologicamente.

Os tecidos pulparem inflamados demonstraram aumento no número de mastócitos marcados, mas em números inferiores quando comparado aos linfócitos e macrófagos.

Devido à contraditória presença de mastócitos em tecido pulparem, principalmente em tecidos saudáveis, era freqüente a especulação em que se questionava seu envolvimento na resposta imune inicial. Sugeria-se que a falta de mastócitos na polpa tinha um papel fisiológico, já que a liberação de substâncias vasoativas poderia ser prejudicial ao tecido pulpar, devido ao grande aumento da pressão tecidual que geraria (Dockrill, 1961; Jontell *et al.*, 1998). Entretanto, sugere-se que a liberação de quimase pode modular os efeitos da histamina que é liberada pelos mesmos grânulos dos mastócitos (Rubinstein *et al.*, 1990). Assim, poderíamos especular que um controle da vasodilatação e aumento da pressão intra-pulpar poderia ocorrer mesmo que essas células estivessem presentes e ativas nos períodos iniciais da inflamação.

Mesmo que os mastócitos não apresentassem a função de liberação de substâncias vasoativas (histamina), outras funções exercidas por eles em outros tecidos podem ser sugeridas como participantes da resposta imune inicial ou tardia da polpa dental. A liberação de triptase pelos mastócitos pode contribuir para o desarranjo do tecido conjuntivo através da ativação de pró-colagenase (Gruber *et al.*, 1989) ou pelo desenrolar de uma cascata de metaloproteinases (MMP) (Gruber *et al.*, 1988). Esse desarranjo da matriz do tecido conjuntivo pode facilitar a infiltração tecidual de leucócitos durante o desenvolvimento da inflamação (Walsh, 2003). A liberação de TNF (fator de necrose tumoral) pelos mastócitos é capaz de organizar a migração de neutrófilos e linfócitos T para os tecidos (Walsh *et al.*, 1990; Waldorf *et al.*, 1991). A liberação de IL-1 (Interleucina-1) poderia contribuir para a manutenção dos efeitos vasculares promovidos pelo TNF e a liberação de IL-4 (Interleucina-4) poderia promover a transição da inflamação aguda para crônica (Walsh, 2003).

A identificação imunohistoquímica dos mastócitos no tecido pulpar saudável ou inflamado pode contribuir para que estudos posteriores possam

verificar as reais funções dessas células na polpa dental e conseqüentemente, para que os mecanismos de inflamação pulpar sejam melhor conhecidos.

6.5 Correlação entre os aspectos clínicos e imunohistoquímicos

Durante a análise das amostras em Hematoxilina e Eosina pode-se notar que nem todas as polpas classificadas clinicamente como inflamadas apresentavam processo inflamatório evidente. Desconsiderando-se o fato de que parte do tecido pulpar pode ser perdido durante o processo de remoção da polpa, já que outros autores puderam encontrar infiltrado inflamatório na maioria das polpas inflamadas (Hahn *et al.* 1989, Nakanishi *et al.*, 2001, 2005), alguns motivos podem ser considerados para ausência de processo inflamatório. Como o diagnóstico é baseado em sinais e sintomas, nem sempre nota-se a correlação entre a sintomatologia e os achados histológicos (Seltzer *et al.*, 1963; Morse *et al.*, 1977, Mendoza *et al.*, 1987). Seltzer *et al.* (1963) relatam que polpas dentais que responderam com sintomatologia dolorosa exacerbada em testes térmicos, apresentaram aspectos histológicos desde normal até a presença de inflamação com liquefação. Dessa forma, através da metodologia utilizada pode-se confirmar que além da ausência de relação entre a sintomatologia e o aspecto histológico dos tecidos pulpares, não foi notada correlação entre a sintomatologia apresentada pelos pacientes e aumento do número de células imunológicas em todos os tecidos pulpares classificados clinicamente como inflamados. O aumento dessas células pôde ser claramente notado apenas nos tecidos pulpares que apresentaram sintomatologia e infiltrado inflamatório localizado. Assim, a presença de sintomatologia não pôde ser correlacionada, em todos os casos, com o aumento de células imunológicas e inflamatórias. Pode-se sugerir apenas que a estimulação das células imunológicas e inflamatórias presentes no tecido pulpar normal e a liberação de mediadores químicos, seja uma das vias para a excitação das terminações nervosas e para ocorrência de sintomatologia pulpar.

A presença de sintomatologia também pode ser atribuída à estimulação direta de nociceptores por produtos bacterianos como os lipopolissacarídeos

(LPS) (Wadachi & Hargreaves, 2006). Como a quantidade de LPS necessária para promover a infiltração leucocitária na polpa dental de ratos é 4 vezes maior que no peritônio (Maltos *et al.*, 2004), os produtos bacterianos poderiam estimular as terminações nervosas na polpa antes que a migração celular aconteça. Pode-se também sugerir que a estimulação de terminações nervosas sensoriais possa causar a secreção de neuropeptídeos (calcitonin-gene related peptide – CGRP; substância P - SP e prostaglandina E₂) capazes de causar vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (Maltos *et al.*, 2004) e conseqüentemente aumento da pressão interna pulpar (Kim, 1985). Um aumento da pressão intra-pulpar, mesmo que localizado, pode exceder o limiar de excitabilidade de nervos sensoriais periféricos na região afetada e produzir dor (Smulson, 1984). Assim, esse aumento da pressão intra-pulpar também poderia justificar a presença de sintomatologia em polpas que não apresentam infiltrados inflamatórios característicos.

Essa falta de interação entre a sintomatologia clínica e a presença de células imunológicas fez com que os resultados obtidos apresentassem alta variabilidade e conseqüentemente diferenças estatísticas apenas entre os linfócitos T8, linfócitos B e mastócitos em polpas normais. Como os resultados encontrados estão em acordo com a maioria dos estudos imunohistoquímicos realizados em polpas dentais, verifica-se que há coerência nos resultados obtidos.

Para estudos futuros, seria interessante verificar a distribuição dessas células em dentes descalcificados, a fim de evitar possíveis perdas de tecido durante a coleta, possibilitar melhor descrição morfológica e relacionar suas localizações com o tecido dentinário.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pela metodologia desse trabalho permitiram concluir que:

- a) todas as células estudadas, inclusive os mastócitos, podem ser identificadas em polpas dentais classificadas clinicamente em normais e inflamadas;
- b) em polpas normais, os linfócitos T8 apresentaram maior número de células marcadas, seguidos pelos linfócitos T4, macrófagos, linfócitos B e mastócitos, com diferença estatística entre o número de linfócitos T8 e linfócitos B e mastócitos;
- c) em polpas inflamadas, os macrófagos apresentaram maior número de células marcadas, seguidos dos linfócitos T8, T4, B e mastócitos, sem diferenças estatísticas significantes.
- d) não foi observada correlação entre a sintomatologia apresentada pelos pacientes e o aumento do número de células imunológicas e inflamatórias em todos os tecidos pulparem classificados clinicamente como inflamados.

REFERÊNCIAS

- 1 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular*. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002.
- 2 Aneroth G, Brannstrom M. Autofluorescent Granular Cells and Mast Cells in Human Gingiva. *Odontol Revy*. 1964; 15: 10-4.
- 3 Angelova A, Takagi Y, Okiji T, Kaneko T, Yamashita Y. Immunocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. *Arch Oral Biol*. 2004; 49(1): 29-36.
- 4 Bonelli A, Bacci S, Vannelli B, Norelli A. Immunohistochemical localization of mast cells as a tool for the discrimination of vital and postmortem lesions. *Int J Legal Med*. 2003; 117(1): 14-8.
- 5 Calich VLG, Vaz CAC. *Imunologia Básica*. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas; 1989.
- 6 Carranza FA Jr, Cabrini RL. Mast cells in human gingiva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1955; 8(10): 1093-9.
- 7 Carvalho RA, Figueiredo JAP. Histofisiologia do complexo dentino-pulpar. In: Lopes HP, Siqueira Jr. JF. *Endodontia: Biologia e Técnica*. Rio de Janeiro: Medsi; 1999.
- 8 Cobb CM, Heneghan JB, LeBlanc DM, Davis MJ. Mast cell distribution in oral tissues of germ-free vs. conventional beagle dogs. *J Periodontol*. 1976; 47(4): 230-5.
- 9 Cohen S. Procedimentos para o diagnóstico. In: Cohen S, Burn R. *Caminhos da polpa*. 7. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2000. p. 1-18.

- 10 Costa-Filho AS. Diagnóstico em endodontia. *In: Lopes HP, Siqueira Jr JF. Endodontia - Biologia e Técnica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica Ltda e Editora Guanabara Koogan S.A.; 2004. p. 101-19.
- 11 Cotran RS, Kumar V, Collins T. **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
- 12 Davis MF, Walsh LJ, Xu LJ, Savage NW. Adhesion molecule expression in dental pulp [abstract]. **J Dent Res**. 1994; 73: 749. *Apud* Walsh LJ, Davis MF, Xu LJ, Savage NW. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. **J Oral Pathol Med**. 1995; 24(6): 266-72.
- 13 Dockrill TE. Tissue mast cells in the oral cavity. **Aust Dent J**. 1961; 6: 206-14.
- 14 Duke O, Panayi GS, Janossy G, Poulter LW. An immunohistological analysis of lymphocyte subpopulations and their microenvironment in the synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis using monoclonal antibodies. **Clin Exp Immunol**. 1982 Jul;49(1):22-30.
- 15 Eda S, Langeland K. The alteration of mast cell staining due to various fixatives and demineralizing agents. **Scand J Dent Res**. 1970; 78(3): 217-31.
- 16 Eleazer PD, Farber PA, Seltzer S. Lack of lymphocyte stimulation by root canal products. **J Endod**. 1975; 1(12): 388-94.
- 17 Estrela C, Figueiredo JAP. Patologia pulpar. *In: Estrela C, Figueiredo JAP. Endodontia: princípios biológicos e mecânicos*. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas; 1999.
- 18 Farnoush A. Mast cells in human dental pulp. **J Endod**. 1984; 10(6): 250-2.

- 19 Farnoush A. Mast cells in human dental pulp. **J Endod.** 1987; 13(7): 362-3.
- 20 Figueiredo MAZ, Estrela C, Figueiredo JAP. Métodos de diagnóstico aplicados à endodôntica. *In:* Estrela C, Figueiredo JAP. **Endodontia: princípios biológicos e mecânicos.** 1. ed. São Paulo: Artes Médicas; 1999. p.1-24.
- 21 Gregoire G, Terrie B. Identification of lymphocyte antigens in human dental pulps. **J Oral Pathol Med.** 1990; 19(6): 246-50.
- 22 Gruber BL, Marchese MJ, Suzuki K, Schwartz LB, Okada Y, Nagase H, Ramamurthy NS. Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. **J Clin Invest.** 1989; 84(5): 1657-62.
- 23 Gruber BL, Schwartz LB, Ramamurthy NS, Irani AM, Marchese MJ. Activation of latent rheumatoid synovial collagenase by human mast cell tryptase. **J Immunol.** 1988; 140(11): 3936-42.
- 24 Hahn CL, Falkler WA Jr, Siegel MA. A study of T and B cells in pulpal pathosis. **J Endod.** 1989; 15(1): 20-6.
- 25 Helton LE, Hall WB. Human gingival mast cells. Effects of chronic inflammation. **J Periodontal Res.** 1968; 3(3): 214-23.
- 26 Herbert WE. A correlation of the clinical signs and symptoms and histological conditions of the pulps of 52 teeth. **Br Dent J.** 1945; 78: 161.
- 27 Hunninghake GW, Crystal RG. Pulmonary sarcoidosis: a disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity. **N Engl J Med.** 1981 Aug 20;305(8):429-34.

- 28 Izumi T, Kobayashi I, Okamura K, Sakai H. Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth. **Arch Oral Biol.** 1995; 40(7): 609-14.
- 29 Jontell M, Bergenholtz G, Scheynius A, Ambrose W. Dendritic cells and macrophages expressing class II antigens in the normal rat incisor pulp. **J Dent Res.** 1988; 67(10): 1263-6.
- 30 Jontell M, Bergenholtz G. Accessory cells in the immune defense of the dental pulp. **Proc Finn Dent Soc.** 1992; 88 Suppl 1: 344-55.
- 31 Jontell M, Gunraj MN, Bergenholtz G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. **J Dent Res.** 1987; 66(6): 1149-53.
- 32 Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. **Crit Rev Oral Biol Med.** 1998; 9(2): 179-200.
- 33 Junqueira LC; Carneiro J. **Histologia básica.** 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan AS; 2004.
- 34 Kaminer MS, Lavker RM, Walsh LJ, Whitaker D, Zweiman B, Murphy GF. Extracellular localization of human connective tissue mast cell granule contents. **J Invest Dermatol.** 1991; 96(6): 857-63.
- 35 Kaminer MS, Lavker RM, Walsh LJ, Whitaker D, Zweiman B, Murphy GF. Extracellular localization of human connective tissue mast cell granule contents. **J Invest Dermatol.** 1991; 96(6): 857-63.
- 36 Kim S. Microcirculation of the dental pulp in health and disease. **J Endod.** 1985; 11(11): 465-71.

- 37 Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J*. 2003; 36(7): 464-71.
- 38 Lukic A, Arsenijevic N, Vujanic G, Ramic Z. Quantitative analysis of the immunocompetent cells in periapical granuloma: correlation with the histological characteristics of the lesions. *J Endod*. 1990; 16(3): 119-22.
- 39 Maltos KL, Menezes GB, Caliari MV, Rocha OA, Santos JM, Alves DL *et al*. Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp. *Arch Oral Biol*. 2004; 49(6): 443-50.
- 40 Mangkornkarn C, Steiner JC, Bohman R, Lindemann RA. Flow cytometric analysis of human dental pulp tissue. *J Endod*. 1991; 17(2): 49-53.
- 41 Marton IJ, Dezso B, Radics T, Kiss C. Distribution of interleukin-2 receptor alpha-chain and cells expressing major histocompatibility complex class II antigen in chronic human periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 1998; 13(4): 259-62.
- 42 Marton IJ, Kiss C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. *Int Endod J*. 1993; 26(2): 131-6.
- 43 Marton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2000; 15(3): 139-50.
- 44 Mendoza MM, Reader A, Meyers WJ, Marquard JV. An ultrastructural investigation of the human apical pulp in irreversible pulpitis. II. Vasculature and connective tissue. *J Endod*. 1987; 13(7): 318-27.

- 45 Miller GS, Sternberg RN, Piliero SJ, Rosenberg PA. Histologic identification of mast cells in human dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978; 46(4): 559-66.
- 46 Morse DR, Seltzer S, Sinai I, Biron G. Endodontic classification. *J Am Dent Assoc.* 1977; 94(4): 685-9.
- 47 Nakanishi T, Shimizu H, Hosokawa Y, Matsuo T. An immunohistological study on cyclooxygenase-2 in human dental pulp. *J Endod.* 2001; 27(6): 385-8.
- 48 Nakanishi T, Takahashi K, Hosokawa Y, Adachi T, Nakae H, Matsuo T. Expression of macrophage inflammatory protein 3alpha in human inflamed dental pulp tissue. *J Endod.* 2005; 31(2): 84-7.
- 49 Nestle FO, Zheng XG, Thompson CB, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol.* 1993; 151(11): 6535-45. Erratum in: *J Immunol* 1994; 152(1): 376.
- 50 Nilsen R, Johannessen AC, Skaug N, Matre R. In situ characterization of mononuclear cells in human dental periapical inflammatory lesions using monoclonal antibodies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984; 58(2): 160-5.
- 51 Nuki K, Farnoush A. The inhibition of mast cell degranulation in monkey gingiva by disodium cromoglycate. *J Periodontal Res.* 1975; 10(5): 282-7.
- 52 Ohkubo T, Shibata M, Yamada Y, Kaya H, Takahashi H. Role of substance P in neurogenic inflammation in the rat incisor pulp and the lower lip. *Arch Oral Biol.* 1993; 38(2): 151-8.

- 53 Ohshima H, Kawahara I, Maeda T, Takano Y. The relationship between odontoblasts and immunocompetent cells during dentinogenesis in rat incisors: an immunohistochemical study using OX6-monoclonal antibody. **Arch Histol Cytol.** 1994; 57(5): 435-47.
- 54 Okiji T, Jontell M, Belichenko P, Bergenholtz G, Dahlstrom A. Perivascular dendritic cells of the human dental pulp. **Acta Physiol Scand.** 1997; 159(2): 163-9.
- 55 Okiji T, Kawashima N, Kosaka T, Matsumoto A, Kobayashi C, Suda H. An immunohistochemical study of the distribution of immunocompetent cells, especially macrophages and Ia antigen-expressing cells of heterogeneous populations, in normal rat molar pulp. **J Dent Res.** 1992; 71(5): 1196-202. Erratum in: **J Dent Res.** 1992; 71(10): 1760.
- 56 Pekovic DD, Fillery ED. Identification of bacteria in immunopathologic mechanisms of human dental pulp. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1984; 57(6): 652-61.
- 57 Pertot WJ, Sindres V, Szekeres G, Proust JP. Model for quantitative immunohistochemical assessment of pulpal response to biomaterials. **J Biomed Mater Res.** 1997; 34(4): 457-62.
- 58 Pertot WJ, Sindres V, Szekeres G, Proust JP. Model for quantitative immunohistochemical assessment of pulpal response to biomaterials. **J Biomed Mater Res.** 1997; 34(4): 457-62.
- 59 Pulver WH, Taubman MA, Smith DJ. Immune components in normal and inflamed human dental pulp. **Arch Oral Biol.** 1977; 22(2): 103-11.



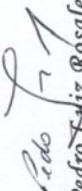

- 60 Roitt I, Brostoff J, Male D. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Editora Manole Ltda; 1999.
- 61 Rubinstein I, Nadel JA, Graf PD, Caughey GH. Mast cell chymase potentiates histamine-induced wheal formation in the skin of ragweed-allergic dogs. **J Clin Invest**. 1990; 86(2): 555-9.
- 62 Sakurai K, Okiji T, Suda H. Co-increase of nerve fibers and HLA-DR- and/or factor-XIIIa-expressing dendritic cells in dentinal caries-affected regions of the human dental pulp: an immunohistochemical study. **J Dent Res**. 1999; 78(10): 1596-608.
- 63 Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. The dynamics of pulp inflammation: correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1963; 16: 846- 71 - 969-77.
- 64 Seltzer S, Bender IB. **The Dental Pulp: Biologic Considerations in Dental Practice**. 3.ed. Philadelphia: JB Lippincott Co; 1984.
- 65 Seltzer S. Classification of pulpal pathosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1972; 34(2): 269-87.
- 66 Smulson MH. Classification and diagnosis of pulpal pathoses. **Dent Clin North Am**. 1984; 28(4): 699-723.
- 67 Souza MAL. Biologia Pulpar. In: Estrela C, Figueiredo JAP. **Endodontia: princípios biológicos e mecânicos**. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas; 1999. p.1-24.
- 68 Speer ML, Madonia JV, Heuer MA. Quantitative evaluation of the immunocompetence of the dental pulp. **J Endod**. 1977 Nov; 3(11): 418-23.

- 69 Steinman RM, Nussenzweig MC. Dendritic cells: features and functions. ***Immunol Rev.*** 1980; 53: 127-47.
- 70 Steinman RM. Dendritic cells. ***Transplantation.*** 1981; 31(3): 151-5.
- 71 Stephan RM. Correlation of clinical tests with microscopic pathology of the dental pulp. ***J Dent Res.*** 1937; 16: 267.
- 72 Thoma KH. A comparison of clinical roentgen and microscopical findings in 15 cases of infected vital pulps. ***J Dent Res.*** 1929; 9: 447.
- 73 Torneck CD. Complexo Dentina-polpa. *In:* Ten Cate AR. ***Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função.*** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2001. p.143-185.
- 74 Trowbridge HO, Kim S. Desenvolvimento, estrutura e função da polpa. *In:* Cohen S, Burn R. ***Caminhos da polpa.*** 7. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2000. p. 364-99.
- 75 Unanue ER. The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. Part Two: symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages. ***Adv Immunol.*** 1981; 31: 1-136.
- 76 Wadachi R, Hargreaves KM. Trigeminal nociceptors express TLR-4 and CD14: a mechanism for pain due to infection. ***J Dent Res.*** 2006; 85(1): 49-53.
- 77 Waldorf HA, Walsh LJ, Schechter NM, Murphy GF. Early cellular events in evolving cutaneous delayed hypersensitivity in humans. ***Am J Pathol.*** 1991; 138(2): 477-86.

- 78 Walsh LJ, Davis MF, Xu LJ, Savage NW. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. *J Oral Pathol Med.* 1995; 24(6): 266-72.
- 79 Walsh LJ, Goerdts S, Pober JS, Sueki H, Murphy GF. MS-1 sinusoidal endothelial antigen is expressed by factor XIIIa+, HLA-DR+ dermal perivascular dendritic cells. *Lab Invest.* 1991; 65(6): 732-41.
- 80 Walsh LJ, Lavker RM, Murphy GF. Determinants of immune cell trafficking in the skin. *Lab Invest.* 1990; 63(5): 592-600.
- 81 Walsh LJ. Mast cells and oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14(3): 188-98.
- 82 Vargas FF, Viovaldi LM. Correlation between nervous accommodation, symptomatology and histology of normal and pathologic tooth pulp: Its applications to electro-diagnosis. *J Dent Res.* 1959; 38: 866
- 83 Wislocki GB, Bunting H, Dempsey EW. Metachromasia in mammalian tissues and its relationship to mucopolysaccharides. *Am J Anat.* 1947; 81: 1-38.
- 84 Wislocki GB, Sognnaes RF. Histochemical reactions of normal teeth. *Am J Anat.* 1950; 87(2): 239-75.
- 85 Yoshida N, Yoshida K, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H. Immunohistochemical localization of HLA-DR-positive cells in unerupted and erupted normal and carious human teeth. *J Dent Res.* 1996; 75(8): 1585-9.
- 86 Zachrisson BU, Skogedal O. Mast cells in inflamed human dental pulp. *Scand J Dent Res.* 1971; 79(7): 488-92.

- 87 Zachrisson BU. Mast cells in human dental pulp. *Arch Oral Biol.* 1971; 16(5): 555-6.
- 88 Zochodne DW, Nguyen C, Sharkey KA. Accumulation and degranulation of mast cells in experimental neuromas. *Neurosci Lett.* 1994; 182(1): 3-6.

ANEXO 1 – certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

 UNICAMP	
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA CERTIFICADO	
<p>Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Identificação imuno-histoquímica de células imunológicas e inflamatórias em polpas dentais normais e inflamadas", sob o protocolo nº 025/2003, do Pesquisador José Flávio Affonso de Almeida, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.</p>	
<p>We certify that the research project with title "Immuno-histochemical identification of immunology and inflammatory cells in normal and inflamed dental pulps", protocol nº 025/2003, by Researcher José Flávio Affonso de Almeida, responsibility by Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).</p>	
Piracicaba, 03 de julho de 2003	
 Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen Secretário CEP/FOP/UNICAMP	 Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes Coordenador CEP/FOP/UNICAMP
Piracicaba, SP, Brazil, July 03 2003	

ANEXO 2 – termo de consentimento aprovado pelo Comitê de ética

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO ESPECÍFICO
PARA A PESQUISA**

Projeto de Pesquisa: “Identificação imunohistoquímica de células imunológicas e inflamatórias em polpas dentais normais e inflamadas.”

O objetivo dessa pesquisa é estudar alterações que ocorrem na polpa dental quando se encontra em estágio de normalidade ou inflamada, através do estudo de suas células imunológicas e inflamatórias. Isto poderá ajudar a entendermos o processo inflamatório pulpar, já que existem poucos dados que possam esclarecer essas alterações de forma eficiente.

A coleta de amostra é feita através da extração dental que será realizada independentemente da pesquisa, não existindo outro método alternativo para tal. Após a extração, os dentes serão levados para o laboratório de Endodontia dessa faculdade, para que suas polpas possam ser removidas através da divisão dos dentes ao meio. As polpas serão retiradas e passarão por processos de análise específicos, que permitirão esclarecimentos sobre seu processo de inflamação. Os fragmentos remanescentes dos dentes serão desprezados em local adequado, pois não possuirão mais função para qualquer outra finalidade.

Você tem toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre a metodologia antes e durante a pesquisa, podendo ou não concordar em participar da mesma.

Se você se recusar a participar ou se você quiser desistir, em qualquer fase da pesquisa, não será penalizado e não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual continuará normalmente.

Apesar dos resultados da pesquisa serem divulgados publicamente para fins acadêmicos e científicos, será preservada a sua privacidade (seu nome não será revelado) quanto aos dados confidenciais que possam ser envolvidos na pesquisa.

Os danos, riscos ou desconfortos que vocês (os pacientes) podem sofrer são apenas aqueles decorrentes das extrações dentais que serão submetidos independentemente da realização ou não da pesquisa. A pesquisa não lhe acarretará nenhum gasto, e o acompanhamento e assistência aos pacientes serão de responsabilidade do operador da extração dental.

A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o comitê de Ética em Pesquisa da FOP – UNICAMP. Endereço Av Limeira, 901 CEP/FOP 13414-900 – Piracicaba – SP.

TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Declaro para os devidos fins que eu, _____

_____,
me disponho a participar da pesquisa intitulada “IDENTIFICAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE CÉLULAS IMUNOLÓGICAS E INFLAMATÓRIAS EM POLPAS DENTAIS NORMAIS E INFLAMADAS” e permito a divulgação dos resultados desta pesquisa. Estou ciente dos objetivos desta pesquisa e de todos os procedimentos e concordo com a metodologia para coleta de amostras pulpares do(s) dente(s) submetido(s) à extração, na Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP. Estou também ciente de minha liberdade de recusar a participar ou retirar o meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem ser penalizado e sem prejuízo ao meu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

Assinatura: _____

Local e data: _____ / ____ / ____

ANEXO 4 – dados clínicos referentes às amostras

Tabela 3 – Aspectos clínicos das amostras de polpas dentais classificadas clinicamente como normais

Número amostra	Dente	Inspecção	Dor	Resposta ao teste térmico	Meio de aquisição da amostra	Razão da exodontia ou extirpação	Gênero	Idade
1	14	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	ortodôntica	M	16
2	24	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	ortodôntica	M	16
3	38	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	sem função	F	27
4	38	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	sem função	F	34
5	23	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	protética	M	49
6	13	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	protética	M	49
8	12	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	periodontal	M	35
9	24	restauração	ausente	normal	exodontia	periodontal	M	35
12	21	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	periodontal	M	43
13	22	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	periodontal	M	43
14	11	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	periodontal	M	43
15	12	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	periodontal	M	43
16	48	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	sem função	M	17
17	45	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	sem função	M	25
20	28	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	sem função	F	25
21	18	restauração	ausente	normal	exodontia	sem função	F	27
22	11	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	periodontal	M	44
23	21	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	periodontal	M	44
24	28	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	sem função	M	20
27	18	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	sem função	M	30
29	11	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	periodontal	F	28
30	12	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	periodontal	F	28
31	22	coroa íntegra	ausente	normal	exodontia	periodontal	F	28
39	21	cárie incipiente	ausente	normal	extirpação	protética	M	49

Tabela 4 – Aspectos clínicos das amostras de polpas dentais classificadas clinicamente como inflamadas

Número amostra	Dente	Inspeção	Dor	Resposta ao teste térmico	Meio de aquisição da amostra	Razão da exodontia ou extirpação	Gênero	Idade
7	48	cárie	espontânea	acentuada	exodontia	sem função	M	60
10	17	restauração	espontânea	acentuada	exodontia	protética	F	44
11	27	restauração	espontânea	acentuada	exodontia	protética	F	44
18	47	cárie	espontânea	acentuada	exodontia	destruição coronária	F	33
19	34	restauração	espontânea	acentuada	exodontia	periodontal	F	40
25	26	cárie	espontânea	acentuada	exodontia	protética	F	42
26	41	restauração	espontânea	acentuada	extirpação	dor	F	34
28	14	cárie	espontânea	muito acentuada	extirpação	dor	M	27
32	48	restauração	espontânea	acentuada	extirpação	dor	F	28
33	47	cárie	espontânea	muito acentuada	extirpação	dor	F	22
34	46	cárie	espontânea	acentuada	extirpação	dor	M	17
35	26	restauração	espontânea	acentuada	extirpação	exposição por cárie	M	28
36	21	cárie	espontânea	muito acentuada	extirpação	dor	F	31
37	46	cárie	espontânea	muito acentuada	extirpação	dor	F	12
38	12	cárie	espontânea	muito acentuada	extirpação	dor	F	51
40	13	cárie	espontânea	muito acentuada	extirpação	dor	M	54
41	36	cárie	espontânea	acentuada	extirpação	dor	M	23
42	21	restauração	espontânea	muito acentuada	extirpação	dor	F	10

ANEXO 5 – densidades celulares apresentadas pelas amostras

Tabela 5 – Número de células marcadas por imunohistoquímica em amostras de polpas dentais classificadas clinicamente como normais

n° amostra	Linfócitos T4	Linfócitos T8	Linfócitos B	Macrófagos	Mastócitos
1	0.00	30.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	50.00	0.00	0.00	0.00
3	60.00	60.00	0.00	60.00	0.00
4	10.00	40.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	10.00	50.00	0.00	50.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	10.00	0.00
9	10.00		0.00	10.00	0.00
12	0.00	0.00	10.00	10.00	0.00
13	0.00	0.00	0.00	40.00	0.00
14	0.00	60.00	0.00	20.00	0.00
15	0.00	0.00	0.00	0.00	10.00
16	0.00	10.00	0.00	10.00	0.00
17	60.00		0.00	10.00	0.00
20	10.00		0.00	0.00	0.00
21	10.00	0.00	0.00	10.00	0.00
22	20.00	40.00	0.00	10.00	0.00
23	10.00	0.00	0.00	10.00	0.00
24		60.00	0.00	0.00	0.00
27	0.00	0.00		0.00	0.00
29	60.00	10.00	0.00	10.00	0.00
30	0.00		0.00	0.00	0.00
31	80.00	20.00	60.00	10.00	0.00
39	0.00	0.00	0.00	0.00	30.00

Tabela 6 – Número de células marcadas por imunohistoquímica em amostras de polpas dentais classificadas clinicamente como inflamadas

n° amostra	Linfócitos T4	Linfócitos T8	Linfócitos B	Macrófagos	Mastócitos
7	100.00	140.00	70.00		0.00
10		0.00	0.00	0.00	0.00
11	0.00	0.00	0.00	10.00	0.00
18	10.00	0.00	0.00	0.00	0.00
19	0.00		0.00	0.00	0.00
25	30.00		0.00	80.00	10.00
26	10.00	10.00	0.00	0.00	40.00
28	0.00		0.00		0.00
32	0.00	30.00	0.00	40.00	0.00
33	20.00	30.00	0.00	80.00	0.00
34	260.00	660.00	100.00	450.00	40.00
35	80.00	40.00	40.00		0.00
36	150.00	0.00	0.00	40.00	0.00
37	440.00	450.00	590.00	770.00	110.00
38	0.00	0.00	0.00		0.00
40	0.00		0.00	0.00	0.00
41	20.00	90.00	120.00		20.00
42	10.00	0.00			0.00

ANEXO 6 – estatística descritiva das densidades celulares – Bioestat 3.0

Tabela 7 – Estatística descritiva do número de células marcadas nas polpas dentais classificadas clinicamente como normais

	Linfócitos T4	Linfócitos T8	Linfócitos B	Macrófagos	Mastócitos
Tamanho da amostra	23	20	23	24	24
Mínimo	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Máximo	80.0000	60.0000	60.0000	60.0000	30.0000
Amplitude Total	80.0000	60.0000	60.0000	60.0000	30.0000
Mediana	0.0000	10.0000	0.0000	10.0000	0.0000
Primeiro Quartil (25%)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Terceiro Quartil (75%)	10.0000	42.5000	0.0000	10.0000	0.0000
Desvio Interquartilico	10.0000	42.5000	0.0000	10.0000	0.0000
Média Aritmética	14.7826	21.5000	3.0435	11.2500	1.6667
Variância	598.8142	592.3684	158.4980	263.5870	40.5797
Desvio Padrão	24.4707	24.3386	12.5896	16.2354	6.3702
Erro Padrão	5.1025	5.4423	2.6251	3.3140	1.3003
Coefficiente de Variação	165.54%	113.20%	413.66%	144.31%	382.21%
Assimetria (g1)	1.7513	0.5609	4.6034	2.0418	4.2609
Curtose (g2)	1.7423	-1.4582	21.5788	3.6777	18.8342
Média Harmônica	15.4386	25.9843	17.1429	12.5937	15.0000
N (média harmônica)	11	11	2	14	2
Média Geométrica	20.9744	33.0762	24.4949	14.7916	17.3205
N (média geométrica)	11	11	2	14	2
Variância (geom.)	1.4403	1.2212	2.0080	1.2243	1.2996
Desvio Padrão (geom.)	2.5006	1.9707	3.5501	1.9790	2.1746

Tabela 8 – Estatística descritiva do número de células marcadas nas polpas dentais classificadas clinicamente como inflamadas

	Linfócitos T4	Linfócitos T8	Linfócitos B	Macrófagos	Mastócitos
Tamanho da amostra	17	14	17	12	18
Mínimo	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Máximo	440.0000	660.0000	590.0000	770.0000	110.0000
Amplitude Total	440.0000	660.0000	590.0000	770.0000	110.0000
Mediana	10.0000	20.0000	0.0000	25.0000	0.0000
Primeiro Quartil (25%)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Terceiro Quartil (75%)	80.0000	77.5000	40.0000	80.0000	7.5000
Desvio Interquartilico	80.0000	77.5000	40.0000	80.0000	7.5000
Média Aritmética	66.4706	103.5714	54.1176	122.5000	12.2222
Variância	14186.7647	39932.4176	20575.7353	57402.2727	771.2418
Desvio Padrão	119.1082	199.8310	143.4424	239.5877	27.7712
Erro Padrão	28.8880	53.4071	34.7899	69.1630	6.5457
Coeficiente de Variação	179.19%	192.94%	265.06%	195.58%	227.22%
Assimetria (g1)	2.4077	2.3096	3.6569	2.3377	2.9488
Curtose (g2)	5.8808	4.6860	14.1098	4.9891	9.4776
Média Harmônica	23.4732	37.4430	84.2972	39.2111	23.9130
N (média harmônica)	11	8	5	7	5
Média Geométrica	45.2972	77.8357	114.6669	86.2412	32.3079
N (média geométrica)	11	8	5	7	5
Variância (geom.)	2.2782	2.4565	1.5534	2.6294	1.4151
Desvio Padrão (geom.)	3.9628	4.2146	2.7376	4.4459	2.4451

ANEXO 7 – soluções utilizadas na técnica imunohistoquímica

Quadro 1 – silanização das lâminas

Adesivo organo-silano (3-aminopropyl-triethoxysilane)	
Preparo das lâminas	
Lavagem em água e detergente	20min
Lavagem em água corrente	
Secagem em estufa	
Banho em acetona	apenas passagem
Banho em Organo-silano 4% (diluído em acetona)	3min
Banho em acetona	apenas passagem
Banho em acetona	apenas passagem
Secagem em estufa 57°C	
Armazenamento em ambiente seco e livre de pó	

Quadro 2 – soluções para recuperação antigênica

Solução de ácido cítrico 10mM	
Ácido cítrico	2,101g
Água destilada	1 litro
Ajustar pH para 6	
Solução de EDTA + Trizma Base	
EDTA (ácido etilenodiaminotetracético)	0,3722g
Trizma Base	1,211g
Água destilada	1000ml
Tween 20	0,5ml
Ajustar pH para 9,9	

Quadro 3 – solução tampão para lavagem

Solução tampão PBS (phosphate-buffered saline)	
Solução 20 vezes concentrada	
Cloreto de sódio anidro (NaCl)	180g
Fosfato de sódio dibásico anidro (Na ₂ HPO ₄)	27,31g
Fosfato de sódio monobásico hidratado (Na ₂ HPO ₄ H ₂ O)	4,85g
Água destilada	1 litro
Solução para uso	
Solução 20 vezes concentrada	200ml
Água destilada	3800ml
Ajustar pH entre 7,2 e 7,6 – ideal 7,4	