UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Aspectos Inflamatórios e Imunológicos de Pulpites Dentárias Humanas

Kely Firmino Bruno

Tese de Doutorado

Goiânia
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Aspectos Inflamatórios e Imunológicos de Pulpites Dentárias Humanas

Modalidade de Artigo Científico

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela

Goiânia
2009

Dedico este trabalho...

Aos maiores amores de minha vida, minha filha **Mariana** e meu esposo **Samuel**, que acompanham, sustentam e motivam todos os meus sonhos e realizações. A eles, ofereço mais esta vitória.

"O amor é paciente, é bondoso.
Não tem inveja, não é orgulhoso, não é arrogante, nem escandaloso.
Não busca seus próprios interesses, não se irrita, não guarda rancor.
Não se alegra com a injustiça, mas se rejubila com a verdade.
Tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.
O amor jamais acabará." (I Coríntios 13, 4-8)

AGRADECIMENTOS

Sobretudo à **Deus** por me dar a vida e todos os meios para nela prosseguir, sempre me guiando e sustentando.

Aos meus pais **Murilo Jarbas Alvim Bruno** e **Tânia Maria Firmino Bruno**, que com o dom incansável do amor e muita dedicação me educam e me acompanham desde os primeiros passos. Vocês são motivo de orgulho para mim, fonte de luz e inspiração para a busca de caminhos melhores.

A toda minha família pelo amor, compreensão, incentivo, e alegria.

Ao Professor Doutor **Carlos Estrela** pelo exemplo legado como mestre e ser humano, pela contribuição valiosa dada à minha formação, pela oportunidade concedida e pela grande ajuda na condução deste trabalho.

À Professora Doutora **Aline Carvalho Batista**, minha sincera gratidão pela paciência, pela confiança em mim depositada, pela motivação e dedicação constantes em toda caminhada. Sem sua ajuda esse trabalho não seria possível.

À Professora Doutora **Ana Helena Gonçalves de Alencar**, por ter me dado a oportunidade de ingressar, estudar e me dedicar à minha tão sonhada carreira de docência.

À Professora Doutora **Tarcília Aparecida Silva**, pela presteza e pelas sábias orientações na realização deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPQ) pelo suporte financeiro concedido à viabilização deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, na pessoa do Digníssimo Diretor Professor Doutor **Gersinei Carlos de Freitas.**

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás, na pessoa do Digníssimo Professor Doutor **Celmo Celeno Porto**.

A todos os professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela gentil acolhida, pela agradável convivência e pelos sábios ensinamentos que muito contribuíram para minha formação.

Às minhas queridas amigas **Adriana Lustosa Pereira**, **Cristiane Bonanato Estrela** e **Denise Ramos S. Alves**, pela lealdade, compreensão e ajuda constantes.

Aos amigos e colaboradores **Júlio de Almeida Silva**, **Fernanda Freire Maia** e **Monique Gonzaga Silva Valente**, pela disponibilidade e dedicação dispensadas à realização deste trabalho.

Ao colega **Erildo Ribeiro da Silva** pela presteza e excelente suporte técnico na condução deste trabalho.

A todos aqueles que contribuíram para realização desse sonho, muito obrigada!

SUMÁRIO

Lista de Tabelas ix

Lista de Figuras x

Siglas e Abreviaturas xi

Resumo xii

Abstract xiv

1. Caracterização do Problema 1

2. Objetivos 6

3. Material e Métodos 7

4. Publicações 13

5. Considerações Finais 36

6. Referências 40

7. Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa 44

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 46

Anexo 3 - Soluções e etapas da técnica de Hematoxilina e Eosina 50

Anexo 4 - Soluções e etapas da técnica de Imunoistoquímica 52

Anexo 5 - Normas de publicação do Journal of Endodontics 56

Anexo 6 - Artigo publicado 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos e protocolos das reações de imunoistoquímica

Tabela 2 - Caracterização microscópica das pulpites dentárias humanas (n=38)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Polpa dentária com intenso infiltrado inflamatório e levemente colagenizada (A-C) e polpa dentária com escasso infiltrado inflamatório e intensa colagenização (D-F). Presença de vasos sanguíneos preservados, dilatados e congestos (B e E - seta) e calcificações (C e F - seta). Hematoxilina e Eosina. Aumento original: A,D, x 100; B,C,E,F, x 400.

Figura 2 - Vasos sanguíneos $CD31^+$ (coloração marrom) distribuídos em polpa dentária com intenso infiltrado inflamatório e levemente colagenizada (A) e em polpa dentária com escasso infiltrado inflamatório e intensa colagenização (B). Coloração de imunoistoquímica. Aumento original: A e B, x 400.

Figura 3 - Imunocoloração representativa de mastócitos (A), células T regulatórias $foxp3^+$ (B), células $CD4^+$ (C), células $CD45RO^+$ (D), células $CD68^+$ (E) e células $CD20^+$ (F) distribuídas nas polpas dentárias inflamadas. Coloração de imunoistoquímica. Aumento original: A-F, x 400.

Figura 4 - Densidade das células $CD4^+$, $CD45RO^+$, $CD68^+$ e $CD20^+$ por mm^2 nos grupos de pulpites com intenso infiltrado inflamatório e levemente colagenizadas (G1) e de pulpites com escasso infiltrado inflamatório e intensa colagenização (G2). Resultados expressos como média e desvio padrão de células/mm^2. O Teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar grupos a um nível de significância de 0.05. (*) Diferença significativa na densidade de células $CD68^+$ quando comparados G1 e G2.

SIGLAS E ABREVIATURAS

APCs – antigen-presenting cells (células apresentadoras de antígenos)

MHC class II – major histocompatibility complex class II (complexo maior de histocompatibilidade classe II)

T reg – T regulatory (T regulatória)

CTLA-4 – cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (linfócito T citotóxico antígeno-4)

Foxp3 – forkhead transcription factor (fator transcricional)

PVT – pulp vitality test (teste de vitalidade pulpar)

SD – standard deviation (desvio padrão)

IL – interleukin (interleucina)

TNF-α – tumor necrosis factor alpha (fator de necrose tumoral alfa)

INF-γ – interferon-gamma (interferon gama)

CCL2/MCP-1 – monocyte chemotactic protein-1 (proteína-1 quimiotática para monócito)

CCL20/MIP-3α - macrophage inflammatory protein 3-alpha (proteína inflamatória de macrófago-3-alfa)

FGFb – basic fibroblastic growth factor (fator de crescimento fibroblástico básico)

VEGF – vascular endothelial growth factor (fator de crescimento endotelial vascular)

TGF-β – transforming growth factor (fator de crescimento transformador beta)

TB – toluidine blue (azul de toluidina)

RESUMO

Introdução: Células imune-inflamatórias podem contribuir para defesa do hospedeiro e alterações no microambiente durante a patogênese das pulpites dentárias. O presente estudo avaliou as características microscópicas e as densidades (por mm^2) de mastócitos triptase$^+$, linfócitos T *helper* CD4$^+$, linfócitos T de memória CD45RO$^+$, linfócitos T regulatórios foxp3$^+$, linfócitos B CD20$^+$, macrófagos CD68$^+$ e vasos sanguíneos CD31$^+$ em pulpites dentárias humanas (n = 38). **Métodos:** Expressões de triptase, CD4, CD45RO, foxp3, CD20, CD68 e CD31 foram analisadas por imunoistoquímica; outras características microscópicas, como a intensidade de infiltrado inflamatório e colagenização, foram avaliadas após a coloração com hematoxilina e eosina. **Resultados:** Dois padrões microscópicos distintos de pulpites dentárias foram observados: Grupo 1 (G1) (n=15) apresentou intenso infiltrado inflamatório e pouca colagenização; o Grupo 2 (G2) (n=23) apresentou escasso infiltrado inflamatório e intensa colagenização. Os números de células CD68$^+$ e CD20$^+$ bem como a densidade de vasos sanguíneos foram maiores no G1 comparadas ao G2. Entretanto, não houveram diferenças nas densidade celulares de CD4$^+$ e CD45RO$^+$ em ambos os grupos. Quando presentes, os mastócitos estiveram igualmente distribuídos em G1 e G2, enquanto as células foxp3$^+$ foram detectadas em 58.82% e 14.28% de G1 e G2, respectivamente. **Conclusões:** Tipos diferentes de infiltração celular imune-inflamatória foram identificados em pulpites dentárias humanas, as quais podem refletir padrões microscópicos distintos de respostas com capacidade particular de defesa local.

Palavras chave

Polpa dentária, pulpite dentária, células inflamatórias, células imunológicas, cárie.

ABSTRACT

Introduction: Immune and inflammatory cells may contribute to host defense and microenvironmental changes during the pathogenesis of dental pulpitis. This study evaluated the microscopic characteristics and densities (per mm^2) of tryptase$^+$ mast cells, CD4$^+$ T helper lymphocytes, CD45RO$^+$ memory T lymphocytes, foxp3$^+$ T regulatory lymphocytes, CD20$^+$ B lymphocytes, CD68$^+$ macrophages, and CD31$^+$ blood vessels in human dental pulpitis (n = 38). **Methods:** Tryptase, CD4, CD45RO, foxp3, CD20, CD68, and CD31 expressions were analyzed using immunohistochemistry; other microscopic features, such as intensity of inflammatory infiltrate and collagen deposition, were evaluated after staining with hematoxylin and eosin. **Results:** Two microscopic patterns of dental pulpitis were found: group 1 (G1) (n = 15) showed intense inflammatory infiltrate and mild collagen deposition; conversely, group 2 (G2) (n = 23) showed scarce inflammatory infiltrate and intense collagen deposition. The numbers of CD68$^+$ and CD20$^+$ cells and the density of blood vessels were higher in G1 than in G2. However, there were no differences in CD4$^+$ and CD45RO$^+$ cell densities between groups. When present, mast cells were equally distributed in G1 and G2, whereas foxp3$^+$ cells were detected in 58.82% and 14.28% of the samples of G1 and G2. **Conclusions:** Immune and inflammatory cell infiltration have different patterns in human dental pulpitis, which might reflect distinct microscopic characteristics and particular local defense capabilities.

Key Words

Dental pulp, dental pulpitis, inflammatory cells, immunological cells, caries.

1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

A polpa dentária pode ser definida como um tecido conjuntivo frouxo especializado, de origem mesenquimal, circundado por paredes de dentina, que ocupa a câmara pulpar e o canal radicular. Em sua periferia, apresenta os odontoblastos, responsáveis pela formação da matriz orgânica da dentina. Essa relação de interdependência de polpa e dentina faz com que esses tecidos sejam entendidos e reconhecidos como integrantes de um mesmo complexo dentinopulpar (Costa *et al*., 2009).

A cárie dentária tem sido descrita como o fator etiológico mais freqüente de alteração pulpar, capaz de desencadear na polpa, reações inflamatórias e imunológicas em resposta à penetração de produtos do metabolismo bacteriano (Bergenholtz, 1981; Izumi *et al*., 1995; Okiji *et al*., 1997; Nanci, 2003). Frente a essa agressão, a resposta inicial protetora pulpar envolve a obliteração ou esclerose dos túbulos dentinários e o depósito de dentina terciária ou reacional pelos odontoblastos (Nanci, 2003). Caso a agressão persista, havendo a entrada de bactérias cariogênicas ou de seus produtos tóxicos na polpa, ocorrerá uma resposta imunológica inata (resposta inflamatória) seguida por uma resposta imunológica adaptativa (resposta imunológica específica) (Bergenholtz, 1981; Abbas & Lichtman, 2003).

A resposta inflamatória consiste em um mecanismo de defesa inespecífico, imediato, que envolve fenômenos vásculo-exsudativos, com vasodilatação e aumento da permeabilidade, e proliferativos, com infiltração e proliferação de células inflamatórias, dentre elas, mastócitos, neutrófilos e macrófagos e (Bergenholtz, 1990; Izumi e*t al*., 1995; Avery, 2002; Abbas &

Lichtman, 2003). Os mastócitos liberam várias substâncias biologicamente ativas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, modulação das respostas inflamatória e imunológica e angiogênese (Holzer, 1988; Jontell *et al*., 1998; Rodini *et al*., 2004; Freitas *et al*., 2007). Esse último evento é extremamente importante nos processos de inflamação e reparo, em que a proteína de membrana CD31 representa um eficiente marcador vascular (Woodfin *et al*., 2007). Os macrófagos são células mononucleares responsáveis pela fagocitose, apresentação de antígeno e imunomodulação (Jontell *et al*., 1998; Abbas & Lichtman, 2003; Hahn & Liewehr, 2007), e contribuem ainda para o reparo pulpar por induzir a proliferação de fibroblastos (Brody *et al*., 1992) e neovascularização (Polverini, 1995).

A resposta imunológica consiste em outro mecanismo de defesa, mais específico, que ocorre após a resposta inflamatória. Essa reação é mais complexa e caracterizada pelo processamento, apresentação e reconhecimento antigênicos (Avery, 2002; Abbas & Lichtman, 2003). Na polpa dentária, células apresentadoras de antígenos (APCs) que expressam moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe II (MHC classe II), capturam proteínas antigênicas e apresentam fragmentos peptídicos à linfócitos T *helper* antígeno-específicos nos linfonodos. Os linfócitos T *helper* ativados ($CD4^+$) se multiplicam clonalmente, se diferenciam em células T de memória ($CD45RO^+$) (Jontell *et al*., 1998) e migram para o tecido pulpar através da circulação sanguínea ou linfática (Pimenta *et al*., 2003), onde APCs nativas passam a fagocitar e apresentar os antígenos diretamente à essas células T. Uma vez ativadas, células T $CD4^+$ desencadeiam uma resposta imunológica efetiva quando de uma nova

entrada do agente agressor na polpa. De acordo com o perfil de produção de citocinas, as células T $CD4^+/CD45RO^+$ podem estimular a migração e ativação de macrófagos, de outras células T $CD4^+$ e de linfócitos B ($CD20^+$) (Jontell *et al*., 1998; Abbas & Lichtman, 2003), sendo esses últimos produtores de anticorpos contra antígenos específicos (Abbas & Lichtman, 2003).

Outros subtipos de linfócitos T, denominados células T regulatórias (Treg) atuam na regulação da resposta imune-inflamatória através da secreção de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina 10 e fator de crescimento transformador β (TGF-β) (Abbas & Lichtman, 2003; Akbar *et al*., 2003; Chen *et al.,* 2003). Essas células são caracterizadas pela expressão constitutiva da proteína de transmembrana CD25 (cadeia alfa do receptor para interleucina-2), CTLA-4 (linfócito T citotóxico antígeno-4) e foxp3 (fator transcricional) (Akbar *et al.,* 2003; Chen *et al*., 2003; Zheng *et al*., 2007), sendo esse último o marcador mais específico das células Treg (Chen *et al.,* 2003; Zheng *et al*., 2007).

Assim, várias células participam do mecanismo de defesa pulpar e embora a frequência de patologias pulpares na clínica odontológica seja alta, poucos trabalhos descreveram seus perfis inflamatório e imunológico (Hahn *et al*., 1989; Izumi *et al*., 1995; Freitas *et al*., 2007).

Os tipos de linfócitos presentes em polpas normais e inflamadas foram investigados em estudo de Hanh *et al*. (1989). Essas polpas foram classificadas clinicamente em três categorias: polpas normais, polpas com diagnóstico clínico de inflamação reversível, polpas com diagnóstico clínico de inflamação irreversível e submetidas à técnica de imunoistoquímica para

identificação dos linfócitos T *helper*, linfócitos T citotóxicos e linfócitos B. Nas polpas normais, verificou-se a presença de todas as células estudadas, com predomínio dos linfócitos Tcitotóxicos. Nas polpas com inflamação reversível houve predomínio da população de linfócitos T. Já nas polpas com inflamação irreversível, tanto os linfócitos T quanto os linfócitos B, estiveram presentes em número aumentado. Diante dos resultados conclui-se que há uma interação dos linfócitos T e B na patogênese dos diversos estágios da doença pulpar.

Izumi *et al*. (1995) avaliaram, por meio de análise imunoistoquímica, a presença de neutrófilos, macrófagos, linfócitos T *helper* e linfócitos B em polpas de dentes humanos não cariados e cariados. Esses dentes foram distribuídos em sete grupos de acordo com a profundidade de cárie a partir do estágio 0 (dentes não cariados) até o estágio 6 (polpa exposta). Os resultados permitiram verificar um aumento de todos os grupos celulares analisados à medida que a cárie dentária progredia em profundidade; na fase inicial da resposta imunológica pulpar, observou-se uma resposta celular mediada por células T; já na fase mais avançada dessa resposta, observou-se uma resposta humoral mediada por células B, com a destruição do tecido pulpar por enzimas proteolíticas provavelmente liberadas dos neutrófilos e macrófagos. Os autores concluíram que a polpa dentária é equipada com um mecanismo biodefensivo eficaz, todavia com menor possibilidade de defesa frente à cáries profundas.

A presença de linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$), linfócitos T de memória ($CD45RO^+$), linfócitos T *helper* ($CD4^+$) e mastócitos foi avaliada pela técnica de imunoistoquímica também em polpas de dentes humanos saudáveis e

cariados (Freitas *et al.*; 2007). Quarenta amostras de polpas foram obtidas de dentes permanentes em diferentes condições clínicas: dentes não irrompidos, dentes parcialmente irrompidos sem cárie dentária, dentes irrompidos sem cárie dentária, dentes irrompidos com cárie incipiente e dentes com pulpite hiperplásica. Os resultados revelaram a presença de mastócitos somente nos pólipos pulpares; maiores quantidades de células $CD4^+$ e $CD8^+$ em polpas de dentes cariados; e um decréscimo significativo no número de linfócitos nos pólipos pulpares quando comparados aos demais grupos. Assim, os autores sugeriram que os mastócitos não contribuem para a resposta inflamatória vascular inicial da polpa dentária, embora estejam envolvidos na fase crônica da inflamação pulpar como nos pólipos pulpares. Em contrapartida, as células $CD4^+$ e $CD8^+$ participam principalmente da etapa inicial da resposta imunológica à cáries incipientes e parecem não contribuírem substancialmente para a resposta nos pólipos pulpares.

Diante do exposto, estudos prévios buscaram elucidar a patogênese da doença pulpar (Hahn *et al*., 1989; Izumi *et al*., 1995; Freitas *et al*., 2007). Todavia, a maioria das amostras estudadas não foram de pulpites e não identificaram algumas células imune-inflamatórias também essenciais no mecanismo de defesa pulpar. Portanto, se faz necessário, trabalhos realizados especificamente com pulpites que tragam informações fundamentadas da resposta imune-inflamatória com seus respectivos padrões celulares, a fim de permitir um conhecimento mais preciso e alternativas terapêuticas eficientes.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos avaliar as características microscópicas e as densidades (por mm^2) de mastócitos triptase$^+$, linfócitos T *helper* CD4$^+$, linfócitos T de memória CD45RO$^+$, linfócitos T regulatórios foxp3$^+$, linfócitos B CD20$^+$, macrófagos CD68$^+$ e vasos sanguíneos CD31$^+$ em pulpites dentárias humanas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de polpas dentárias

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (Anexo 1) e um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) foi obtido de todos os pacientes participantes da pesquisa.

Foram selecionados 38 dentes humanos (19 anteriores superiores e 19 molares superiores, cujas polpas foram removidas de suas raízes palatinas) com diagnóstico clínico de inflamação pulpar de pacientes provenientes da Disciplina de Urgência da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, os quais apresentaram idade média de 24 anos. O diagnóstico clínico de pulpite sintomática foi baseado nos seguintes critérios: presença de sintomatologia espontânea; resposta positiva ao teste de vitalidade pulpar à frio (gás refrigerante à - 50^{o}C - Roeko, Langenau, Alemanha) e ausência de exposição pulpar associada à cárie dentária. O exame radiográfico consistiu em um recurso diagnóstico importante para a indicação do tratamento endodôntico e foi realizado com posicionador de radiografia para adulto (Indusbelo, Londrina-PR) e filme radiográfico Insight (Kodak, Eastman - EUA), em um mesmo aparelho de radiografia, garantindo-se tensão e intensidade de correntes constantes. A análise das radiografias ocorreu em ambiente de luz indireta, em que máscaras especiais de papel cartão preto foram confeccionadas para permitir melhor visualização da radiografia no negatoscópio.

Cada dente selecionado foi isolado com dique de borracha e recebeu anti-sepsia com solução de hipoclorito de sódio a 1,0% (Probem, Catanduva,

SP). A abertura coronária foi realizada com broca esférica (KG Sorensen n. 1012, 1013) em alta rotação e abundante refrigeração. Após a realização da odontometria, o comprimento de trabalho foi definido à 1 mm aquém do vértice radiográfico. Utilizou-se uma lima do tipo Kerr de pequeno calibre (#10/#15) entre a parede do canal radicular e a polpa dentária, com intuito de abrir espaço e liberar o tecido pulpar, para que o mesmo fosse removido com lima do tipo Hedströem (Maillefer, Suíça) de calibre compatível com o canal radicular. O tecido pulpar removido foi colocado sobre papel cartolina autoclavado e dispensado em recipiente contendo formol a 10,0% tamponado, identificado com o número do paciente, para posterior processamento e análise microscópica no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás.

Após a pulpectomia, cada dente foi devidamente preparado e obturado em sessão única, segundo protocolo de tratamento endodôntico da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás.

Microscopia óptica

Em ambiente laboratorial, as amostras de polpas removidas foram examinadas para se verificar coloração, consistência, forma e tamanho. O processamento das mesmas foi realizado em aparelho histotécnico automatizado (OMA-DM20), onde foram desidratadas em bateria crescente de álcool, diafanizadas em xilol e imersas em parafina líquida, assumindo a forma de blocos.

Cortes seriados de 5,0μm de espessura foram obtidos de cada bloco, mediante a utilização de um micrótomo (Leica–RM2155), colocados sobre lâmina histológica e corados pela técnica de rotina Hematoxilina e Eosina - H.E. (Anexo 3), preconizada no protocolo técnico do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás. As lâminas foram montadas utilizando-se resina para montagem histológica Permount® e lamínulas 24x60.

A interpretação dos cortes teciduais foi realizada em microscópico trinocular (Axiostar Plus-Carl Zeiss), em que características microscópicas como intensidade do infiltrado inflamatório, colagenização, presença de calcificações e áreas de necrose foram avaliadas.

A intensidade do infiltrado inflamatório foi determinada para cada amostra de polpa dentária. Após análise de 10 campos representativos (x400) utilizando-se retículo de integração (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), as amostras apresentaram: a) ausência de inflamação, quando a maioria dos campos (> 7) não apresentaram células inflamatórias; b) inflamação leve, quando a maioria dos campos (> 7) apresentaram menos de 35% do espaço do retículo de integração preenchido por células inflamatórias; c) inflamação intensa, quando a maioria dos campos (> 7) apresentaram mais de 35% do espaço do retículo de integração preenchido por células inflamatórias. A colagenização também foi caracterizada em ausente, leve, ou intensa, levando-se em consideração os mesmos critérios adotados para o infiltrado inflamatório, só que tendo em vista o espaço preenchido no retículo de integração por fibras colágenas.

Imunoistoquímica

Cortes seriados de 3,0μm de espessura também foram obtidos de cada bloco, mediante a utilização de um micrótomo (Leica–RM2155), estendidos sobre lâminas de vidro silanizadas (DAKO, S3003, Glostrup-Denmark) e submetidos à Técnica de Imunoistoquímica (Anexo 4), preconizada no protocolo técnico do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás. Esses cortes foram desparafinados, desidratados, lavados com solução salina tamponada (PBS) e posteriormente mergulhados em tampão citrato (pH 6.0) por 20 minutos à 95^{o}C, com auxílio de Steammer Cuisine 700 HL-SPEED (T-FAL), para exposição antigênica.

Passado esse período, as lâminas foram novamente lavadas em PBS e incubadas em peróxido de hidrogênio a 3,0% (Merck) por 40 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena. Novas lavagens com PBS foram realizadas e as mesmas foram incubadas em soro albumina bovina (BSA) por 20 minutos, a fim de se obter o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas. Em seguida, as lâminas foram secas e incubadas com os anticorpos primários por 18 horas à 4^{o}C. Mastócitos, linfócitos T *helper*, linfócitos T de memória, linfócitos T regulatórios, linfócitos B, macrófagos e vasos sanguíneos foram identificados pelo uso de anticorpos anti-triptase, anti-CD4, anti-CD45RO, anti-foxp3, anti-CD20, anti-CD68 e anti-CD31, respectivamente (Tabela 1). Todas as diluições foram realizadas utilizando-se PBS associado a soro albumina bovina (PBS-BSA a 1,0%).

Após o período de 18 horas, lavagens consecutivas foram realizadas com PBS, para posteriormente os cortes serem tratados com o Sistema

Novolink (Novocastra, Newcastle, UK) ou Sistema LSAB®, HRP Peroxidase Kit (Tabela 1) (Dako, Carpinteria, CA, USA), e então, incubados em 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Dako) por 2 a 5 minutos. Finalmente, a reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina de Mayer, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas em água corrente por 10 minutos, as lâminas foram desidratadas em álcoois, passadas em xilol (3 vezes) e montadas com solução de resina não aquosa (Entellan-Mikroskopie-Merck).

Amostras de tonsilas foram utilizadas como controles positivos para todos os marcadores. Controles negativos das reações foram obtidos pela substituição dos anticorpos primários por PBS-BSA 1,0%, bem como por soro normal de coelho (DAKO, X0903-1, Glostrup-Denmark) ou de camundongo (DAKO, X0910-1, Glostrup-Denmark).

Histoquímica

A densidade de mastócitos também foi avaliada pela coloração de azul de toluidina. Cortes de 5 µm foram desparafinados e hidratados com água. A presente coloração foi realizada com solução de azul de toluidina a 1,0% diluída em fosfato tamponado (pH 4-6) por 45 segundos. Após lavagem em fosfato tamponado por um minuto, os cortes foram rapidamente desidratados por meio de álcool 70%, 96% e acetona e montados em resina sintética.

Análise quantitativa e qualitativa

O número de células triptase$^+$ de mastócitos, CD4$^+$, CD45RO$^+$, foxp3$^+$, CD20$^+$ e CD68$^+$ foi determinado nas pulpites dentárias humanas por meio de retículo de integração. Os vasos sanguíneos (CD31$^+$) que apresentaram lúmen vascular foram considerados, inclusive aqueles de tamanho reduzido (microvasos). Todas as células imune-inflamatórias e vasos sanguíneos foram quantificados em 5 à 10 campos consecutivos e representativos (x400) e nesse aumento, cada campo no retículo de integração correspondeu a uma área de 0.0961 mm^2. O local e distribuição dessas células e vasos também foram avaliados.

Análises descritivas foram expressas como média e desvio padrão de *n* observações por mm^2. Análise comparativa de todas as populações celulares acima citadas foi realizada pelo Teste de Wilcoxon. Análise comparativa entre grupos experimentais foi realizada com teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Esse teste também foi utilizado para avaliar a possível associação entre as células imune-inflamatórias e os achados microscópicos. O valor de p menor do que 0.05 foi considerado estatisticamente significante.

4. PUBLICAÇÕES

Artigo 1 - Inflammatory and Immunological Aspects of Human Dental Pulpitis

Autores - Bruno KF, Silva JA, Silva TA, Batista AC, Alencar AHG, Estrela C.

Revista - Journal of Endodontics (Submetido).

Inflammatory and Immunological Aspects of Human Dental Pulpitis

Kely Firmino Bruno, DDS, MSc,[1] Júlio Almeida Silva, DDS, MSc,[1] Tarcília Aparecida Silva, DDS, MSc, PhD,[2] Aline Carvalho Batista, DDS, MSc, PhD,[3] Ana Helena Gonçalves de Alencar, DDS, MSc, PhD,[4] and Carlos Estrela, DDS, MSc, PhD[5]

Running Title: Immunological aspects of dental pulpitis

[1] Graduate Student, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil;
[2] Department of Oral Surgery and Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil;
[3] Department of Stomatology (Oral Pathology), Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil;
[4] Professor of Endodontics, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil;
[5] Chairman and Professor of Endodontics, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.
Address requests for reprints to Professor Carlos Estrela, Department of Stomatologic Sciences, Federal University of Goiás, Praça Universitária s/n, Setor Universitário, CEP 74605-220, Goiânia, GO, Brazil. E-mail address: estrela3@terra.com.br.

Abstract

Introduction: Immune and inflammatory cells may contribute to host defense and microenvironmental changes during the pathogenesis of dental pulpitis. This study evaluated the microscopic characteristics and densities (per mm^2) of tryptase$^+$ mast cells, CD4$^+$ T helper lymphocytes, CD45RO$^+$ memory T lymphocytes, foxp3$^+$ T regulatory lymphocytes, CD20$^+$ B lymphocytes, CD68$^+$ macrophages, and CD31$^+$ blood vessels in human dental pulpitis (n = 38). **Methods:** Tryptase, CD4, CD45RO, foxp3, CD20, CD68, and CD31 expressions were analyzed using immunohistochemistry; other microscopic features, such as intensity of inflammatory infiltrate and collagen deposition, were evaluated after staining with hematoxylin and eosin. **Results:** Two microscopic patterns of dental pulpitis were found: group 1 (G1) (n = 15) showed intense inflammatory infiltrate and mild collagen deposition; conversely, group 2 (G2) (n = 23) showed scarce inflammatory infiltrate and intense collagen deposition. The numbers of CD68$^+$ and CD20$^+$ cells and the density of blood vessels were higher in G1 than in G2. However, there were no differences in CD4$^+$ and CD45RO$^+$ cell densities between groups. When present, mast cells were equally distributed in G1 and G2, whereas foxp3$^+$ cells were detected in 58.82% and 14.28% of the samples of G1 and G2. **Conclusions:** Immune and inflammatory cell infiltration have different patterns in human dental pulpitis, which might reflect distinct microscopic characteristics and particular local defense capabilities.

Key Words

Dental pulp, dental pulpitis, inflammatory cells, immunological cells, caries.

Introduction

Bacteria found in dental caries are the most frequent etiological agents of injury to the dental pulp. Inflammatory and immunologic reactions occur in response to microorganisms or their products, which penetrate into the pulp through the dentinal tubules (1–4).

The inflammatory response consists of inespecific and immediate defense mechanisms, which involve vascular-exudative phenomena, such as vasodilatation and increased permeability, as well infiltration and proliferation of inflammatory cells, such as mast cells, neutrophils and macrophages (2, 5–7). Mast cells release several biologically active substances responsible for the degradation of the extracellular matrix, modulation of inflammatory and immunologic responses, and angiogenesis (8–11). The latter is extremely important in inflammation and repair processes, in which membrane protein CD31 represents a reliable vascular marker (12). Macrophages are mononuclear cells responsible for phagocytosis, antigen presentation, and immunomodulation (5, 9, 13); they also contribute to pulp repair by inducing fibroblast proliferation (14) and neovascularization (15).

The immune response is a more specific defense mechanism that becomes active after the inflammatory response. Immune reactions are characterized by antigenic processing, presentation, and recognition (5, 6). In the dental pulp, antigen-presenting cells (APCs), which express major histocompatibility complex class II (MHC class II) molecules, capture antigenic proteins and present peptide fragments to antigen-specific helper T lymphocytes in lymphonodes. Activated T helper lymphocytes ($CD4^+$ T cells) rapidly multiply, create many clones, differentiate into memory T cells

(CD45RO$^+$ T cells) (9), and, through blood or lymphatic streams (16), migrate to the pulp tissue, where native APCs start phagocytosis and present the antigens directly to these T cells. Once activated, CD4$^+$ T cells trigger an effective immune response to any new entrance of the aggressor in the pulp. According to the cytokine production profile, CD4$^+$/CD45RO$^+$ T cells may stimulate the migration and activation of macrophages, other CD4$^+$ T cells, and CD20$^+$ B lymphocytes (5, 9), which produce antibodies against specific antigens (5).

Subsets of T lymphocytes, known as T regulatory (Treg) cells, play an important role in regulating the immune and inflammatory responses through anti-inflammatory cytokine secretion such as interleukin-10 and transforming growth factor β (TGF- β) (5, 17, 18). These cells are characterized by the constitutive expression of a transmembrane protein, the alpha chain of the receptor for interleukin-2 (CD25), the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4), and the forkhead transcription factor (Foxp3) (17–19). But, foxp3 expression may be the most specific marker of Treg cells (18, 19).

Despite the high frequency of dental pulpitis in endodontic clinics, few studies have described its inflammatory and immunologic profiles (1, 2, 9). Therefore, new studies should investigate the pathogenesis of pulpal disease so that more efficient therapies may be developed.

To understand the pathogenesis and microscopic characteristics of human dental pulpitis better, this study investigated the presence of several immune inflammatory cells (mast cells, T helper lymphocytes, memory T lymphocytes, regulatory T lymphocytes, B lymphocytes, and macrophages)

and their association with other microscopic findings, such as vascularization, intensity of inflammatory infiltrate and collagen deposition.

Materials and Methods

Dental pulp samples

This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Goiás, Brazil, and informed consent was obtained from all patients.

We randomly selected 38 human teeth (19 anterior superior and 19 superior molars, whose pulps were removed from their palatal roots) with a clinical diagnosis of inflamed pulp from patients (mean age, 24 years; 20 men) treated at the Dental Urgency Service of the School of Dentistry of the Federal University of Goiás, Brazil. The clinical diagnosis of irreversible pulpitis was based on the following criteria: spontaneous symptomatology; positive response to pulp vitality test (PVT; tetrafluoroethane spray); absence of pulp exposure associated with dental carie.

After the clinical diagnosis of irreversible pulpitis, the patients were referred to a specialist for root canal treatment. The first step was pulpectomy, according to the following guidelines: anesthesia, absolute isolation, antisepsis of the operative field with 1% sodium hypochlorite, and coronary opening on the buccal surface of the tooth using a diamond tipped spherical bur at high speed and under water-air cooling. The working length was set at 1 mm from the apex according to periapical radiographs. A small diameter K-file (#10/#15) was introduced between the root canal wall and the dental pulp to open some space and release the tissue, and then the dental

pulp was carefully excised with a Hedströem file. After pulpectomy, root canal preparation and filling were performed in the same appointment.

The pulp tissues were immersed in 10% buffered formalin for further evaluation using light microscopy in the Oral Pathology Laboratory of the Federal University of Goiás, Brazil.

Light microscopy

All the pulp tissue specimens were fixed in 10% buffered formalin (pH 7.4) and embedded in paraffin blocks. Microscopic features, such as intensity of the inflammatory infiltrate, collagen deposition, calcification, and necrotic areas, were evaluated using a 5-µm section of each sample stained with hematoxylin and eosin (H.E.).

The intensity of the associated inflammatory infiltrate (absent, mild or intense) was determined for each dental pulp specimen. After analyzing 10 representative microscopic high-power fields (400X magnification) using a graticule (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), specimens were classified according to inflammation: a) no inflammation, when most fields (> 7) had no inflammatory cells; b) mild inflammation, when most fields (> 7) had less than 35% of the graticule space filled by inflammatory cells; c) intense inflammation, when most fields (> 7) had more than 35% of the graticule space filled by inflammatory cells. Collagen deposition was also classified as absent, mild or intense using the same criteria adopted for the inflammatory infiltrate but evaluating the space filled by collagen fibers in the graticule.

Immunohistochemistry

Sections of 3 µm from routinely-processed paraffin-embedded blocks were deparaffinized and dehydrated. Endogenous peroxidase was blocked

by incubation with 3% hydrogen peroxide. The sections were immersed in citrate buffer (pH 6.0) for 20 minutes at 95° C for antigen retrieval. Sections were then blocked by incubation with 3% normal goat serum for 20 minutes. Mast cells, T helper lymphocytes, memory T lymphocytes, regulatory T lymphocytes, B lymphocytes, macrophages, and blood vessels were detected using anti-tryptase, anti-CD4, anti-CD45RO, anti-foxp3, anti-CD20, anti-CD68, and anti-CD31 antibodies (Table 1). The slides were then incubated with the primary antibodies for 18 h at 4º C. After washing in TBS, the sections were treated with the Novolink System (Novocastra, Newcastle, UK) or the LSAB®+system, HRP Peroxidase Kit (Dako, Carpinteria, CA, USA) (Table 1), and then incubated in 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Dako) for 2 to 5 min. Finally, the sections were stained with Mayer's hematoxylin and covered. Samples of tonsil tissue were used as positive controls for all markers. Negative controls were obtained by omitting primary antibodies and using 1% PBS-BSA and non-immune rabbit (X0902, Dako) or mouse (X501-1, Dako) serum.

Histochemistry

Mast cells density was also evaluated using toluidine blue (TB). Sections of 5 µm were deparaffinized and hydrated with water. TB staining was performed with a 1% TB solution diluted in phosphate buffer (pH 4-6) for 45 seconds. After rising in phosphate buffer for one minute, sections were quickly dehydrated through 70%, 96% ethanol and acetone p.a. to xylene and mounted in synthetic resin.

Quantitative and qualitative analysis

The numbers of tryptase$^+$ mast cells, CD4$^+$, CD45RO$^+$, foxp3$^+$, CD20$^+$, and CD68$^+$ cells in the human dental pulps were calculated using the graticule. All CD31$^+$ blood vessels with a vascular lumen were counted, even if they were very small (microvessels). All immune inflammatory cells and blood vessels were counted in 5-10 representative and consecutive microscopic high-power fields (400X magnification); at this magnification, each field of the graticule had an area of 0.0961 mm^2. The location and distribution of cells and blood vessels were also analyzed. Descriptive analyses were expressed as mean ± standard deviation (SD) of *n* observations per mm^2. The Wilcoxon test was used to compare all cell populations, and the non-parametric Mann-Whitney test, for comparisons between experimental groups. A p value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

The microscopic features of the samples analyzed revealed two distinct patterns of pulpitis: dental pulp with intense inflammatory infiltrate and mild collagen deposition (n = 15) (Group 1 - G1) (Fig. 1A-C); and dental pulp with scarce inflammatory infiltrate and intense collagen deposition (n = 23) (Group 2 - G2) (Fig. 1D-F). No samples had necrotic areas, 89.5% had areas of calcification, and all had preserved blood vessels (Fig. 1-2). The main microscopic features of the samples are summarized in Table 2. Although two distinct patterns of pulpitis were found using microscopy, both G1 and G2 specimens had the same clinical characteristics (spontaneous

symptomatology; positive response to pulp vitality test; absence of pulp exposure associated with dental carie).

The immune inflammatory cells evaluated were diffusely distributed throughout the pulp tissue in all samples (n = 38). Mast cells (Fig. 3A) were found in 23.6% of the samples at a low density (mean = 6.62 cells/mm^2). We did not identify mast cells in these samples using TB staining. Similarly, $foxp3^+$ T regulatory cells (Fig. 3B) were found in 34.21% of the samples at densities ranging from 1.14 to 27.05 cells/mm^2 (mean = 10.49 cells/mm^2). Results also showed that, in all samples, there were lower densities of T helper lymphocytes ($CD4^+$ cells) (Fig. 3C) and memory T lymphocytes ($CD45RO^+$ cells) (Fig. 3D) than of macrophages ($CD68^+$ cells) (Fig. 3E) and B lymphocytes ($CD20^+$ cells) (Fig. 3F) (Wilcoxon, $p < 0.05$ for all comparisons).

The number of $CD68^+$ cells per mm^2 was significantly higher in G1 than in G2 (Mann-Whitney, $p = 0.004$) (Fig. 4). Similarly, the density of $CD20^+$ cells was higher in G1 than in G2, although this difference was not statistically significant (Mann-Whitney, $p = 0.068$). A similar number of $CD4^+$ and $CD45RO^+$ cells was found in both G1 and G2 (Mann-Whitney, $p>0.05$) (Fig. 4). When present, mast cells were equally distributed in G1 and G2. However, $foxp3^+$ cells were found in 58.82% and 14.28% of the samples of G1 (n = 10) and G2 (n = 3). Findings also revealed a higher number of $foxp3^+$ cells in G1 (mean = 13.67 cells/mm^2) than in G2 (mean = 6.18 cells/mm^2). The number of $CD31^+$ blood vessels was significantly higher in G1 than in G2 (Mann-Whitney, $p = 0.002$) (Fig. 2).

No association was found between immune and inflammatory cells and microscopic findings (vascularization, intensity of inflammatory infiltrate, collagen deposition) (Mann-Whitney, $p>0.05$).

Discussion

The microscopic evaluation of dental pulpitis revealed different patterns of response: dental pulp with intense inflammatory infiltrate and mild collagen deposition; and pulp with scarce inflammatory infiltrate and intense collagen deposition. However, these two distinct response patterns seen microscopically were not clinically confirmed, an indication of the difficulties to establish associations between histopathological and clinical events, a finding corroborated by other studies (20, 21). The correlation between symptoms and histopathological changes in pulpitis seems to be poor, and the determination of the type and extent of the inflammatory changes on the basis of symptoms is inaccurate (20). Surprisingly, even dental pulps with a high grade of collagen deposition and areas of calcification had a positive response to PVT in this study.

The presence of mast cells in the inflamed pulp, especially during the chronic phase of inflammation, has been reported in the literature (22, 23). Mast cells do not seem to contribute only to the early vascular or specific immune responses in the initial dental pulp pathosis, but are also involved in chronic phases of pulp inflammation, such as in pulp polyps (10).

In relation to the staining techniques for mast cells, both TB and Immunohistochemistry identification techniques reliably identify mast cells granules; although recent studies (24, 25) showed that the

Immunohistochemistry method is more specific than metachromatic staining by TB.

Most inflamed pulps had no mast cells, and, when present, their number was small, which is in agreement with previous studies that reported small populations or no mast cells in non-inflamed pulps, as well as in early pulpitis (10, 22). This reduced population of mast cells in pulpitis may interfere with the pulpal defense mechanism, because they are immunoregulatory cells that release vasoactive amines, enzymes, and cytokines, such as tumor necrosis factor α (TNF-α). Conversely, the absence of mast cells might be interpreted as a form of modulation of the inflammatory response of the pulp, which minimizes increases in tissue pressure and prevents tissue necrosis. Massive mast cell degranulation in dental pulp would result in a significant increase of inflammatory cell recruitment and vasodilatation, and, consequently, high intrapulpal pressure and extensive tissue destruction (26).

Small numbers of foxp3 positive cells were found in most samples, a highly important finding because, to our knowledge, this is the first study to detect these cells in inflamed pulp. Interestingly, high amounts of $foxp3^+$ cells were found in pulps with intense inflammatory infiltrate (G1), which may indicate that they affect immunity control (27) and may prevent exacerbated inflammation and fast necrosis of pulpal tissue. Also, $foxp3^+$ regulatory T lymphocytes may suppress T cells (27) and, consequently, reduce their number, which was suggested by the lower numbers of both T $CD4^+$ and $CD45RO^+$ cells than of $CD68^+$ and $CD20^+$ cells in all the samples analyzed.

Nevertheless, the role that Treg cells play in the pathogenesis of pulpitis should be further explored.

The higher number of B cells ($CD20^+$) than of T cells in dental pulpitis suggests a humoral response mediated by antibodies. Other studies also found an increased number of B cells in irreversible pulpitis (6, 13). After the activation of T cells by APCs, T cells secrete cytokines and differentiate into several effector cells: $CD4^+$ T helper, $CD8^+$ cytotoxic, Treg, and $CD45RO^+$ memory T. The nature of the responses of these effector cells depends on the dose, affinity, and nature of the antigen, as well as on the type and concentration of cytokines in the tissue. According to current knowledge, an increase in the dose of antigenic peptide leads to changes in the $CD4^+$ cell response pattern of cytokine production (13). $CD4^+$ Th1 cells produce interleukin 2 (IL-2) and interferon-gamma (IFN-γ) predominantly, which play a role in the recruitment and activation of macrophages, whereas Th2 cells produce IL-4, IL-5, and IL-6, which stimulate B lymphocyte proliferation, differentiation, and activation (5, 9). As the process of dental caries approaches the pulp, there is a change from a Th1 to a Th2-type response pattern, which leads to an increase in the number of B cells. Consequently, when there is pulpal inflammation, cell immunity may be associated with shallow caries, and humoral immunity, to deep caries (9, 13). In line with this, caries and predominance of B cells ($CD20^+$) were found in all samples analyzed.

There are high numbers of macrophages ($CD68^+$) in pulpitis; in fact, they are the most prevalent immune cells in the dental pulp (9) and their number is likely to increase with the progression of caries (13). The presence

of these cells in deep caries may be associated with the expression of chemokine ligands, such as monocyte chemotactic protein-1 (CCL2/MCP-1) and macrophage inflammatory protein 3-alpha (CCL20/MIP-3α) (13, 28). Also, macrophages play an important role in tissue homeostasis and repair after inflammation, as they stimulate fibroblast proliferation by releasing basic fibroblast growth factor (FGFb) (13, 14), as well as in revascularization, because they release vascular endothelial growth factor (VEGF) (13, 15, 29, 30). FGFb leads to an increase of collagen fiber production, which was also confirmed in our study because collagen deposition was found at varying degrees in both groups.

The blood vessels of all the samples examined were preserved. The highest density of $CD31^+$ was seen in pulps with high numbers of inflammatory cells (G1), as well as increased numbers of macrophages, cells that are responsible for the production of VEGF, a potent factor that induces angiogenesis and vascular permeability (13). The increased number of vessels may contribute to the reparative response of the pulp-dentin complex due to the augmented transport of inflammatory cells, nutrients, and oxygen to the site of inflammation (12, 15).

Recent advances in immunology have disclosed the enormous complexity of the immune regulatory system. The dental pulp is equipped to mount an innate and adaptive immune response to caries, which involves several types of cells and inflammatory mediators (13). Knowledge of the pathogenesis of pulp disease may help to develop more efficient therapies.

Our results revealed different immune and inflammatory cell infiltration patterns in human dental pulpitis, which might reflect distinct microscopic characteristics and particular local defense capabilities.

References

1. Bergenholtz G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. J Endod 1981;7:100-4.
2. 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;40:609-14.
3. Okiji T, Jontell M, Belichenko P, Dahlgren U, Bergenholtz G, Dahlström A. Structural and functional association between substance P and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves and accessory cells in the rat dental pulp. J Dent Res 1997;76:1818-24.
4. Nanci A. Ten Cate's oral histology: Development, structure and function, 6th ed. St Louis: Mosby; 2003.
5. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology, 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2003.
6. Avery JK. Oral development and histology, 3rd ed. New York: Thieme; 2002.
7. Bergenholtz G. Pathogenic mechanisms in pulpal disease. J Endod 1990;16:98-101.
8. Holzer P. Local effector function of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: Involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. Neuroscience 1988;24:739-68.
9. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. Crit Rev Oral Biol Med 1998;9:179-200.
10. Freitas P, Novaretti CP, Rodini CO, Batista AC, Lara VS. Mast cells and lymphocyte subsets in pulps from healthy and carious human teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007;103:95-102.
11. Rodini CO, Batista AC, Lara VS. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and

periapical cysts: Possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004;97:59-63.

12. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007;27:2514-23.
13. Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. J Endod 2007;33:773-81.
14. Brody AR, Bonner JC, Overby LH. Interstitial pulmonary macrophages produce platelet-derived growth factor that stimulates rat lung fibroblast proliferation in vitro. J Leukoc Biol 1992;51:640-8.
15. Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. Crit Rev Oral Biol 1995;6:230-47.
16. Pimenta FJ, Sá AR, Gomez RS. Lymphangiogenesis in human dental pulp. Int Endod J 2003;12:853-6.
17. Akbar AN, Taams LS, Salmon M, Vukmanovic-Stejic M. The peripheral generation of $CD4^+$ $CD25^+$ regulatory T cells. Immunology 2003;109:319-25.
18. Chen W, Jin W, Hardegen N. Conversion of peripheral $CD4^+CD25^+$ naive T cells to $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells by TGF-β induction of transcription factor *Foxp3*. J Exp Med 2003;198:1875-86.
19. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. Nat Immunol 2007;8:457-62.
20. 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;16:969-77.
21. Närhi MVO. Dentinal and pulpal pain. In: Bergenholtz G, Hørsted-Bindslev P, Reit C. Textbook of Endodontology. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2003. p. 43-56.
22. Farnoush A. Mast cells in human dental pulp. J Endod 1984;10:250-2.
23. Walsh LJ, Davis MF, Xu LJ, Savage NW. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. J Oral Pathol Med 1995;24:266-72.

24. Batista AC, Rodini CO, Lara VS. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. Oral Dis 2005;4:249-54.
25. Oliveira-Neto HH, Leite AF, Costa NL, Alencar RC, Lara VS, Silva TA, Leles CR, Mendonça EF, Batista AC. Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: Possible failure in the migration of these cells. Oral Oncol 2007;43:484-90.
26. Walsh LJ. Mast cells and oral inflammation. Crit Rev Oral Biol Med 2003;14:188-98.
27. Lehner T. Special regulatory T cell review: The resurgence of the concept of contrasuppression in immunoregulation. Immunology 2008;123:40-4.
28. 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;31:84-7.
29. Mattuella LG, Figueiredo JAP, Nör JE, Araújo FB, Fossati ACM. Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in the pulp of human primary and young permanent teeth. J Endod 2007;33:1408-12.
30. Mattuella LG, Bento LW, Figueredo JAP, Nör JE, Araújo FB, Fossati ACM. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. J Endod 2007;33:524-30.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Nacional Council for Scientific and Technological Development (CNPQ grants 401305/2005-8 to T.A.S and 471878/2006-5 to A.C.B.). We thank Erildo Ribeiro da Silva (Laboratory of Oral Pathology, Federal University of Goiás, Brazil) for his excellent technical support.

TABLE 1. Antibodies and protocols of immunohistochemical reactions

Antibodies (clone)	Dilution	Antigen retrieval	Secondary antibody
Anti-Tryptase[1] (AA1)	1:2000	No exposure	Kit-LSAB[1]
Anti-CD4[2] (4B12)	1:100	EDTA buffer (pH=9.0 for 30 min at 95ºC)	Kit-Novolink[2]
Anti-CD45RO[2] (UCHL1)	1:300	Citrate buffer (pH=6.0 for 30 min at 95ºC)	Kit-Novolink[2]
Anti-foxp3[3] (236A/E7)	1:400	Citrate buffer (pH=6.0 for 30 min at 95ºC)	Kit-LSAB[1]
Anti-CD20[1] (L26)	1:2000	Citrate buffer (pH=6.0 for 45 min at 95ºC)	Kit-LSAB[1]
Anti-CD68[2] (KP1)	1:1000	Citrate buffer (pH=6.0 for 45 min at 95ºC)	Kit-LSAB[1]
Anti-CD31[2] (1A10)	1:200	Citrate buffer (pH=6.0 for 30 min at 95ºC)	Kit-Novolink[2]

[1]Dako (Carpinteria, CA, USA).
[2]Novocastra (New Castle, UK).
[3]Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

TABLE 2. Microscopic characterization of human dental pulpitis (n = 38)

Microscopic feature		Number of cases	%
Inflammatory infiltrate	Absent	0	-
	Mild	23	60.5
	Intense	15	39,5
Collagen deposition	Absent	0	-
	Mild	15	39.5
	Intense	23	60,5
Calcification	Absent	4	10.5
	Mild	16	42.1
	Intense	18	47,4
Necrotic areas	Absent	38	100.0
	Present	0	-
Density of $CD31^+$ blood vessels	Low (≤ 144)	23	60.5
(mean: 144 blood vessels/mm^2)	High (> 144)	15	39.5

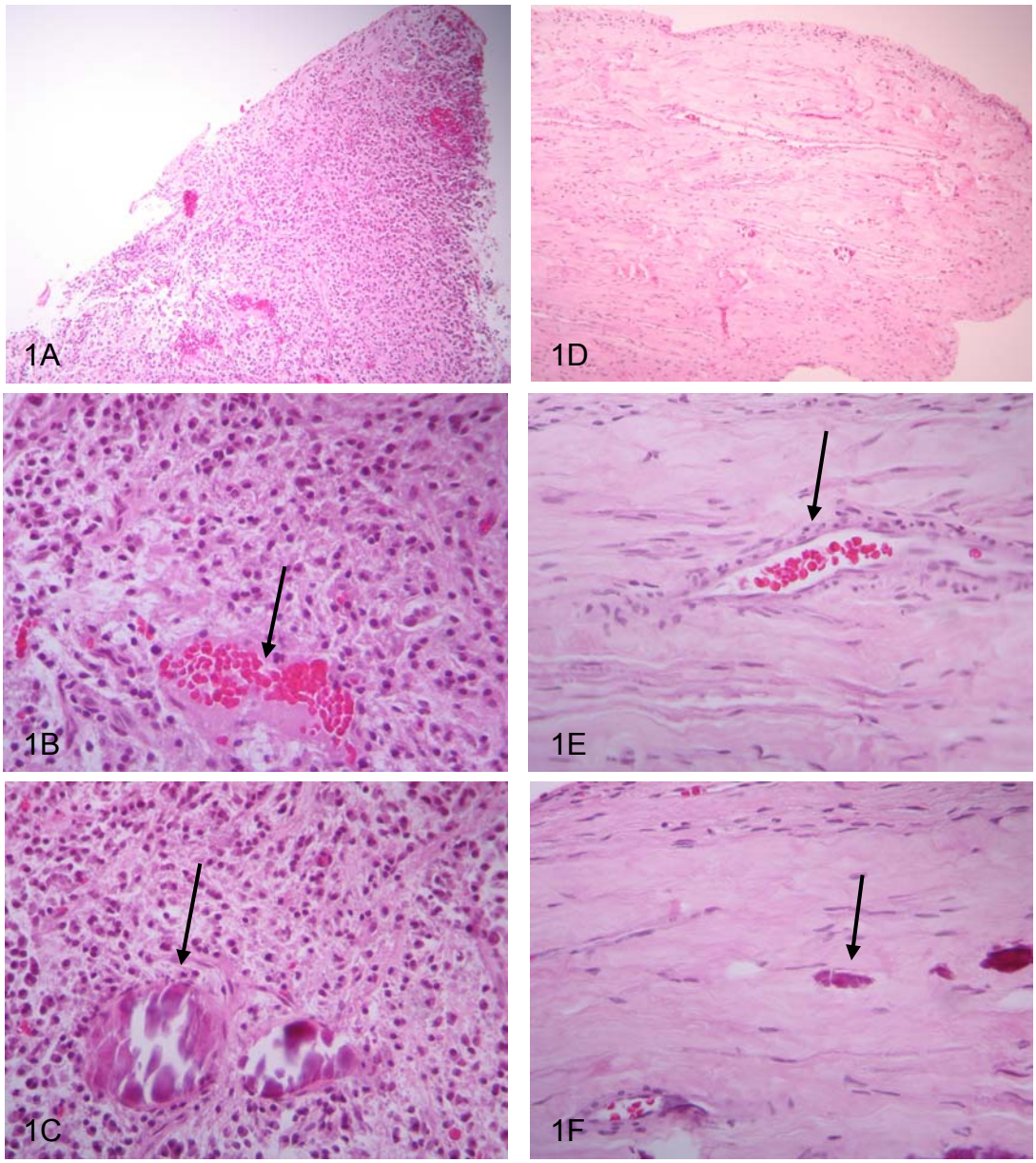

Figure 1. Dental pulp with intense inflammatory infiltrate and mild collagen deposition (A-C) and dental pulp with scarce inflammatory infiltrate and intense collagen deposition (D-F). Preserved, dilated and congested blood vessels (B and E - arrow) and calcifications (C and F - arrow). Hematoxylin and Eosin. Original Magnification: A,D, x 100; B,C,E,F, x 400.

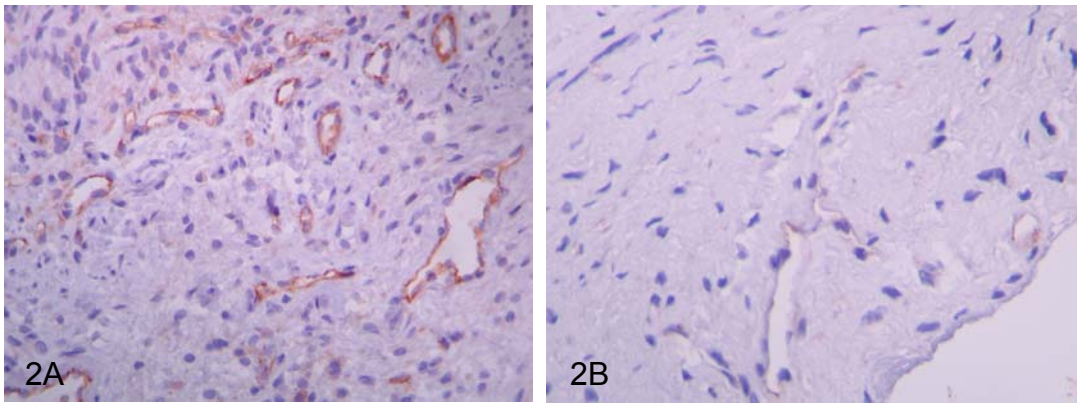

Figure 2. $CD31^+$ blood vessels (brown stain) distributed in dental pulp with intense inflammatory infiltrate and mild collagen deposition (A) and in dental pulp with scarce inflammatory infiltrate and intense collagen deposition (B). Immunohistochemical staining. Original magnification: A and B, x 400.

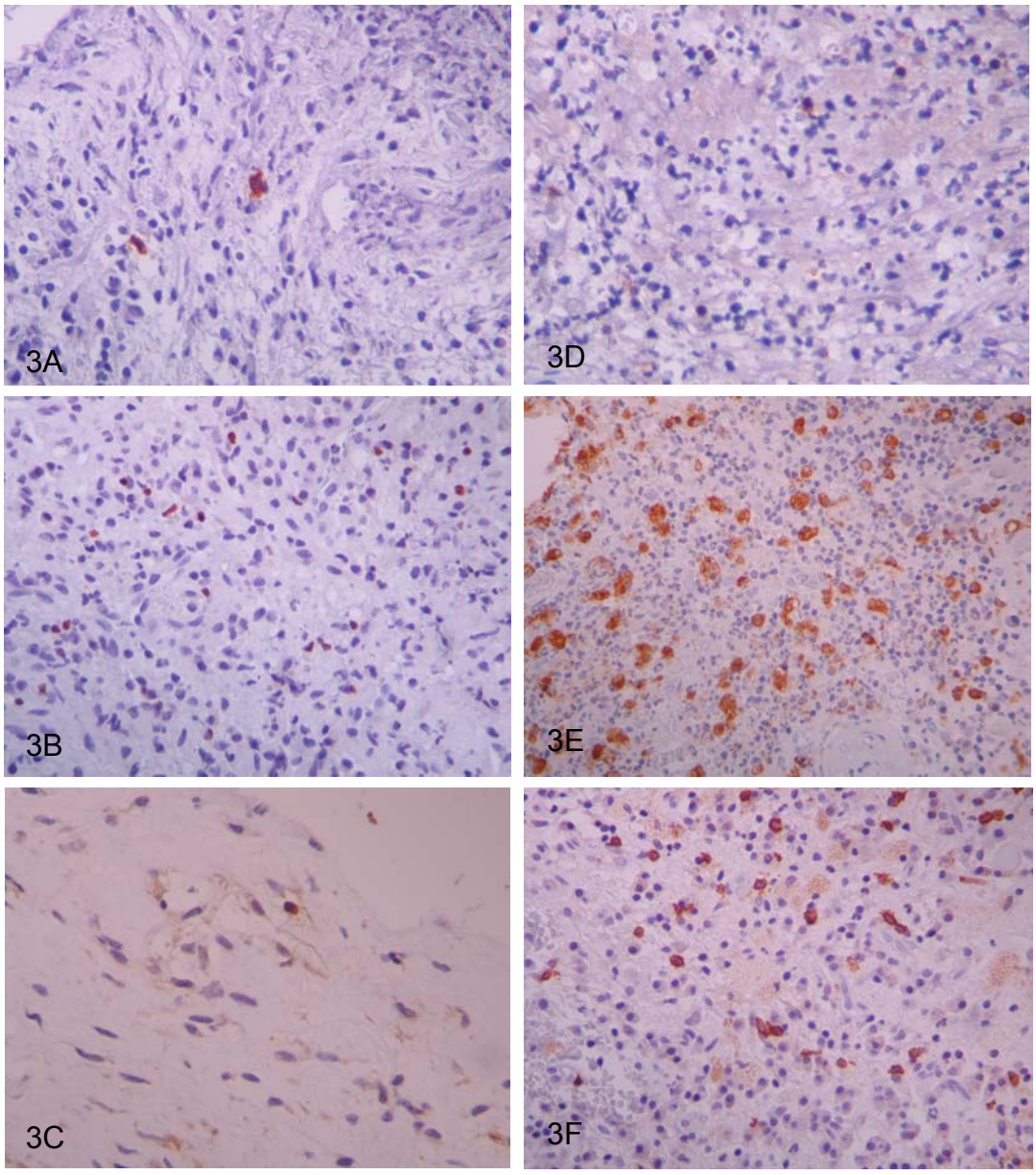

Figure 3. Representative immunostaining of triptase mast cells^{+} (A), foxp3^{+} T regulatory cells (B), CD4^{+} cells (C), CD45RO^{+} cells (D), CD68^{+} cells (E) and CD20^{+} cells (F) distributed in inflamed dental pulp. Immunohistochemical staining. Original magnification: A-F, x 400.

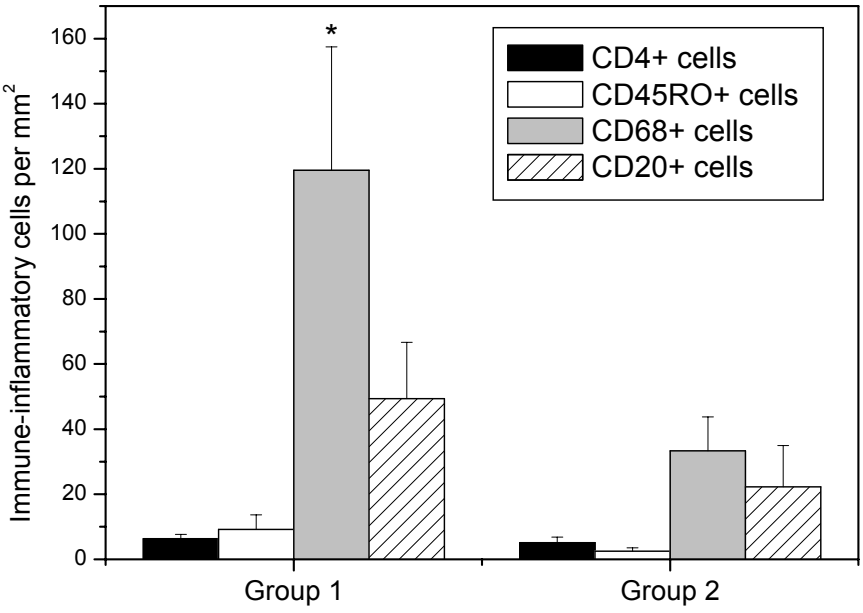

Figure 4. Density of $CD4^+$, $CD45RO^+$, $CD68^+$, and $CD20^+$ cells/mm^2 in G1 (dental pulp with intense inflammatory infiltrate and mild collagen deposition) and G2 (dental pulp with scarce inflammatory infiltrate and intense collagen deposition). Results are expressed as mean of positive cells/mm^2 ± SD. The Mann-Whitney test was used to compare groups at a level of significance set at 0.05. (*) Significant difference in $CD68^+$ cell density in comparison of G1 with G2.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os dentes avaliados apresentaram sintomatologia espontânea, resposta positiva ao teste de vitalidade pulpar à frio e ausência de exposição pulpar associada à cárie. Embora esses dentes apresentassem as mesmas características clínicas, microscopicamente pôde-se observar dois padrões distintos de pulpites: polpas com infiltrado inflamatório intenso e leve colagenização (Grupo 1 – G1) e polpas com escasso infiltrado inflamatório e intensa colagenização (Grupo 2 – G2), o que denota a dificuldade de estabelecer correlação entre eventos histopatológicos e clínicos (Seltzer *et al.,* 1963; Närhi, 2003). Em nenhuma das amostras foi verificada área de necrose, 89,5% delas apresentaram calcificações e todas mostraram vasos sanguíneos preservados.

As células imune-inflamatórias avaliadas estiveram difusamente distribuídas pelo tecido pulpar de todas as amostras. Os mastócitos estiveram ausentes na maioria delas e quando presentes (23,6%) mostraram-se igualmente distribuídos em G1 e G2, sendo detectados em baixa densidade (média de 6.62 cells/mm^2). Esses achados estão de acordo com estudos prévios que reportaram pequenas populações ou ausência de mastócitos em polpas sadias e com inflamação em estágio inicial (Farnoush, 1984; Freitas *et al.*, 2007). O número reduzido dessas células em pulpites pode interferir com o mecanismo de defesa pulpar, uma vez que os mastócitos são células imunorregulatórias. Por outro lado, a ausência dessas células pode ser interpretada como uma forma de modulação da resposta inflamatória pulpar, por minimizar o aumento da pressão tecidual e prevenir a necrose do tecido (Walsh *et al*., 1995; Walsh, 2003).

Em relação às técnicas de coloração para identificação de mastócitos, ambas azul de toluidina e imunoistoquímica podem ser realizadas, embora estudos recentes têm demonstrado que o último método é mais específico para essa identificação (Batista *et al*., 2005; Oliveira-Neto *et al*., 2007). No presente estudo, a coloração de azul de toluidina não identificou os mastócitos, os quais foram somente visualizados pela técnica de imunoistoquímica.

As células T regulatórias foxp3^{+} foram verificadas em 34,21% das amostras, também em baixa densidade (média de 10.49 cells/mm^{2}). Esse fato é de extrema importância, uma vez que o presente estudo é pioneiro na identificação dessas células em polpas inflamadas. Observou-se maiores quantidades de células foxp3^{+} no G1, indicando o efeito das mesmas no controle da imunidade (Lehner, 2008), capaz de prevenir a inflamação exacerbada e a rápida necrose do tecido pulpar. Ainda, essas células podem causar um efeito supressor nas células T (Lehner, 2008), levando à diminuição das mesmas. Menores quantidades de células T CD4^{+} e CD45RO^{+} quando comparadas às células CD68^{+} e CD20^{+} foram identificadas em todas as amostras analisadas.

O maior número de células B (CD20^{+}) em relação às células T nas pulpites dentárias avaliadas, aponta para uma resposta pulpar humoral mediada por anticorpos, corroborando com outros estudos (Avery, 2002; Hahn & Liewehr, 2007). Tal fato pode ser explicado uma vez que à medida que o processo de cárie aproxima-se da polpa, ocorre uma mudança no padrão de resposta de células T CD4^{+} Th1 para Th2. Essas últimas produzem interleucinas 4, 5 e 6, responsáveis pela proliferação,

diferenciação e ativação de células B (Jontell *et al.,* 1998; Abbas & Lichtman, 2003). Assim, na presença de inflamação pulpar, a imunidade celular estaria associada a cáries rasas e a imunidade humoral a cáries profundas (Jontell *et al.,* 1998; Hahn & Liewehr, 2007), dado verificado no presente estudo em que todos os dentes apresentaram cáries e predomínio de células B ($CD20^+$).

Os macrófagos ($CD68^+$) também foram encontrados em número aumentado nas pulpites analisadas, sendo as células imunológicas mais prevalentes na polpa dentária (Jontell *et al.,* 1998) e sua quantidade tende a aumentar com a progressão da cárie dentária (Hahn & Liewehr, 2007). Essas células são responsáveis pela fagocitose, apresentação antigênica e imunomodulação (Jontell *et al.,* 1998; Abbas & Lichtman, 2003; Hahn & Liewehr, 2007), e contribuem ainda para o reparo pós-inflamação, por estimular a proliferação de fibroblastos pela liberação do fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb) (Brody *et al*., 1992; Hahn & Liewehr, 2007), bem como a revascularização pela liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Polverini, 1995; Hahn & Liewehr, 2007; Mattuella *et al*., 2007a,b). O FGFb é capaz de promover o aumento na produção de fibras colágenas, o que foi verificado no presente estudo em que ambos os grupos apresentaram colagenização em maior ou menor grau.

Todas as amostras analisadas apresentaram vasos sanguíneos preservados, sendo a maior densidade de células $CD31^+$ verificada no G1. Esse grupo também mostrou quantidade aumentada de macrófagos, os quais são responsáveis pela produção de VEGF, um potente indutor de angiogênese e permeabilidade vascular (Hahn & Liewehr, 2007).

Recentes avanços na biologia celular e molecular têm demonstrado a enorme complexidade do sistema de defesa pulpar, que compreende diversas células e mediadores inflamatórios (Hahn & Liewehr, 2007). Entende-se atualmente que várias doenças são resultados da ação defeituosa de moléculas, proteínas em sua grande maioria, as quais têm sido progressivamente identificadas por meio do desenvolvimento da técnica de imunoistoquímica, dentre outras. O conhecimento preciso e fundamentado das respostas inflamatória e imunológica de polpas humanas de dentes permanentes se faz oportuno por prover num futuro próximo, terapias mais efetivas.

O presente estudo revelou diferentes tipos de infiltração celular imune-inflamatória em pulpites dentárias humanas, as quais podem refletir padrões microscópicos distintos de respostas com capacidade particular de defesa local.

Nesse contexto, abre-se oportunidade para a realização de novas pesquisas, visto a patogênese da doença pulpar ser complexa e permitir ser estudada em diferentes estágios microscópicos, nas diversas situações clínicas, com a atuação de outras células imune-inflamatórias e suas quimiocinas.

6. REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology, 5th ed. Philadelphia: Saunders, 2003.
2. Akbar AN, Taams LS, Salmon M, Vukmanovic-Stejic M. The peripheral generation of $CD4^+$ $CD25^+$ regulatory T cells. Immunology 2003;109:319-25.
3. Avery JK. Oral development and histology, 3rd ed. New York: Thieme; 2002.
4. Batista AC, Rodini CO, Lara VS. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. Oral Dis 2005;4:249-54.
5. Bergenholtz G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. J Endod 1981;7:100-4.
6. Bergenholtz G. Pathogenic mechanisms in pulpal disease. J Endod 1990;16:98-101.
7. Brody AR, Bonner JC, Overby LH. Interstitial pulmonary macrophages produce platelet-derived growth factor that stimulates rat lung fibroblast proliferation in vitro. J Leukoc Biol 1992;51:640-8.
8. Chen W, Jin W, Hardegen N. Conversion of peripheral $CD4^+CD25^+$ naive T cells to $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells by TGF-β induction of transcription factor *Foxp3*. J Exp Med 2003;198:1875-86.
9. Costa CAS, Figueredo JAP, Hebling J, Estrela C. Pulp Biology. In: Estrela C. Endodontic Science. 2nd ed. São Paulo: Artes Médicas, 2009.p.1-22.
10. Farnoush A. Mast cells in human dental pulp. J Endod 1984;10:250-2.
11. Freitas P, Novaretti CP, Rodini CO, Batista AC, Lara VS. Mast cells and lymphocyte subsets in pulps from healthy and carious human teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007;103:95-102.
12. Hahn CL, Falkler WA, Siegel MA. A study of T and B cells in pulpal pathosis. J Endod 1989;5:20-6.

13. Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. J Endod 2007;33:773-81.
14. Holzer P. Local effector function of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: Involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. Neuroscience 1988;24:739-68.
15. 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;40:609-14.
16. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. Crit Rev Oral Biol Med 1998;9:179-200.
17. Lehner T. Special regulatory T cell review: The resurgence of the concept of contrasuppression in immunoregulation. Immunology 2008;123:40-4.
18. Mattuella LG, Bento LW, Figueredo JAP, Nör JE, Araújo FB, Fossati ACM. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. J Endod 2007;33:524-30.
19. Mattuella LG, Figueiredo JAP, Nör JE, Araújo FB, Fossati ACM. Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in the pulp of human primary and young permanent teeth. J Endod 2007;33:1408-12.
20. Nanci A. Ten Cate's oral histology: Development, structure and function, 6th ed. St Louis: Mosby; 2003.
21. Närhi MVO. Dentinal and pulpal pain. In: Bergenholtz G, Hørsted-Bindslev P, Reit C. Textbook of endodontology. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2003. p. 43-56.
22. Okiji T, Jontell M, Belichenko P, Dahlgren U, Bergenholtz G, Dahlström A. Structural and functional association between substance P- and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves and accessory cells in the rat dental pulp. J Dent Res 1997;76:1818-24.
23. Oliveira-Neto HH, Leite AF, Costa NL, Alencar RC, Lara VS, Silva TA, Leles CR, Mendonça EF, Batista AC. Decrease in mast cells in oral

squamous cell carcinoma: Possible failure in the migration of these cells. Oral Oncol 2007;43:484-90.

24. Pimenta FJ, Sá AR, Gomez RS. Lymphangiogenesis in human dental pulp. Int Endod J 2003;12:853-6.

25. Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. Crit Rev Oral Biol 1995;6:230-47.

26. Rodini CO, Batista AC, Lara VS. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: Possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004;97:59-63.

27. 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;16:969-77.

28. Walsh LJ, Davis MF, Xu LJ, Savage NW. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. J Oral Pathol Med 1995;24:266-72.

29. Walsh LJ. Mast cells and oral inflammation. Crit Rev Oral Biol Med 2003;14:188-98.

30. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007;27:2514-23.

31. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. Nat Immunol 2007;8:457-62

7. ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UFG

PROTOCOLO Nº 102/2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO

I – Identificação:

- Título do projeto: Análise das respostas inflamatória e imunológica de polpas humanas de dentes permanentes.
- Pesquisador Responsável: Kely Firmino Bruno.
- Instituição onde será realizado: Faculdade de Odontologia- Universidade Federal de Goiás
- Data de apresentação ao COEP: 28/09/07

II – Objetivos: Geral: Analisar as respostas inflamatória e imunológica de polpas humanas de dentes permanentes com diagnóstica clínico de inflamação pulpar e correlacionar dados clínicos e radiográficos com achados microscópicos.

III – Sumário do projeto:

- Descrição e caracterização da amostra: Serão selecionadas 30 polpas de dentes permanentes com diagnóstico clínico de inflamação pulpar distribuídas em 3 grupos conforme a seguinte classificação:
- -Pulpalgia hiper-reativa: dente com cavidade fechada, sintomatologia provocada e resposta positiva aos testes de sensibilidade pulpar;
- -Pulpite sintomática: dente com cavidade fechada, sintomatologia espontânea e resposta positiva aos testes de sensibilidade pulpar;
- Pulpite assintomática: dente com cavidade aberta(hiperplasia ou ulceração pulpar), sintomatologia provocada e resposta pouco efetiva aos testes de sensibilidade pulpar.
- Para compor o grupo controle de polpas normais, serão selecionadas 10 polpas de premolares hígidos extraídos por finalidade ortodôntica.
- Critérios de inclusão e exclusão: Não foram claramente descritos;
- Adequação da metodologia: a metodologia compreende a coleta dos tecidos pulpares e seu processamento laboratorial, sendo preparadas para rotina de hematoxilina e eosina e técnica de imunoistoquímicarealização. A interpretação dos cortes teciduais corados pela técnica de H.E. será realizada com a utilização de microscópio trinocular para observação de possíveis alterações morfológicas e dos processos inflamatórios nas polpas dentárias. Nos cortes submetidos à técnica de Imunoistoquímica, será realizada a análise quantitativa das células inflamatórias e das células mastócitos-triptase-positivos, $CD4^+$, $CD450^+$, $CD20^+$ e $CD68^+$.

- Adequação das condições: As condições citadas no projeto são adequadas para desenvolvimento do trabalho.

IV – Comentários do relator frente à Resolução CNS 196/96 e complementares em particular sobre:

- Estrutura do protocolo: Encontra-se incompleta necessitando também de alguns esclarecimentos. Dentro da descrição da amostra deve ser explicado e descrito não somente os critérios de inclusão e exclusão, mas como também a seleção de polpas com diagnóstico de pulpalgia hiper-reativa, uma vez que são descritos elementos do diagnóstico condizentes com um quadro de reversibilidade. Faltam ainda os seguintes documentos: explicitação de critérios para suspender ou encerrar a pesquisa; declaração que os resultados da pesquisa serão tornados públicos sejam eles favoráveis ou não; declaração da inexistência de qualquer cláusula restritiva quanto a divulgação pública dos resultados; explicitação das responsabilidades do pesquisador, da instituição. Estes itens devem constar no projeto de pesquisa. O tamanho da amostra descrito na folha de rosto do CONEP deve ser retificado para 40, uma vez que corresponde ao total de polpas que serão analisadas. Assim, deve ser refeita esta folha de rosto.
- Ausência do termo de compromisso dos participantes da pesquisa e da instituição de cumprir os termos da resolução 196/96.
- Estrutura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: demonstra-se inadequado e com ausência de vários itens como: resumo do projeto em linguagem acessível, justificativa, objetivos, desconforto e riscos previsíveis, benefícios esperados, etc... Deve ser refeito conforme orientações/modelo disponíveis no site do CEP/UFG. Deve haver um esclarecimento ao sujeito quanto à condição clínica do dente quanto a real necessidade do tratamento endodôntico. O item 6.3 das orientações de preenchimento de protocolo de pesquisa do CEP/UFG deve ser considerado e contemplado no TCLE.
- Forma de obtenção do Termo de Consentimento: não foi descrita. Deve ser incluída no texto
- Privacidade e confidencialidade: descritos de forma adequada.

V – Parecer do COEP:

Face ao atendimento das Pendências no prazo determinado pelo CEP-UFG, o parecer final, S.M.J., é de Aprovado. Encaminhar o relatório final até 12\2008.

VI – Data da reunião: 11/02/2008

Assinatura do relator:

Assinatura do Coordenador/COEP:

Rita Goreti Amaral
Coordenadora do CEP/PRPPG/UFG

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás pelo telefone 3521 - 1075 ou 3521 - 1076.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Análise das respostas inflamatória e imunológica de polpas humanas de dentes permanentes.

Pesquisador (a) responsável: Kely Firmino Bruno.

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): 3229 - 1627.

Pesquisadores participantes: Ana Helena Gonçalves de Alencar, Carlos Estrela, Aline de Carvalho Batista.

Telefones para contato: 3209 - 6065, 3209 - 6051, 3209 – 6058.

- O presente projeto de pesquisa pretende analisar as respostas inflamatória e imunológica de polpas humanas de dentes permanentes com diagnóstico clínico de inflamação pulpar e correlacionar dados clínicos e radiográficos com achados microscópicos. Para tal, serão selecionados 30 pacientes que apresentem dentes com quadro de inflamação pulpar, em que a única indicação para tratamento é o endodôntico. Durante a realização do mesmo, serão removidas as polpas desses dentes e enviadas para processamento e exame

microscópico. Os pacientes receberão o mesmo atendimento preconizado para os demais atendidos na Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, com finalização e acompanhamento do tratamento endodôntico previsto.

- Os pacientes selecionados para este estudo serão aqueles atendidos nas clínicas de Endodontia e Urgência da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, portanto, já com a necessidade e diagnóstico previamente estabelecidos para realização de tratamento endodôntico. A coleta só será realizada nesses pacientes, mediante tratamento proposto como protocolo de rotina dessas clínicas, descartando assim, qualquer risco de intervenção desnecessária. Ainda, essa coleta não trará nenhuma alteração ou prejuízo nos procedimentos a serem realizados no paciente, visto que em todo tratamento endodôntico se faz necessária a remoção do tecido pulpar, a diferença é que no presente estudo, esse tecido será enviado para análise.
- Com essa pesquisa, espera-se continuar mantendo atendimento endodôntico de qualidade à população, ao mesmo tempo que busca-se um melhor conhecimento da histofisiologia e histopatologia pulpar, para num futuro próximo, poder aprimorar e estender ainda mais esse serviço.
- O período de participação nessa pesquisa refere-se apenas ao primeiro dia de atendimento, em que será coletada a polpa dentária, dando-se continuidade ao tratamento endodôntico, em que o término previsto não excederá 3 meses.

- A pesquisa será realizada sem conter qualquer indicador da identidade do participante, garantindo plenamente o sigilo quanto a sua privacidade. Não haverá qualquer tipo de constrangimento ou coação para o preenchimento deste termo de consentimento, sendo dada total liberdade de recusar a participar do grupo a qualquer tempo, sem que seja penalizado de ou tenha interrupção de seu tratamento e acompanhamento.

Nome e assinatura do pesquisador:

_____

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu,_____

RG:_____, CPF: _____, nº do prontuário: _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo "Análise das respostas inflamatória e imunológica de polpas humanas de dentes permanentes", como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Kely Firmino Bruno sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento / assistência / tratamento.

Local e data:_____

Nome e assinatura do sujeito ou responsável: _____

Presenciamos a solicitação do consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (não ligada à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____