

ANA CRISTINA GERENT PETRY NUNES

Pesquisa de subpopulações de linfócitos T  
em lesões perirradiculares de dentes  
decíduos humanos.

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da  
Universidade Federal de Santa Catarina, como  
requisito para obtenção do Título de Doutor em  
Odontologia, Área de Concentração Odontopediatria.*

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria José de Carvalho Rocha

Florianópolis

2007

ANA CRISTINA GERENT PETRY NUNES

**Pesquisa de subpopulações de linfócitos T em lesões  
perirradiculares de dentes decíduos humanos.**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de Doutor em Odontologia -  
área de concentração Odontopediatria e aprovada em sua forma final pelo  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC.

Florianópolis, 19 de julho de 2007

Prof. Dr. Ricardo de Souza Vieira  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria José de Carvalho Rocha  
Orientadora

---

Prof. Dr. José Hermênio Cavalcante Lima Filho  
Membro

---

Prof. Dr. José Vitor Nogara Borges de Menezes  
Membro

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elena Riet Correa Rivero  
Membro

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michele da Silva Bolan  
Membro

*A Deus,*

*Sempre presente em minha vida.*

*Só prossigo porque tu permites*

*Dias e noites se passaram*

*Para obter esta conquista, mas não é linha de chegada*

*É sim um ponto de partida*

*Para novos caminhos e aventuras*

*Na ciência que pesquisar*

*É ultrapassar limites...*

*Ao meu amor Daniel,*

*Obrigada pela presença serena*

*Amor que suporta cansaço*

*E noites mal dormidas*

*Amor que revela ser maior*

*Nas pequenas atitudes que auxiliam e incentivam*

*Em ir adiante e não desistir*

*Amor que é felicidade quando o outro é feliz,*

*Te amo!*

*Ao meu filho Rodrigo,*

*Você chegou de mansinho  
 Foi crescendo em mim aos pouquinhos,  
 Como se pedisse licença...  
 Gravidez tranquila, com parto de cinema  
 Nenhuma dor, só amor  
 Amor conquistado a cada dia  
 Com seu sorriso e carinho,*

*Te amo meu filho!*

*Aos meus pais,  
Ivete e José Mauro*

*Obrigada pelo dom da vida  
Pela infância saudável  
Por crescer em um lar repleto de amor  
Incentivado aos estudos e respeito ao próximo  
Aprendendo a valorizar desde cedo  
Que o mais importante na vida é Ser e não Ter  
E que conhecimento não ocupa espaço,  
Só aguça o paladar para a fome de sempre querer saber mais...*

*Amo vocês!*

*A minha orientadora Maria,*

*Porque ensinar pode ir além da sala de aula...*

*E mais do que ser excelente mestre*

*Dedicou seu tempo e compartilhou conhecimento*

*Esses momentos de cumplicidade*

*Sempre ficarão registrados em minha memória*

*Pois encontrei uma grande pessoa,*

*E mais do que isso*

*Uma fiel amiga!*

*Obrigada por tudo Maria!*

## **AGRADECIMENTOS**

As minhas irmãs, **Dani e Patrícia**

Que sabem das dificuldades de concluir uma Pós-Graduação, mas nunca duvidaram desta minha realização e sempre acreditaram no meu potencial.

Amo vocês!

A minha sogra **Teresinha** e cunhada **Magali**,

Que se fizeram presentes na minha jornada multiplicando as atenções ao meu filho Rodrigo.

Aos Professores do curso de Odontopediatria,

Prof. Dra. **Isabel Cristina Santos Almeida**, Prof. Dra. **Joecí de Oliveira**, Prof. Dra. **Maria José de Carvalho Rocha**, Prof. Dra. **Vera Lúcia Bosco**, psicóloga **Rosamaria Areal**, e em especial ao Prof. Dr. **Ricardo de Souza Vieira**, como Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC. Muito obrigada pela dedicação e ensinamentos compartilhados.

A minha amiga Dra. **Mabel Mariela Cordeiro**,

Mesmo na distância se faz presente, com sua presteza em conseguir artigos e com seu exemplo de sempre seguir adiante. Ela sabe que eu sou sua fã!

À colega do Programa de Atendimento ao Paciente com Dente Traumatizado,

Dra. **Mariane Cardoso**, por ser companheira e dividir sonhos com sabor de odontopediatria.

Às amigas, **Thaís, Renata, Karin, Catherine** pela amizade conquistada e pelas trocas de idéias que indiretamente nos faz crescer nos torna pessoas melhores.

Em especial a **Michele**,

Soube ser mais que amiga, e comigo compartilhou sua linha de pesquisa, sabendo auxiliar em diversos momentos, entres esses, incluíram sessões de laboratório para fotografar as lâminas... Muito obrigada amiga!



Aos amigos da Equipe de Nossa Senhora da Paz,

**Carmen Raquel, James, Cássia, Eduardo, Dani, Fábio, Mona, Rafa e Pe. André** que acompanharam esta caminhada e compartilham comigo mais esta conquista.

Às amigas do coração,

**Cami, Carol, Luzinha e Mirelle** por que saber apreciar a estrada é fundamental, por isso nossos encontros sempre são divertidos!

Às funcionárias da Disciplina de Odontopediatria,

**Beth e Ivalda**, sempre atenciosas e com um sorriso no rosto, estavam prontas para ajudar em todos os momentos.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC,

**Ana Maria Frandolozo**, disponível e hábil proporcionou agilidade em questões burocráticas.

Ao setor de Patologia do Hospital Beneficência Portuguesa, São Paulo,

Em especial ao Prof. Dr. **Roberto** e Sr. **Eliézio**, com quem desde o primeiro contato se propuseram a colaborar e agilizar a metodologia utilizada nesta pesquisa. Muito obrigada!

Ao curso de agronomia da UFSC,

Em especial ao Prof. Dr. **Miguel Pedro Guerra** e a funcionária **Luisa**, por cederem a utilização do fotomicroscópio para realização de parte desta pesquisa.

Ao laboratório Santa Luzia,

Em nome da Bioquímica **Márcia Roberge**, que permitiu a utilização do microscópio e do graticulo nesta pesquisa.

Ao setor de Patologia do Hospital Universitário,

**Gabriella, Cláudia e Daniele** sempre prontas a tentar solucionar minhas dúvidas.

NUNES, Ana Cristina Gerent Petry. **Pesquisa de subpopulações de linfócitos T em lesões perirradiculares de dentes decíduos humanos.** 2007. 71f. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de Concentração Odontopediatria) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi observar a presença de linfócitos T CD3, CD4 e CD8 em lesões perirradiculares de 10 molares decíduos, extraídos de pacientes com média de 7 anos e 6 meses de idade. A marcação imuno-histoquímica das células CD3, CD4 e CD8 foi realizada pela técnica complexo Avidina-biotina-peroxidase (ABC) / Estreptavidina-biotina-peroxidase (EstreptABC), utilizando anticorpos específicos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 para as subpopulações de linfócitos T. As células foram quantificadas através da análise microscópica dos cortes histológicos com auxílio do graticulo de Muller. Os resultados revelaram que a porcentagem média de células positivas foi de 6,6% para CD3, 2,2% para CD8 e 0,05% para CD4. As amostras estavam relacionadas com lesões crônicas com o predomínio de LT CD8. Assim, conclui-se que em lesão periapical de dentes decíduos há a presença de células da imunidade específica, caracterizando a necessidade de viabilizar precocemente uma conduta mais adequada para minimizar danos para saúde do paciente infantil.

NUNES, Ana Cristina Gerent Petry. *Human T cells subpopulations in periradicular lesions of deciduous teeth*. 2007. 71f. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de Concentração Odontopediatria) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

### **ABSTRACT**

The study aimed to detect the presence of CD3, CD4 and CD8 T cell in periradicular lesions of 10 deciduous molar teeth, extracted from 7 year old average patients. The immunohistochemistry marking of CD3, CD4 and CD8 cells was carried out by the technique complex Avidin-biotin-peroxidase (ABC)/streptoavidin-biotin-peroxidase (EstreptABC), using specific antibodies anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD8 for T cells subpopulations. The cells had been quantified through microscopic analysis of histological sections. The results disclosed that the average percentage of positive cells was of 6.6% for CD3, 2.2% for CD8 and 0.05% for CD4. The samples were related with chronic lesions with the predominance of CD8 T cells. In conclusion in deciduous teeth with periapical lesion the presence of cells of the specific immunity were found, therefore it is vital to precociously enable a more adjusted clinical performance to minimize health damages of the infant patients.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>13</b>
1.1 Linfócito T – LT CD3 .....	15
1.2 Linfócito T auxiliar – LT CD4 .....	16
1.3 Linfócito T citotóxico – LT CD8 .....	18
1.4 Linfócito T regulador – Treg .....	20
1.5 Reflexos da infecção dentária sobre a saúde infantil .....	21
<b>2. ARTIGO.....</b>	<b>27</b>
2.1 Versão em Português .....	27
2.2 Versão em Inglês .....	45
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL<sup>1</sup>

A capacidade de defesa dos seres vivos frente aos agentes patogênicos é denominada imunidade, traduzida pela interação coordenada de células e moléculas visando eliminar o agente agressor (Siqueira, Dantas, 2000; Abbas, Lichtman, Pober, 1995).

Inicialmente, a pele e a mucosa, bem como suas secreções, constituem a primeira barreira contra o agente patogênico. Quando a homeostasia local for alterada, será ativada a imunidade natural ou inata de forma inespecífica (Jamenson, 2002). Células como os fagócitos (macrófagos e neutrófilos), células *natural killer* e moléculas do sistema complemento tentarão eliminar e desintegrar o agente agressor. Se estes eventos que ocorrem localmente não forem suficientes para combater o agente agressor, a resposta imune específica ou adquirida é ativada (Gorczynski, Stanley, 2001; Takahashi, 1998). As respostas inata e adquirida atuam simultaneamente (Stites, Terr, Parslow, 1997).

As células do sistema imunológico responsáveis pela especificidade da resposta imune são os linfócitos T e B. Os linfócitos B sofrem maturação na medula óssea e são responsáveis pela produção de anticorpos. Os linfócitos T têm origem na medula óssea e migram para o timo para maturarem e depois são liberados na circulação sanguínea e linfática (Stites, Terr, Parslow, 1997; Abbas, Lichtman, Pober, 1995; Carneiro-Sampaio, Grumach, 1992).

---

<sup>1</sup> Tese formatada de acordo com o Regimento do Programa de Pós-graduação em Odontologia - UFSC

A resposta imune adquirida aumenta os mecanismos protetores da imunidade inata, direcionando e focalizando a defesa para o local de penetração do antígeno, fazendo com que este seja apresentado de forma adequada para as células de defesa mais capacitadas para a eliminação do antígeno (Kiss, 2004).

A imunidade adquirida tem características de especificidade e memória, permitindo respostas mais intensas quando há estimulação persistente ou recorrente com o mesmo antígeno, como nos casos de infecções prolongadas ou de repetição. A diversidade da resposta imune específica é essencial para combater os inúmeros tipos de substâncias patogênicas presentes no ambiente. A capacidade de auto-regulação e a distinção entre o que é próprio do organismo e o que não é, faz com que a resposta imune seja auto-limitante e impede as reações contra as próprias células e tecidos do organismo. Assim, quando o antígeno é eliminado cessa o estímulo de ativação linfocitária (Abbas, Lichtman, Pober, 1995).

A célula apresentadora de antígeno possui moléculas que se ligam ao antígeno para apresentá-lo ao linfócito T auxiliar ou *helper* (Th), amplificando a resposta imune por meio de secreções de citocinas. As citocinas favorecem a proliferação, diferenciação e ativação de outras células como os linfócitos T citotóxicos, linfócitos B que estimulados se diferenciarão em plasmócitos secretores de imunoglobulinas, e monócitos que chegarão ao tecido, diferenciados em macrófagos, mais eficazes para destruir o antígeno intracelular (Abbas, Lichtman, Pober, 1995).

Durante o processo de fagocitose do agente patogênico, o macrófago libera dentre outras moléculas, a interleucina 1 (IL-1) que aciona o alarme do sistema imune. Esta citocina de fase aguda guia linfócitos Th até o local da inflamação, onde os macrófagos apresentam o antígeno, estimulando a expansão clonal dos linfócitos

Th e dos linfócitos B. A IL-1 é responsável pelo aumento da produção de prostaglandinas pelos leucócitos, que vai contribuir para a inflamação e dor. Além disso, a IL-1 estimula a síntese de proteínas de adesão leucocitária nos endotélios, facilitando a adesão dos leucócitos para realizar a diapedese, que é a passagem de leucócitos da luz do vaso sanguíneo para o meio tecidual em que se encontra o agente agressor (Gorczyński, Stanley, 2001).

### **1.1 Linfócito T – LT CD3**

Os linfócitos T possuem na sua membrana celular receptor de célula T  $\alpha\beta$  (TCR  $\alpha\beta$  – *T cell receptor*) e este complexo está associado a uma proteína chamada CD3. Anticorpos anti-CD3 reagem com 100% do linfócitos T periféricos do sangue ou linfonodos (Abbas, Lichtman, Pober, 1995).

De forma geral a maioria dos linfócitos T marcados pelo anticorpo anti-CD3 podem expressar outras moléculas de superfície como CD4 ou CD8, mas uma pequena parte pode estar relacionada a expressão negativa destes marcadores.

A interação entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos T acontece pela presença do TCR nas células T que conseguem identificar o antígeno e se organizar para tentar eliminá-lo (Stites, Terr, Parslow, 1997).

Assim, a presença de células marcadas pelo anticorpo anti-CD3 é indicado para avaliar a presença geral de células T relacionado à presença de células imunológicas no local do processo inflamatório. Pois, anticorpos anti-CD3 podem estimular uma população geral de linfócitos T, ao contrário de antígenos específicos para linfócitos T específicos (Abbas, Lichtman, Pober, 1995).

## 1.2 Linfócito T auxiliar – LT CD4

O linfócito T auxiliar ou *helper* possui na sua superfície celular receptor CD4. O termo CD (*cluster of differentiation*) significa grupo de diferenciação, onde uma molécula na superfície do linfócito é reconhecida por um grupo de anticorpos monoclonais, neste caso o marcador de superfície CD4 (Stites, Terr, Parslow, 1997).

O LT CD4 reconhece antígenos protéicos que se ligam a moléculas de classe II do complexo histocompatibilidade principal (MHC) nas superfícies de células apresentadoras de antígeno. As principais células apresentadoras de antígenos são as células dendríticas (Langerhans), macrófagos, linfócitos B (LB) e células endoteliais. Os LB expressam moléculas MHC classe II quando esta célula entra em contato com o antígeno. Este MHC é importante para a interação com os linfócitos, pois este complexo (MHC-II) liga fragmentos de proteínas estranhas para formarem complexos que pode ser reconhecido pelo LT auxiliar. O LT CD4 ajuda na maior ativação do sistema imune, com a produção de citocinas indutoras (Abbas, Lichtman, Pober, 1995).

As funções principais dos LT CD4 são estimular o crescimento e proliferação de LT citotóxicos contra o antígeno, estimular o crescimento e diferenciação dos LB em plasmócitos para produção de anticorpos, e ainda ativação dos macrófagos e auto-estimulação (Abbas, Lichtman, Pober, 1995).

Após o contato do antígeno com as células apresentadoras, estas ativadas, estimulam o LT CD4, que desencadeia reações do sistema imunológico contra o agente agressor. Após a expansão clonal de LT CD4, estimulada pela IL-1, os próprios LT irão secretar citocinas distintas, cada uma com uma função específica.



De acordo com esta difusão, são reconhecidos LT *helper* 1 (LTh1) e LT *helper* 2 (LTh2). O LTh1 produz entre outras citocinas, IL-2 e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) que estimulam principalmente a resposta imune celular. O LTh2 produz as IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que estimula produção de anticorpos pelos LB (resposta humoral). As citocinas liberadas por LTh1 bloqueiam atividade de LTh2 e vice-versa. O balanço entre a atividade de LTh1 e LTh2 pode direcionar para uma resposta imune celular ou resposta imune humoral (Stites, Terr, Parslow, 1997).

O linfócito B é uma célula de memória que se diferencia em plasmócito e produz imunoglobulinas, em um processo que se inicia tardiamente na resposta imune primária e é extremamente dependente de LTh2. O LTh1 induz linfócitos T citotóxicos de memória a se proliferar e secretar grande quantidade de citocinas após o estímulo antigênico, quando comparados a células virgens. Uma resposta imunológica eficiente está relacionada com proteção efetiva (Bourgeois, Tanchot, 2003).

Em modelos de infecção virais os LT CD4 são dispensáveis para a resposta imune primária, em que os LT citotóxicos atacam diretamente o antígeno, mas são absolutamente necessários para a geração de linfócitos de memória T CD8 (Schluns, Lefrancois, 2003).

Desta forma, os LT CD4 não têm a capacidade de destruir uma célula infectada ou fagocitar um antígeno diretamente, mas estão relacionados com a ativação e direcionamento de outras células do sistema imune para combater o agente agressor.

### 1.3 Linfócito T citotóxico – LT CD8

Os linfócitos T citotóxicos possuem receptores CD8, que tem a função de reconhecer antígenos protéicos que se ligam a moléculas MHC classe I nas superfícies de células-alvo. Todas as células nucleadas do organismo podem expressar moléculas MHC classe I, inferido que quando a célula realizar a síntese intracelular de um antígeno protéico ocorrerá estímulo para lise desta célula pelo LT CD8.

O LT CD8 está normalmente presente em baixa frequência no sangue e tecidos linfóides periféricos e, além disso, é um poderoso agente do sistema imunológico, atacando diretamente as células estranhas que expressam moléculas MHC classe I, destruindo a sua membrana celular. A expansão clonal de LT CD8 funcionais é causada pela presença da IL-2, produzida pelo LTh1, assim como outras citocinas produzidas como IL-4, IL-6 e IFN- $\gamma$ . Assim, a melhor resposta do LT CD8 depende da apresentação do antígeno utilizando tanto moléculas MHC classe I quanto moléculas classe II (Abbas, Lichtman, Pober, 1995).

A atividade citotóxica do LT CD8 acontece com a liberação de citocinas que estimulam a chegada de macrófagos para o local da inflamação, como o IFN- $\gamma$  que ativa macrófagos e aumenta a difusão de mediadores pró-inflamatórios, TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  que causam dano tecidual local e aumentam a expressão de moléculas de adesão nos endotélios (ECAM, ICAM e VCAM), IL-3 e fator estimulador de granulócitos (GM-CSF) e monócitos que atuam estimulando a proliferação e diferenciação celular, especialmente monócitos (Abbas, Lichtman, Pober, 1995; Stites, Terr, Parslow, 1997).

Memória imunológica é uma propriedade por meio da qual um indivíduo, após o primeiro contato com o antígeno, adquire a capacidade de responder ao mesmo nos casos de reexposição. As células T antígeno-específicas que permanecem, são conhecidas como células de memória que nos casos de novo contato ao antígeno impulsionam a uma maior amplitude e eficiência na resposta imune secundária (Schluns, Lefrancois, 2003; Rocha, Tanchot, 2004).

Células T CD8 após o primeiro contato com o antígeno se proliferam e se diferenciam em células efetoras, para eliminar o antígeno. A maior parte destas células T estimuladas morre por apoptose, mas algumas sobrevivem e tornam-se células de memória (Bourgeois, Tanchot, 2003; Sprent, Tough, 2001).

Esses LT CD8 de memória possuem uma maior capacidade de divisão, considerada mais precoce e rápida do que células virgens, sem contato prévio com o antígeno. A produção de citocinas também se torna mais rápida e em maior quantidade (Bourgeois, Tanchot, 2003).

Se a inflamação for controlada precocemente, fatores intrínsecos tornam o LT CD8 susceptível a apoptose, sendo que o pico de CD8 ocorre no 7º dia após exposição ao antígeno. Se a inflamação não for controlada, e o antígeno permanecer, as células LT CD8 continuam presentes, porém sem expansão clonal, apesar da presença do antígeno. O sistema imunológico deve controlar a infecção apesar de risco de dano ao hospedeiro, devido a continua produção de citotoxinas e morte de células infectadas (Blattman, Cheng, Greenberg, 2002).

## 1.4 Linfócito T regulador – Treg

Atualmente a identificação de uma complexa rede de mecanismos reguladores, provocou uma reviravolta no conceito de células T supressoras, agora denominadas células T reguladoras (Treg) (Jiang, Chess, 2004). As células Treg atuam suprimindo a resposta imune e desta forma mantendo a homeostasia e discernimento do que é próprio e não próprio do organismo.

Estas células têm a função de atenuar doenças imuno mediadas, prevenir fenômeno auto-imnue e controlar a resposta imune. De acordo com a origem, especificidade antigênica e mecanismo efetor, duas categorias de células T reguladoras tem sido propostas, do tipo natural e induzida (Jiang, Chess, 2004).

Ainda há discussões sobre a marcação de superfície celular para distinguir células T convencionais de células Treg. Cada subpopulação destas células T reguladoras possuem capacidade supressiva e regulatórias próprias nos diversos níveis de imunomodulação. Células com capacidade de produzir citocinas supressoras, como IL-4, IL-10 e TGF (fator de crescimento tecidual) podem ser consideradas T reguladoras, e entre elas pode-se citar: CD8+; Treg1 (CD4+CD25-Foxp3-); Th3 (CD4+CD25-);  $\gamma\delta$ T; nTreg (CD4+CD25+); NK; *Double-Negative* - DN Treg (CD3+CD4-CD8-) (Jiang, Chess, 2004).

Células DN Treg são capazes de regular LT CD4 e CD8 e ao contrário destas células, DN Treg são resistentes a apoptose e persistem por um período de tempo muito maior quando comparados com LT CD8. Esta característica permite que células DN Treg regulem a resposta imune por um tempo mais prolongado (Chen, Ford, Young, Zhang, 2004) .

Desta forma, o conhecimento do papel desempenhado pelos diferentes subgrupos de células T é a essência para o entendimento do sistema imunológico frente ao antígeno.

### **1.5 Reflexos da infecção dentária sobre a saúde infantil**

Quando um elemento dental apresenta a lesão de cárie ocorre o comprometimento do tecido pulpar, seja de forma indireta, por meio dos produtos do metabolismo bacteriano que conseguem percorrer os canalículos dentinários e atingir a polpa ou de forma direta, quando a lesão de cárie alcançou tamanha proporção que conseguiu destruir parte da estrutura dental expondo e contaminando o tecido pulpar promovendo ou exarcebando a reação inflamatória que pode culminar com a necrose do tecido (Kiss, 2004; Simsek, Duruturk, 2005).

A magnitude da progressão da lesão de cárie vai depender de aspectos como a intensidade e virulência bacteriana relacionada com a saúde ou resistência do hospedeiro frente ao agente agressor.

Com a presença do tecido pulpar necrosado, a contaminação atinge não só o ápice, como a região periapical ou perirradicular próximo a furca, que passa a ser habitada por bactérias e toxinas. Em dentes decíduos as próprias características anatômicas, como a região de furca nos molares e a proximidade com o sucessor permanente revelam áreas de maior permeabilidade que facilitam a disseminação da infecção (Simsek, Duruturk, 2005).

Dependendo da natureza, intensidade, quantidade e patogenicidade da microbiota, e do tempo da exposição aos tecidos periapicais, além da imunidade do hospedeiro, esta invasão de substâncias estranhas podem constituir-se antígenos.

O resultado, além da instalação de um processo inflamatório agudo com focos de destruição tecidual e o estabelecimento de lesão periapical crônica, poderá levar a uma reação mais complexa envolvendo todo o sistema imune (Torabinejad, Eby, Naidorf, 1985). A lesão representa uma reação de defesa do sistema imune contra o conteúdo do canal radicular infectado (Serratine, 2002; Bolan, Rocha, 2007; Piattelli et al, 1991).

Quando esses eventos acometem o paciente infantil, acabam evoluindo rapidamente e comprometendo não só o elemento dental como toda sua estrutura de suporte, repercutindo inclusive sobre o dente sucessor permanente (Bolan, Rocha, 2007). Isto se deve principalmente ao fato do dente decíduo possuir menor espessura de seus tecidos quando comparado ao dente permanente e se encontrar sobre um tecido ósseo com menor grau de calcificação quando comparado com indivíduo adulto (Simsek, Duruturk, 2005).

As condições anatômicas locais, associadas ao fato de que na criança o sistema imunológico está imaturo contribuem sobremaneira para a disseminação da infecção.

De forma geral em crianças, os fagócitos polimorfonucleares (PMNs) - neutrófilos, eosinófilos e basófilos - componentes da resposta imune inata que atuam fagocitando o antígeno e ativam sistema complemento da resposta imune ainda são ineficientes. O maior defeito dos PMNs de recém nascidos é a quimiotaxia, ocorrendo falha na produção e dificuldade de chegada de números adequados de fagócitos no local da infecção. A adesão dos neutrófilos ao endotélio é reduzida quase que pela metade do que nos indivíduos adultos, tornando a migração para o local da presença do agente agressor mais lenta (Vilela, 2001). A

quimiotaxia de neutrófilos alcança o nível do indivíduo adulto finalmente aos 16 anos de idade (Sigal, Ron,1994).

Os monócitos foram encontrados no baço e linfonodos entre 4 e 5 meses de vida intra-uterina, cerca de 2 meses após os primeiros granulócitos serem encontrados. A expressão de moléculas MHC classe II nos macrófagos está diminuída em recém nascidos. Há deficiência na quimiotaxia de monócitos, e esta só se tornará competente entre 6 e 10 anos de idade (Lawton, Cooper, 1996) . A produção de IL-1 por macrófagos de recém nascidos parece similar ao do indivíduo adulto (Sigal, Ron,1994).

Relacionado com o sistema complemento, a opsonização do antígeno pelos anticorpos e fatores quimiotáticos estão diminuídos nos recém-nascidos, ficando ainda mais evidente em bebês nascidos prematuros (Sigal, Ron, 1994).

Linfócitos T foram identificados em fetos humanos precocemente na 11ª semana de vida intra-uterina no fígado, medula óssea, timo e baço. Já a ativação da resposta imune mediada por células T, após a 12ª semana de vida intra-uterina torna-se periférica podendo interagir com antígenos e proliferar (Sigal, Ron,1994).

No recém-nascido os LT CD8 estão imaturos, e em quantidades menores quando comparados ao indivíduo adulto. As células LT CD8 ativadas pela ligação com anticorpo não são detectáveis no recém nascido, sendo que se aproximam ao valor do indivíduo adulto aos 6 anos de idade. Da mesma forma células *NK* têm sua atividade diminuída (Sigal, Ron,1994).

A relativa linfopenia, quantidade diminuída de linfócitos T no recém-nascido, está relacionada com a liberação de fatores supressores que inibem a proliferação dos linfócitos da mãe na criança, ao mesmo tempo em que desempenha um padrão

de auto-tolerância e manutenção da gestação, afim de que o feto não seja reconhecido como antígeno pelo organismo materno (Sigal, Ron,1994).

Os recém-nascidos apresentam uma proporção maior de LT CD4 em relação LT CD8 (3:1), do que no adulto, no qual esta proporção é de 2:1, os valores tornar-se-ão similares quando a criança encontra-se entre 4 e 5 anos de idade. Embora nesta fase da vida as células apresentadoras de antígenos e as células efetoras da resposta imunológica adquirida já estejam presentes em números idênticos aos do adulto, a produção de certas citocinas, IFN- $\gamma$ , fator ativador de macrófagos, IL-2, IL-4 estão diminuídas no início da infância (Carneiro-Sampaio, Grumach, 1992).

A resposta imune humoral, relacionada à produção de anticorpos, também já está presente na vida fetal. A síntese de IgM já foi demonstrada em fetos de 10 semanas de gestação, seguida por síntese de IgG e IgA por volta da 30<sup>a</sup> semana, apesar das células ainda não estarem completamente maduras para secretar grandes quantidades de imunoglobulinas (Sigal, Ron,1994).

O recém-nascido possui um décimo da quantidade de IgM de um indivíduo adulto normal e só se equivale aos 2 anos de idade. O nível de IgA que não é detectado ao nascimento aumenta 25% no 1<sup>o</sup> ano de vida, 50% entre 3 e 4 anos e atinge valor de adulto aos 7 anos de idade. Já a quantidade de IgG é próxima à de um indivíduo adulto, entretanto representa a imunoglobulina materna que atravessou a placenta, grande parte no último trimestre de gravidez. Após 4 a 6 meses de vida o nível de IgG cai para um terço do nível de um adulto e só retorna ao normal aos 7 anos de idade. A concentração de IgE atinge nível de adulto aos 6 anos de idade (Sigal, Ron,1994).

Estudos relatam que em torno 40% das bactérias envolvidas em bacteremias em crianças são de origem dental. Os estreptococos comuns na cavidade bucal, S.



*sanguis*, *S. salivarius*, *S. lactis*, *S. viridans*, *S. mutans* foram encontrados em algumas doenças como sinusite, abscesso cerebral, meningite, parotidite, endocardite, pneumonia, septicemia (Behrman, 1994; Smith, Adams, 1993).

A bacteremia caracteriza-se pela entrada e proliferação de bactérias na corrente sanguínea. Isto pode ocorrer pela presença de uma infecção no organismo, ou por meio de um procedimento cirúrgico. Uma bacteremia pode não possuir sintomas e ser resolvida sem tratamento ou pode produzir febre e outros sintomas próprios de um organismo frente a uma infecção. As bactérias mais comuns que causam bacteremia incluem espécies dos *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, e *Escherichia coli*, microorganismos que coexistem na cavidade bucal (Smith, Adams, 1993).

Em uma pesquisa em crianças com média de 5 anos de idade, mostrou que aquelas com abscessos dentários apresentavam mais alta prevalência de dentes cariados do que aquelas sem abscessos. Os autores relatam que este achado é importante por ser contra a política de não-intervenção em dentes decíduos cariados se o abscesso bucal pode ser minimizado, proporcionando atenção com intervenção em dentes decíduos para evitar evolução dos casos (Pine et al, 2006).

Uma série de estudos epidemiológicos em diferentes países mostrou que 14 a 20% dos casos de endocardite estão associados à infecção dentária (Carmona, Diz Dios, Scully, 2002). No Brasil, dados do Instituto do Coração (INCOR) revelaram que em 40% dos casos de endocardites bacterianas são provenientes de infecções dentárias e 25% dos casos levam a morte. O *Streptococcus viridans* é o principal causador da endocardite bacteriana em crianças (Smith, Adams, 1993; Carmona, Diz Dios, Scully, 2002; Droz et al, 1997; da Silva, Souza, Cunha, 2002).

Assim, nos primeiros anos de vida, deflagra-se uma maior imaturidade do sistema imunológico, repercutindo sobre a criança maior predisposição às doenças infecciosas. Assim, a manutenção na cavidade bucal de um elemento dental comprometido com infecção bacteriana torna-se imprudente frente às deficiências temporais relacionadas ao paciente infantil.

## 2. ARTIGO

### 2.1 Versão em Português

***Pesquisa de subpopulações de linfócitos T em lesões perirradiculares de dentes decíduos humanos.*** Ana Cristina Gerent Petry Nunes\*; Michele Bolan; Daniele de Almeida Lima; Maria José de Carvalho Rocha.

***Pesquisa de subpopulações de linfócitos T em lesões perirradiculares de dentes decíduos humanos.***

Ana Cristina Gerent Petry Nunes\*; Michele Bolan; Daniele de Almeida Lima; Maria José de Carvalho Rocha.

**Ana Cristina Gerent Petry Nunes\***

Especialista em Odontopediatria, Mestre em Odontologia, Doutoranda em Odontologia – área de concentração Odontopediatria, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

**Michele Bolan**

Mestre e Doutora em Odontologia – área de concentração Odontopediatria, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

**Daniele de Almeida Lima**

Mestre em microscopia e análise microscópica em Biologia, Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

**Maria José de Carvalho Rocha**

Doutora em Endodontia; Professora Assistente em Odontopediatria, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

\* **Endereço:** Rua Rafael Bandeira, 192, 1002

Centro, Florianópolis/ SC - BRASIL

CEP: 88015-450

**e-mail:** crisgp@hotmail.com

**Phone:** +55 + 48 + 32242649

**FAX:** +55 + 48 + 32348776

## **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi observar a presença de linfócitos T CD3, CD4 e CD8 em lesões perirradiculares de 10 dentes decíduos posteriores, extraídos de pacientes com média de 7 anos de idade. A marcação imunohistoquímica das células CD3, CD4 e CD8 foi realizada pela técnica complexo Avidina-biotina-peroxidase (ABC) / Estreptavidina-biotina-peroxidase (EstreptABC), utilizando anticorpos específicos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 para as subpopulações de linfócitos T. As células foram quantificadas através da análise microscópica dos cortes histológicos com auxílio do graticulo de Muller. Os resultados revelaram que a porcentagem média de células positivas foi de 6,6% para CD3, 2,2% para CD8 e 0,05% para CD4. As amostras estavam relacionadas com lesões crônicas com o predomínio de LT CD8. Assim, conclui-se que em dentes decíduos com lesão periapical há a presença de células da imunidade específica, caracterizando a necessidade de viabilizar precocemente uma conduta mais adequada para minimizar danos para saúde do paciente infantil.

## **INTRODUÇÃO**

As lesões perirradiculares, como abscessos e granulomas nos dentes decíduos são frequentemente causadas pela irritação ao tecido periapical por produtos do metabolismo bacteriano provenientes de lesão de cárie dental<sup>1</sup>. Essa contaminação no interior do canal atinge o ápice radicular e toda massa dentinária, que passa a ser habitada por bactérias e toxinas que também alcançam o ligamento periodontal<sup>2</sup>. Em dentes decíduos as próprias características anatômicas, como a região de furca nos molares e a proximidade com o sucessor permanente revelam

áreas de maior permeabilidade. Assim, a disseminação da contaminação intracanal atinge os tecidos perirradiculares, e esse conteúdo necrótico e os produtos do metabolismo bacteriano atuam como antígenos para as células de defesa do tecido periapical.

A primeira linha de defesa do sistema imunológico é a imunidade natural ou inata, onde células como os fagócitos, células *natural killer* (NK) e moléculas do sistema complemento tentarão eliminar e desintegrar o agente agressor. Se esta defesa que ocorre localmente não for suficiente para combatê-lo, a resposta imune específica ou adquirida é acionada<sup>3,4</sup>. As células do sistema imunológico responsáveis pela especificidade da resposta imune são os linfócitos T (LT) e B, sendo que as respostas inata e adquirida atuam simultaneamente.

A resposta imune adquirida aumenta os mecanismos protetores da imunidade inata, direcionando e focalizando a defesa para o local de penetração do antígeno, fazendo com que este seja revelado para as células de defesa mais capacitadas para a sua eliminação<sup>2</sup>.

Durante o processo de fagocitose do agente patogênico, o macrófago libera dentre outras moléculas, a interleucina 1 (IL-1) que aciona o alarme do sistema imune. Esta citocina de fase aguda guia linfócitos T CD4 até o local da inflamação, onde os macrófagos apresentam o antígeno, estimulando a expansão clonal dos LT CD4 e dos linfócitos B (LB).

Com a ativação dos LT CD4 a resposta imune será amplificada por meio de liberação de citocinas, que favorecem a proliferação, diferenciação e ativação de outras células como os LT CD8, linfócitos B que estimulados se diferenciarão em plasmócitos produtores de imunoglobulinas, e monócitos que chegarão ao tecido diferenciados em macrófagos, mais eficazes para destruir o antígeno intracelular.

Após a expansão clonal de LT CD4, estimulada pela IL-1, os próprios LT irão liberar diversas citocinas distintas, cada uma com uma função específica, e de acordo com esta síntese são então reconhecidos como LT *helper* 1 (LTh1) e LT *helper* 2 (LTh2). O LTh1 produz entre outras citocinas, IL-2 e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) que estimulam a resposta imune celular principalmente. O LTh2 produz as IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que estimula produção de anticorpos pelos LB (resposta humoral). As citocinas liberadas por Th1 bloqueiam atividade de Th2 e vice-versa. O balanço entre a atividade de Th1 e Th2 pode direcionar para uma resposta imune celular ou resposta imune humoral<sup>5</sup>.

Os LT CD8 estão normalmente presentes em baixa frequência no sangue e tecidos linfóides periféricos e, além disso, são poderosos agentes do sistema imunológico, que atacam diretamente as células estranhas que expressam moléculas MHC classe I, destruindo a sua membrana celular. O que causa a expansão clonal de LT CD8 funcionais é a presença da IL-2, produzida pelo LTh1, assim como outras citocinas produzidas como IL-4, IL-6 e IFN- $\gamma$ . Assim, a melhor resposta do LT CD8 depende da apresentação do antígeno utilizando tanto moléculas MHC classe I quanto moléculas classe II<sup>6</sup>.

A manutenção na cavidade bucal de um elemento dental comprometido com infecção bacteriana pode debilitar a saúde geral de uma criança, por esta apresentar características de imaturidade do seu sistema imunológico. Sabe-se que os fagócitos polimorfonucleares (PMNs) - neutrófilos, eosinófilos e basófilos - componentes da resposta imune inata que atuam fagocitando o antígeno e ativam sistema complemento da resposta imune ainda são ineficientes. O maior defeito dos PMNs é a quimiotaxia, ocorrendo falha na produção e chegada de números adequados de fagócitos no local da infecção. A adesão dos neutrófilos ao endotélio

é reduzida quase que pela metade do que nos indivíduos adultos, tornando a migração para o local da presença do agente agressor mais lenta<sup>7</sup>. A quimiotaxia de neutrófilos alcança o nível do indivíduo adulto finalmente aos 16 anos de idade<sup>8</sup>. Há deficiência na quimiotaxia de monócitos, e esta só se tornará competente entre 6 e 10 anos de idade<sup>9</sup>.

As crianças apresentam ao nascimento uma proporção maior de LT CD4 em relação CD8 (3:1), do que no adulto, no qual esta proporção é de 2:1, porém os valores tornam-se similares quando a criança encontra-se entre 4 e 5 anos de idade<sup>2</sup>. A produção de certas citocinas, IFN- $\gamma$ , fator ativador de macrófagos, IL-2, IL-4 estão diminuídas no início da infância<sup>7</sup>.

No recém-nascido os LT CD8 estão imaturos, e em quantidades menores quando comparados ao indivíduo adulto. As células LT CD8 ativadas pela ligação com anticorpo não são detectáveis no recém nascido, sendo que se aproximará ao valor do indivíduo adulto aos 6 anos de idade<sup>8</sup>.

Sabe-se que quando um elemento dental decíduo contaminado compromete os tecidos perirradiculares há necessidade da instituição do tratamento o mais precoce possível. Assim, pode-se evitar a disseminação da inflamação local e proporcionar condições adequadas de saúde bucal que refletem sobre a saúde geral da criança.

De acordo com a literatura há o envolvimento do sistema imunológico nas lesões periapicais em dentes permanentes <sup>2, 10-14</sup>. Pelas considerações realizadas, esta pesquisa foi realizada para determinar a presença de LT CD3, LT CD4 e LT CD8 nas lesões perirradiculares de dentes decíduos e estabelecer a distribuição destas células imunológicas para revelar a possível participação das reações imunes nestas lesões.



## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1 Amostra**

Foram utilizados 10 molares decíduos extraídos por motivos patológicos, de pacientes atendidos nas clínicas de odontopediatria da Universidade Federal de Santa Catarina. Estes dentes foram catalogados e selecionados de acordo com as fichas de Requisição para Exame Anatomopatológico, pertencentes a um arquivo da Disciplina de Odontopediatria da Universidade Federal de Santa Catarina. Os dentes selecionados apresentavam lesões perirradiculares<sup>15</sup>, sendo que para esta peça foi realizada a confecção de cortes histológicos separadamente. Previamente a este estudo, essas lesões já foram identificadas quanto ao diagnóstico histopatológico, em abscessos ou granulomas<sup>1</sup>.

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, da Universidade de Santa Catarina.

### **2 Procedimentos imuno-histoquímicos<sup>16</sup>**

A marcação imuno-histoquímica das células CD3, CD4 e CD8 foi realizada pela técnica complexo Avidina-biotina-peroxidase (ABC) / Estreptavidina-biotina-peroxidase (EstreptABC)<sup>16</sup>. Esta técnica foi realizada no laboratório de patologia do Hospital de Beneficência Portuguesa, São Paulo, Brasil.

Foram obtidos cortes histológicos de 3µm espessura das amostras emblocadas em parafina e colocados em lâminas previamente tratadas com APTS (3-aminopropyltriethoxysilene). As amostras foram desparafinizadas através da imersão das lâminas em xylol e hidratadas com passagens sucessivas em etanol de concentrações decrescentes. Para evitar reações inespecíficas falso-positivas foi

realizado o bloqueio da peroxidase endógena, com incubação em solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% em metanol, em dois banhos de 10 minutos cada, seguida por lavagens em água corrente e destilada.

Para recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas em solução tampão de citrato 10mM pH6,0, em panela de pressão, durante 3 minutos e após esfriamento por 20 minutos à temperatura ambiente, foram lavadas com água destilada.

Após a lavagem das lâminas, estas foram submersas em tampão salina fosfato (PBS, composição: NaCl 137mM, KCl 2mM e tampão fosfato 10mM, pH7,2-7,4) (SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis, MO, USA). Após esta etapa, a solução contendo os anticorpos foi adicionada individualmente sobre cada corte tecidual e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a temperatura ambiente durante 18 horas (Tabela 1).

A seguir, estas foram lavadas com tampão PBS, por 3 vezes, por 5 minutos cada, à temperatura ambiente. Após lavagem as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado (anti-IgG da espécie animal em que foi obtido o anticorpo específico), diluído em PBS, durante 20 minutos em câmara úmida a 37°C. Posteriormente, foram realizadas 3 lavagens utilizando-se PBS por 5 minutos. As amostras foram incubadas com complexo ABC (para CD3) e StrepABC ( para CD4 e CD8) diluído em tampão PBS, durante 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Novamente foram realizadas 3 lavagens utilizando-se PBS por 5 minutos. As amostras foram submetidas a uma revelação colorimétrica com incubação das lâminas em solução substrato (diaminobenzidina – DAB – 60mg%) durante 3 a 5 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após a revelação, foram realizadas a contracoloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris por 1 minuto,

desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol e montagem em lamínula com ENTELLAN® (MERCK, São Paulo/SP, Brasil). Para cada reação realizada foi utilizado um controle positivo (linfonodo) e o controle negativo foi realizado pela abolição do anticorpo primário nas reações<sup>17</sup>. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelos anticorpos<sup>16</sup>.

### **3 Análise de Linfócitos T CD3, CD4 e CD8**

Para avaliar a presença e distribuição de células marcadas, inicialmente a observação das lâminas foi realizada em microscópio (LEICA, São Paulo, Brasil), em aumento de 20X, 40X e 100X, analisando-se todos os campos da lâmina.

A contagem de células imunopositivas LT CD3, CD4 e CD8 nos tecidos perirradiculares foi realizada pela seleção de dez campos microscópicos consecutivos por lâmina, em local com estrutura tecidual preservada e na área de maior infiltrado inflamatório<sup>11,18</sup>. As células foram quantificadas através da análise microscópica dos cortes histológicos com auxílio do graticulo de Muller em aumento de 100X<sup>19</sup>. O resultado obtido foi a média da porcentagem de células positivas com a proporção de números de células inflamatórias.

Para validação desta pesquisa, a pesquisadora foi calibrada analisando campos microscópicos com auxílio de um 2º avaliador.

## **RESULTADOS**

As dez amostras analisadas eram de dentes molares de pacientes com média de 7 anos e 6 meses de idade.

Os resultados revelaram maior porcentagem de células imunopositivas para LT marcados pelo CD3, com média de 6,6% (desvio padrão = 3,3). Os LT CD3 estavam distribuídos de forma difusa na área de maior infiltrado inflamatório. A marcação dos LT CD8 para detectar os linfócitos citotóxicos, mostrou os mesmos distribuídos dispersamente na área da lesão com média de 2,2% (desvio padrão = 1,1). Já a presença de células LT CD4 imunopositivas ocorreu em somente uma amostra, com distribuição de algumas células isoladas. (Tabela 2) (Figuras 1, 2)

## **DISCUSSÃO**

Nesta pesquisa, a análise imuno-histoquímica dos cortes histológicos foi realizada pelo complexo Avidina-biotina-peroxidase (ABC) / Estreptavidina-biotina-peroxidase (EstreptABC) que é uma técnica muito específica e largamente utilizada para detecção de células imunológicas<sup>11, 14, 17, 18, 20</sup>.

A amostra constituiu-se de dentes posteriores extraídos de pacientes com uma média de idade de 7 anos e 6 meses caracterizando perda precoce destes elementos dentários<sup>1, 21</sup>. Essa perda antecipada, segundo diversos autores repercute diretamente sobre a fisiologia do sistema estomatognático da criança, podendo apresentar alterações de desenvolvimento do dente sucessor, erupção precoce do sucessor permanente ou perda de espaço<sup>22-24</sup>.

Nos cortes histológicos seguiu-se pela observação de campos onde havia o maior infiltrado inflamatório<sup>11, 18</sup>. Em cada corte foi utilizado um anticorpo monoclonal específico. Nesta pesquisa foram utilizados cortes da lesão da região mais central,

portanto a porcentagem apresentada não se refere ao total da lesão e sim do corte analisado. Logo, naqueles cortes onde não houve células marcadas pela técnica imuno-histoquímica, não significa que as células não estejam presentes na lesão.

A lesão representa uma reação de defesa contra o conteúdo do canal radicular infectado. Em especial a presença de linfócitos nestas lesões indica que a resposta imune celular está ocorrendo<sup>25, 26</sup>. A presença de células T marcadas pelo CD3 indica que em todos os casos ocorreu uma resposta imune específica do hospedeiro contra o agente agressor.

Em grande parte das amostras a marcação de LT CD4 apresentou resultado negativo, e somente em um caso o resultado foi positivo e com valor menor que 1%. Esta baixa porcentagem pode estar relacionada a um viés, já que as amostras antes de serem preparadas para técnica imunohistoquímica permaneceram em solução de formol, e mesmo com a recuperação dos sítios antigênicos, a ligação do anticorpo monoclonal CD4 ao linfócito que tem essa expressão é muito sensível, e pode ter sido perdida. Apesar deste resultado, não se descarta o papel desempenhado pelos LT CD4, pois a marcação foi positiva para CD3 e CD8. Além do mais, sabe-se que as funções principais dos LT CD4 são de estimulação do crescimento e proliferação de LT citotóxicos, cujo resultado para marcação CD8 foi positivo<sup>6</sup>.

Em relação ao papel desempenhado pelos LT CD4 sobre a geração de LT CD8 de memória, ainda há controvérsia. Alguns autores relatam que os LT CD4 são dispensáveis para a resposta imune primária, mas são absolutamente necessários para a geração de linfócitos de memória T CD8. Estudos mais recentes propõem para alguns casos, a geração de linfócitos de memória T CD8 independente do LT CD4, mas relacionada com a interação com linfócitos B<sup>27</sup>.

A expressão positiva para os LT CD8 nas amostras pode estar relacionada ao fato de serem lesões crônicas. Em 1998, Alavi, Gulabivala e Speight relataram que linfócitos T CD4 estavam em maior quantidade na fase inicial e envolvidos com destruição óssea e expansão da lesão, enquanto que LT CD8 envolve estabilização da lesão<sup>11</sup>. De acordo com Rodini e Lara<sup>18</sup>, 2001, a expressão de LT CD8 foi maior nas lesões mais avançadas e crônicas caracterizando a função supressora destas células somada à citotoxicidade para eliminar o agente agressor. Quando a inflamação é controlada precocemente, fatores intrínsecos tornam o LT CD8 susceptível à apoptose. O sistema imunológico deve controlar a infecção, devido à contínua produção de citotoxinas e morte de células infectadas<sup>28</sup>.

Simsek e Duruturk<sup>29</sup>, em 2005, observaram em dentes decíduos que à medida que a lesão de cárie aproximava-se da polpa, independente da etapa da reabsorção fisiológica do dente decíduo, a quantidade de LT CD3 e CD8 estava aumentada. Estes achados revelam a atividade de células do sistema imunológico no tecido pulpar na tentativa de impedir a penetração e progressão do antígeno sistemicamente.

Atualmente a identificação de uma rede complexa de mecanismos reguladores, provocou uma reviravolta no conceito de células T supressoras, agora denominadas células T reguladoras (Treg)<sup>30</sup>. Estas células têm a função de atenuar doenças imuno mediadas, prevenir fenômeno auto-imnue e controlar dano periférico durante a resposta imune<sup>30</sup>.

Ainda há discussões sobre a marcação de superfície celular para distinguir células T convencionais de células Treg. Mas, sabe-se que células CD3+ CD4 e CD8 negativas são denominadas células *Double-Negative regulatory T cells* (DN Treg)<sup>31</sup>. Analisando pacientes saudáveis, Fischer e colaboradores em 2005

relataram que aproximadamente 4% de células CD3 são células DN Treg<sup>31</sup>. Este dado pode explicar a porcentagem maior de células imunopositivas na marcação de CD3 em relação CD4 e CD8 nesta pesquisa.

Células DN Treg são capazes de regular LT CD4 e CD8 e ao contrário destas células, DN Treg são resistentes a apoptose e persistem por um período de tempo muito maior quando comparados com LT CD8. Esta característica permite que células DN Treg regulem a resposta imune por um tempo mais prolongado<sup>32</sup>.

Desta forma, o conhecimento do papel desempenhado pelos diferentes subgrupos de células T é a essência para o entendimento do sistema imunológico frente ao agente agressor.

Em uma pesquisa em crianças com média de 5 anos de idade, mostrou que aquelas com abscessos dentários apresentavam mais alta prevalência de dentes cariados do que aquelas sem abscessos. Os autores relatam que este achado é importante por ser contra a política de não-intervenção em dentes decíduos cariados se o abscesso bucal pode ser minimizado, proporcionando atenção com intervenção em dentes decíduos para evitar evolução dos casos<sup>33</sup>.

Assim, a manutenção na cavidade bucal de um elemento dental comprometido com infecção bacteriana torna-se imprudente por deflagrar no organismo uma resposta imunológica local e sistêmica. Mais do que isso, em crianças, diante da imaturidade imunológica, é necessário evitar a exposição precoce e desnecessária a um antígeno que pode ser debelado em fase inicial e mais ainda, pode ser prevenido já que grande parte das lesões perirradiculares é de origem da cárie dental. Assim, há necessidade de viabilizar precocemente uma conduta clínica mais adequada para minimizar danos para saúde do paciente infantil.

## **CONCLUSÃO**

Em dentes decíduos com lesão periapical há a presença de linfócitos T marcados por CD3 e LT CD8 distribuídos dispersamente e LT CD4 com distribuição de algumas células isoladas, caracterizando a participação ativa do sistema imune. E, para se compreender melhor a complexidade do sistema imunológico, tornam-se necessárias pesquisas sobre a marcação de superfície celular para distinguir células T convencionais de células Treg.



## REFERÊNCIAS

- 1 Bolan M, Rocha MJC. Histopathological study of physiological and pathological resorptions in human primary teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007.
- 2 Kiss C. Cell-to-cell interactions. *Endodontic Topics.* 2004;8:88-103.
- 3 Gorczynski R, Stanley J. *Imunologia Clínica.* Rio de Janeiro: Reichmann e Affonso Editores; 2001.
- 4 Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J.* 1998;31(5):311-25.
- 5 Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Basic & Clinical Immunology.* 8th ed. Connecticut, USA: Appleton & Lange; 1997.
- 6 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular.* Rio de Janeiro: Revinter; 1995.
- 7 Vilela MMS. Desenvolvimento do sistema imune na criança. *Alergia e imunologia na infância e na adolescência.* São Paulo: Atheneu; 2001. p. 327-42.
- 8 Sigal LH, Ron Y. The immune response of normal children. *Immunology and inflammation - Basic mechanisms and clinical consequences.* New York: McGraw Hill; 1994. p. 563-71.
- 9 Lawton AR, Cooper MD. Ontogeny of immunity. *Immunologic disorders in infants & children* 4 ed. Philadelphia: Saunders Company; 1996. p. 1-11.
- 10 Barkhordar RA, Desouza YG. Human T-lymphocyte subpopulations in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988;65(6):763-6.
- 11 Alavi AM, Gulabivala K, Speight PM. Quantitative analysis of lymphocytes and their subsets in periapical lesions. *Int Endod J.* 1998;31(4):233-41.
- 12 Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J.* 2003;36(7):464-71.
- 13 Lukic A, Vasilijic S, Majstorovic I, Vucevic D, Mojsilovic S, Gazivoda D, et al. Characterization of antigen-presenting cells in human apical periodontitis lesions by flow cytometry and immunocytochemistry. *Int Endod J.* 2006;39(8):626-36.
- 14 Philippi CK, Rados PV, Sant'ana Filho M, Barbachan JJ, Quadros OF. Distribution of CD8 and CD20 lymphocytes in chronic periapical inflammatory lesions. *Braz Dent J.* 2003;14(3):182-6.
- 15 Furseth R. The resorption processes of human deciduous teeth studied by light microscopy, microradiography and electron microscopy. *Arch Oral Biol.* 1968;13(4):417-31.
- 16 *Manual de imuno-histoquímica: Sociedade Brasileira de Patologia;* 1999.
- 17 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.
- 18 Rodini CO, Lara VS. Study of the expression of CD68+ macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(2):221-7.
- 19 Bolan M. Estudo da expressão de linfócitos CD45RO e CD20, macrófagos CD68 e células de Langerhans CD1a em lesões perirradiculares de dentes decíduos. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2007.

- 20 Suzuki T, Kumamoto H, Kunimori K, Ooya K. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(1):46-52.
- 21 Cordeiro, MM. Rocha, MJC. The effects of periradicular inflammation and infection on a primary tooth and permanent successor. *J Clin Pediatr Dent.* 2005;29(3):193-200.
- 22 Durward CS. Space maintenance in the primary and mixed dentition. *Ann R Australas Coll Dent Surg.* 2000;15:203-5.
- 23 Kalra N, Sushma K, Mahapatra GK. Changes in developing succedaneous teeth as a consequence of infected deciduous molars. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2000;18(3):90-4.
- 24 Leroy R, Bogaerts K, Lesaffre E, Declerck D. Impact of caries experience in the deciduous molars on the emergence of the successors. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(2):106-10.
- 25 Piattelli A, Artese L, Rosini S, Quaranta M, Musiani P. Immune cells in periapical granuloma: morphological and immunohistochemical characterization. *J Endod.* 1991;17(1):26-9.
- 26 Torabinejad M, Eby WC, Naidorf IJ. Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. *J Endod.* 1985;11(11):479-88.
- 27 Bourgeois C, Tanchot C. Mini-review CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation. *Eur J Immunol.* 2003;33(12):3225-31.
- 28 Blattman JN, Cheng LE, Greenberg PD. CD8(+) T cell responses: it's all downhill after their prime. *Nat Immunol.* 2002;3(7):601-2.
- 29 Simsek S, Duruturk L. A flow cytometric analysis of the biodefensive response of deciduous tooth pulp to carious stimuli during physiological root resorption. *Arch Oral Biol.* 2005;50(5):461-8.
- 30 Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest.* 2004;114(9):1198-208.
- 31 Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-) CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood.* 2005;105(7):2828-35.
- 32 Chen W, Ford MS, Young KJ, Zhang L. The role and mechanisms of double negative regulatory T cells in the suppression of immune responses. *Cell Mol Immunol.* 2004;1(5):328-35.
- 33 Pine CM, Harris RV, Burnside G, Merret MC. An investigation of the relationship between untreated decayed teeth and dental sepsis in 5-year-old children. *Br Dent J.* 2006; 200(1):45-7.

Tabela 1 – Relação de anticorpos utilizados

Anticorpo primário	Diluição	Clone / código	Marca
anti-CD3	1:80	Policlonal / A0452	Dako
anti-CD4	1:50	1F6 / 18-2282	Zymed
anti-CD8	1:100	1A5 / 18-2289	Zymed

Tabela 2 - Relação de dados pessoais com a porcentagem de células imunopositivas

Amostra	Diagnóstico	Dente	Sexo	Idade	% Células imunopositivas		
					CD3	CD4	CD8
1	Granuloma	74	M	9a 4m	-*	-*	1,2
2	Abcesso	85	M	6a	3,6	0	0
3	Abcesso	75	M	9a 1m	12,2	0	2,3
4	Abcesso	85	M	9a 5m	5,6	0	2,5
5	Granuloma	85	F	5a	9,4	0,5	4,3
6	Granuloma	75	F	11a 4m	3,7	0	2,1
7	Abcesso	85	M	7a 3m	3,8	0	3,2
8	Abcesso	65	M	6a 10m	8,1	0	2,1
9	Abcesso	74	F	6a 4m	-*	0	2,5
	Média			7a 10m	6,62	0,06	2,37
	Desvio Padrão			-	3,35	0,17	0,95

\* material insuficiente para análise

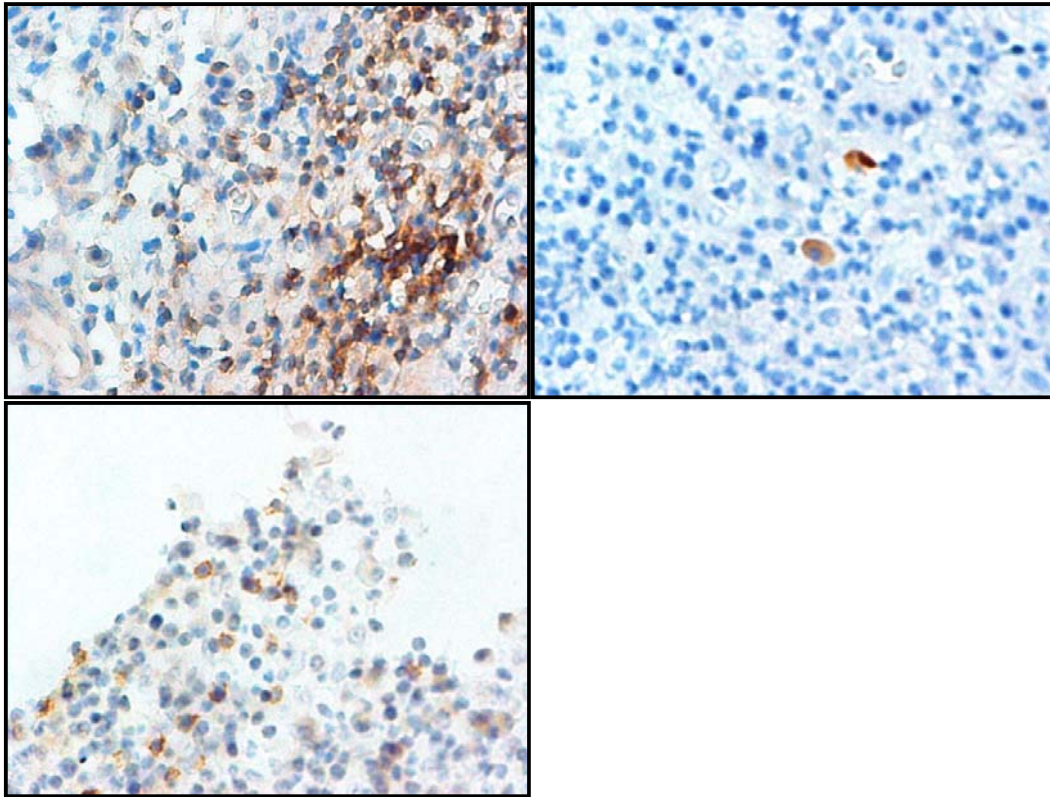


Figura 1 – Cortes histológicos corados pela técnica Imuno-histoquímica apresentando células marcadas CD3+ (A) e CD4+ (B), CD8+ (C). Todas em aumento de 66X.

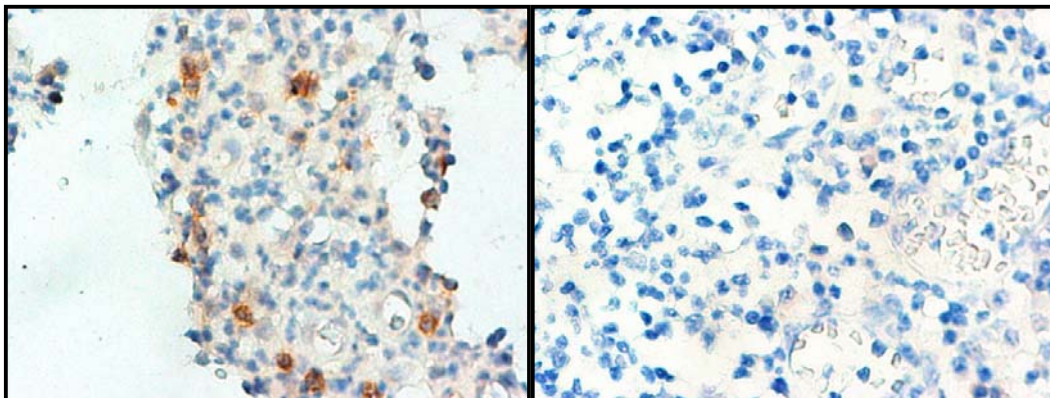


Figura 2 – Cortes histológicos corados pela técnica Imuno-histoquímica, apresentando células marcadas CD8+ (A) e não apresentando células marcadas CD4-(B). Aumento 66X.

## 2.2 Versão em Inglês

***Human T cells subpopulations in periradicular lesions of deciduous teeth.*** Ana Cristina Gerent Petry Nunes\*; Michele Bolan; Daniele de Almeida Lima; Maria José de Carvalho Rocha.

***Human T cells subpopulations in periradicular lesions of deciduous teeth.*** Ana Cristina Gerent Petry Nunes\*; Michele Bolan; Daniele de Almeida Lima; Maria José de Carvalho Rocha.

**Ana Cristina Gerent Petry Nunes\***

Specialist in Pediatric Dentistry, MSc in Odontology – Pediatric Dentistry, Graduate student (Doctor degree), Department of Pediatric Dentistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

**Michele Bolan**

MSc and PhD in Odontology – Pediatric Dentistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

**Daniele de Almeida Lima**

MSc in Microscopy and Microscopic Analysis in Biology, Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

**Maria José de Carvalho Rocha**

PhD in Endodontics, Assistant Professor in Pediatric Dentistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

\* **Address:** Rua Rafael Bandeira, 192, 1002

Centro, Florianópolis/ SC - BRASIL

CEP: 88015-450

**e-mail:** crisgp@hotmail.com

**Phone:** +55 + 48 + 32242649

**FAX:** +55 + 48 + 32348776

## **ABSTRACT**

The study aimed to detect the presence of CD3, CD4 and CD8 T cell in periradicular lesions of 10 deciduous molar teeth, extracted from 7 year old average patients. The immunohistochemistry marking of CD3, CD4 and CD8 cells was carried out by the technique complex Avidin-biotin-peroxidase (ABC)/streptoavidin-biotin-peroxidase (EstreptABC), using specific antibodies anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD8 for T cells sub-populations. The cells had been quantified through microscopic analysis of histological cuts. The results disclosed that the average percentage of positive cells was of 6.6% for CD3, 2.2% for CD8 and 0.05% for CD4. The samples were related with chronic lesions with the predominance of CD8 T cells. In conclusion, findings suggest that the presence of cells of the specific immunity from deciduous teeth with periapical lesion may cause further health damages in infant patients. Therefore it is vital that a more adjusted clinical procedure should be carry out in order to precociously enable maximizing the dental health.

## **INTRODUCTION**

The periradicular lesions, as abscesses and granuloma in deciduous teeth are frequently caused by the irritation to periapical tissue by products of the bacterial metabolism from dental caries lesion<sup>1</sup>. This contamination in the interior of the root canal reaches the radicular apex and all tooth, which is overtaken by bacteria and toxins that also reach the periodontal ligament<sup>2</sup>. In deciduous teeth the proper anatomical characteristics, as the molar furcal region and the proximity with the permanent successor, disclose areas of bigger permeability. Thus, the spreading of

the root contamination reaches periradicular tissues, and this necrotic content and bacterial metabolism by-products act as antigens for periapical tissue defense cells.

The front line defense of the immunological system is the natural or innate immunity, where cells as phagocytes, natural killer cells (NK) and the complement system molecules will try to eliminate and to disintegrate the aggressor agent. If this defense, that occurs locally, is not sufficient enough for eliminating the aggressor agent back, the specific or adaptive immune response will be triggered<sup>3,4</sup>. The immune system responsible for the specificity of the immune response is composed by T and B cells and the innate and specific responses act simultaneously.

The specific immune response increases the shielding mechanisms of the innate immunity, in which defense is directed straight to the antigen penetration site, causing it to be disclosed to more enabled defense cells, as a result killing the pathogen<sup>2</sup>.

During the phagocyte process of the pathogenic agent, the macrophage releases amongst other molecules, interleukin 1 (IL-1) that sets the alarm of the immune system. This acute phase cytokine guides CD4 T cells towards the inflammation site, where macrophages present the antigen, stimulating the clonal growth of CD4 and B cells.

The immune response will be amplified with the activation of CD4 T cells by means of cytokines release, favoring the proliferation, differentiation and activation of other stimulated cells as CD8 T cells, and B cells that will be differentiated by plasmocytes generators of immunoglobulin, as well as monocytes that will more efficiently arrive at the differentiated tissues as macrophages so to destroy the intracellular antigen.



After CD4 T cells clonal growth, CD4 T cells stimulated by IL-1 will release various distinct cytokines, each one with a specific function, and in accordance with this diffusion are then recognized as LT helper 1 (LTh1) and LT helper 2 (LTh2). Among others, LTh1 produces cytokines, IL-2 and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) that stimulate cell immune response mainly. LTh2 produces IL-4, IL-5, IL-6 and IL-10 cytokines that stimulate the production of antibodies by B cells (humoral responses). The released cytokine by Th1 blocks Th2 activity and vice versa. The activity balance of Th1 and Th2 may lead to either a cell or a humoral immune response<sup>5</sup>.

CD8 T cell is normally present in low frequency in the blood and peripheral lymphoid tissues. Moreover, CD8 T cell is a powerful agent of the immunological system that directly attacks foreign cells which also expresses MHC class I molecules, destroying their cellular membranes. The presence of IL-2, which causes the clonal growth of functional CD8 T cell, is produced by LTh1, as well as other cytokines as IL-4, IL-6 and IFN- $\gamma$ . Thus, the best CD8 T cell response depends on the presentation of the antigen using either MHC class I molecules as much as class II molecules<sup>6</sup>.

The maintenance of a compromised tooth with bacterial infection is likely to weaken the general health of a child, as the child's immune system main characteristic is its immaturity. It is known that polymorphonuclear phagocytes (PMNs) - neutrophil, eosinophil and basophil - components of the innate immune response act phagocytizing the antigen that activates an immune response as a secondary system, but they are still inefficient. The biggest shortcoming of PMNs is the chemotaxy, leading to deficit in the arrival as well in the production of adequate numbers of phagocytes in the infection site. In children, the adhesion of neutrophils to the endothelium is reduced to almost half when compare to adult individuals,

consequently delaying its migration to the site where the aggressor agent is acting<sup>7</sup>. The chemotaxy of neutrophils finally reaches the level of the adult individual at the age of 16 years old<sup>8</sup>. The deficiency of monocytes at the chemotaxy will only be overcome and become mature between the ages of 6 and 10 years old<sup>9</sup>.

At birth, children present a bigger ratio of CD4 T cells in relation to CD8 T cells (3:1) than adulthood, at which ratio is of 2:1. However, these values turn out to be similar when the child is between 4 and 5 years of age<sup>2</sup>. The production of certain cytokines IFN- $\gamma$ , activator factor of macrophages IL-2, IL-4, are reduced in the beginning of childhood<sup>7</sup>.

For infants, CD8 T cell is immature, and in lesser amounts when compared to adult individual. Activated CD8 T cells by coupled antibody are not detectable in neonates, and their values will only be close to the adult individual value at the age of 6 years old<sup>8</sup>.

It is well-known that when a contaminated deciduous teeth compromises periradicular tissues, there is the need of an earlier treatment. Thus, the dissemination of the inflammation site can be prevented providing adequate oral health that will reflect on the general health of the child.

In accordance with literature the immune system is likely to be involved in periapical lesions of permanent teeth<sup>2, 10-14</sup>. By the considerations carried out in this research, it was possible to determine the presence of CD3, CD4 and CD8 T cells in periradicular lesions of deciduous teeth, and to establish the distribution of these immunological cells to disclose the possible involvement of immune reactions in these lesions.

## **MATERIAL and METHODS**

### **1 Sample**

The sample was composed by 10 deciduous molar teeth extracted for pathological reasons from patients of the Pediatric Dentistry Clinic of the Federal University of Santa Catarina. These teeth had been filed and selected in accordance with the histological examination requirement records, pertaining to an archive of the Pediatric Dentistry Clinic of the Federal University of Santa Catarina.

The selected teeth presented periradicular lesions<sup>15</sup>, being that histological cuts were carried out separately. In prior to this study, these lesions had already been identified as for the histopathological diagnosis, in abscesses or granulomas<sup>1</sup>.

This work was submitted to and approved written format by the Committee of Ethics in Research with Human Beings, of the Federal University of Santa Catarina.

### **2 Immunohistochemistry**<sup>16</sup>

The immuno-histochemical marking of CD3, CD4 e CD8 cells was carried out by the technique complex Avidin-biotin-peroxidase (ABC) / streptavidin-biotin-peroxidase (EstreptABC)<sup>16</sup>. This technique was performed at the laboratory of pathology of the *Hospital de Beneficência Portuguesa, São Paulo, Brazil*.

The samples were in paraffin block-type. Histological slices of 3µm thickness were harvested and mounted in slides previously treated with APTS (3-aminopropyltrietloxysilene).

Subsequently, the samples were taken out of the paraffin through slides immersed into xylol and hydrated with successive immersions in ethanol of

decreasing concentrations. To prevent false-positive unspecific reactions, endogenous peroxidase block was carried through, incubated in hydrogen peroxide solution (H2O2) 3% in methanol, in two baths of 10 minutes each, followed by washes under running distilled water.

As the samples had been fixed in formaldehyde over 24 hours before being enclosed in paraffin, the slides had been submitted under treatment for antigenic recovery, with the purpose to recover the antigenic small sites that were masked by the fixation and addition of the tissue in formaldehyde and paraffin. With this intention, the slides were incubated in a buffer solution of citrate 10mM pH6.0 into a sterilizer pressure pan, during 4 minutes with the counting starting from the boiling period. After cooling for 20 minutes at room temperature, they were rinsed with distilled water.

After rinsing the slides, they were immersed in saline phosphate buffer (PBS, composition: NaCl 137mM, KCl 2mM and phosphate buffer 10mM, pH7.2-7.4) (SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis, Me, the USA). After this stage, the solution prepared with antibodies was individually added to each tissue cut and the slides were kept in a chamber at room temperature during 18 hours. (Table 1)

Following, they were rinsed with PBS buffer 3 times, 5 minutes each at room temperature. After they were incubated with secondary biotinylated antibody (anti-IgG from animal species where the specific antibody was obtained), diluted in PBS during 20 minutes in chamber at 37°C.

Later, samples were submitted to 3 rinses using PBS for 5 minutes. Then samples were incubated with complex ABC/StrepABC diluted in PBS buffer during 30 minutes and kept in a chamber at 37°C. Again 3 rinses using PBS for 5 minutes were carried out. The samples were stained by colorimetric assay with incubation of

the slides in a DAB solution (diaminobenzidine – 60 mg %) during 3 to 5 minutes at room temperature protected from the light. Following, positive control slides were observed in microscope, as well as for the development of chestnut-golden precipitated stain, as the final product of reaction. After the counter-staining of the slides with Harris' hematoxylin solution for 1 minute, slides were dehydrated through increasing concentrations of ethanol (ethanol 70%, ethanol 80%, absolute 90% and ethanol), diaphanization in xylol and assemble in cover slip with ENTELLAN® (MERCK, São Paulo/SP, Brazil). For each reaction carried out a positive control was used (lymph node) and the negative control was carried out by the removal of the primary antibody in reactions<sup>17</sup>. The positive result was disclosed by the appearance of chestnut stain in the marking site for antibodies<sup>16</sup>.

### **3 Analyses of CD3, CD4 e CD8 T cells**

To evaluate the presence and distribution of marked cells, the slides observation were initially carried out in ordinary microscope (LEICA, São Paulo, Brazil), in x20, x40 and x100 zoom, and slides were analyzed at all the fields.

The counting of immune positive CD3, CD4 and CD8 T cells in periradicular tissues was performed by the election of ten consecutive microscopic high-power fields per slide at sites where tissue structure were preserved and at the area where there were greater cellular inflammatory infiltrate<sup>11,18</sup>. The positive cells were quantified through microscopic analysis of histological cuts with aid of Muller's graticule on a x100 zoom exposure<sup>19</sup>. The results obtained were the average of the positive cells percentage with the number of the total inflammatory cells.

## RESULTS

The ten analyzed samples were molar teeth of patients with an average of 7 years and 10 months of age. The result disclosed a greater percentage of immune positive cells for all LT marked by CD3, with 6.6% average (standard deviation= 3.3). CD3 T cell was distributed in a diffuse manner in the area of greater inflammatory infiltration.

The marking of CD8 T cell to detect cytotoxic lymphocytes showed them distributed dispersedly in the lesion area with 2.2% average (standard deviation= 1.1). However, the presence of immune positive CD4 T cells only occurred in one of the samples with distribution of some isolated cells, resulting in the negative outcome for the greatest part of the samples of marked CD4 T cells. (Table 2) (Figures 1, 2)

## DISCUSSION

In this research, the immunohistochemistry analysis of histological cuts was performed using the complex Avidin-biotin-peroxidase (ABC) / streptavidin-biotin-peroxidase (EstreptABC) which is a very specific technique and largely used for the detection of immunological cells<sup>11, 14, 17, 18, 20</sup>.

The sample constitute of molar deciduous teeth extracted from patients with an average age between 7 years and 6 months who featured an early dental lost<sup>1, 21</sup>. Such a premature dental lost, according to many authors directly reverberates over the child's physiology of the stomatognathic system, and is likely to present alterations in the development of succedaneums tooth, early emergence of

permanent tooth or lost of its space<sup>22-24</sup>. Consequently, it may result in local dental infection.

In the histological slides, we observed the fields where there were greater inflammatory infiltrations<sup>11,18</sup>. In each slice, it was used one monoclonal specific antibody. In this research we used slices of the innermost region of the lesion, therefore the shown percentage is not regards to the total of the lesion and yet, only to the analyzed cut. Hence, in those slides where cells were not marked for the immuno-histochemical technique, did not mean that cells did not exist in the lesion.

The lesion represents a defense of the reaction against the content of the infected root canal. In special, the presence of lymphocytes in these lesions indicates that cell immune response is occurring<sup>25, 26</sup>. The presence of T cells marked by the CD3, indicates that in all cases, there were specific immune responses of the host against the aggressive agent.

To a large extent of the samples the marking of CD4 T cell resulted in a negative outcome, and in only one case the result was positive and with a value lower than 1%. This low percentage might be related to a bias, since the beforehand prepared for the immuno-histochemistry samples remained in formaldehyde solution, and even with the antigen sites being recovered, the monoclonal antibody CD4 link to the lymphocyte with this expression is very sensible, possibly losing it. Despite this result, the role played for CD4 T cell is not discarded, as the marking was positive for CD3 and CD8. In addition, it is known that the main functions of CD4 T cells are of stimulating the growth and proliferation of cytotoxic T cell, which marking CD8 had a positive result<sup>6</sup>.

In regards to the role played by CD4 T cells on the generation of memory LT CD8, there is still controversy. Some authors report that CD4 T cells are dispensable

for the primary immune response, apart from this, they are absolutely necessary for the generation of memory T cells. More recent studies suggest that in some cases the generation of memory CD8 T cell is independent from CD4 T cell, but is related with the interaction with lymphocytes B <sup>27</sup>.

The positive expression for CD8 T cell in the samples may be related to the fact that they are chronic lesions. Alavi, Gulabivala and Speight<sup>11</sup> reported that CD4 T cells were in bigger amount in the initial phase and were involved with bone destruction and the spreading out of the lesion. While CD8 T cells involve lesion stabilization. Rodini and Lara<sup>18</sup> showed that the expression of CD8 T cell was bigger in the most advanced chronic lesions, indicating the suppressor function of these cells added to the cytotoxicity while eliminating the aggressor agent. When the inflammation is early controlled, intrinsic factors develop into susceptible CD8 T cell apoptosis. The immunological system is required to control the infection, due to its long-lasting production of cytotoxins and death of cells. When the inflammation is controlled precociously, intrinsic factors become susceptible to CD8 T cell apoptosis. The immunological system is required to control the infection, carrying on its production of cytotoxins and death of infected cells<sup>28</sup>.

Simsek and Duruturk<sup>29</sup> observed that the amount of CD3 and CD8 T cell were increased to the extent that the teeth decay lesions would move toward to the pulp of deciduous teeth, independent from the stage of physiological resorption. These findings unveiled the activity of immunologic system cells in the marrow tissue in the attempt to hinder the antigen infiltration and progression systematically.

Currently, the identification of a complex net of regulating mechanisms, provoked an overturn in the concept of suppressor T cells, now called regulatory T cells (Treg)<sup>30</sup>. These Treg cells have the function to attenuate immune mediated



illnesses, to prevent auto-immune phenomenon and to control peripheral damage during the immune response<sup>30</sup>.

A debate is still going on about the marking of cellular surface to distinguish conventional T cells from Treg cells. But, it is known that CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> cells are called Double-Negative regulatory T cells (DN Treg)<sup>31</sup>. Analyzing health patients, Fischer et al, in 2005, accounted that approximately 4% of CD3 cells are DN Treg cells<sup>31</sup>. This data can explain the higher rate of immune positive cells in the marking of CD3 in relation to CD4 and CD8 in this research.

DN Treg cells are capable to regulate CD4 and CD8 T cells and DN Treg are resistant to apoptosis and persist for a lengthier period of time when compared to CD8 T cell. This characteristic allows DN Treg cells to regulate the immune response for a longer time<sup>32</sup>.

In such manner, the discernment about the different roles played by T cells subsets is the essence for the understanding of the immunological system fight against the aggressor agent.

In a research with children with a mean age of 5 years old, it was shown that those with dental abscesses presented the highest prevalence of cavities than those children without abscesses. The authors reported that this is an important finding as it is against the non-intervention politic in cavity attacked teeth, if the oral abscess can be minimized, providing intervention care to deciduous teeth, therefore it may avoid evolution of cases<sup>33</sup>.

Thus, the maintenance of a compromised tooth with bacterial infection becomes risky for deflagrating a local immunological and systemic response in the body. More than that, facing the immunological immaturity of children it is necessary to prevent precociously any unnecessary exposition to an antigen that is likely to be

suppressed at initial phase and still be prevented, since great part of periradicular lesions originate from dental caries. Thus, as pediatric dentists it is vital that a more adjusted clinical procedure is early carried out in infant patients in order to minimize future oral damages.

## **CONCLUSION**

In deciduous teeth with periapical lesion the presence of T lymphocytes marked by CD3 and LT CD8 are shown to be distributed dispersedly in the entire lesion area, and LT CD4 with distribution of some isolated cells, characterizing the active participation of the immune system in all studied cases. Further studies are necessary on the marking of the cellular surface, in order to better understand the complexity of the immunological system and to distinguish conventional T cells from Treg cells.

## REFERENCES

- 1 Bolan M, Rocha MJC. Histopathological study of physiological and pathological resorptions in human primary teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007.
- 2 Kiss C. Cell-to-cell interactions. *Endodontic Topics.* 2004;8:88-103.
- 3 Gorczynski R, Stanley J. *Imunologia Clínica.* Rio de Janeiro: Reichmann e Affonso Editores; 2001.
- 4 Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J.* 1998;31(5):311-25.
- 5 Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Basic & Clinical Immunology.* 8th ed. Connecticut, USA: Appleton & Lange; 1997.
- 6 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular.* Rio de Janeiro: Revinter; 1995.
- 7 Vilela MMS. Desenvolvimento do sistema imune na criança. *Alergia e imunologia na infância e na adolescência.* São Paulo: Atheneu; 2001. p. 327-42.
- 8 Sigal LH, Ron Y. The immune response of normal children. *Immunology and inflammation - Basic mechanisms and clinical consequences.* New York: McGraw Hill; 1994. p. 563-71.
- 9 Lawton AR, Cooper MD. Ontogeny of immunity. *Immunologic disorders in infants & children* 4 ed. Philadelphia: Saunders Company; 1996. p. 1-11.
- 10 Barkhordar RA, Desouza YG. Human T-lymphocyte subpopulations in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988;65(6):763-6.
- 11 Alavi AM, Gulabivala K, Speight PM. Quantitative analysis of lymphocytes and their subsets in periapical lesions. *Int Endod J.* 1998;31(4):233-41.
- 12 Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J.* 2003;36(7):464-71.
- 13 Lukic A, Vasilijic S, Majstorovic I, Vucevic D, Mojsilovic S, Gazivoda D, et al. Characterization of antigen-presenting cells in human apical periodontitis lesions by flow cytometry and immunocytochemistry. *Int Endod J.* 2006;39(8):626-36.
- 14 Philippi CK, Rados PV, Sant'ana Filho M, Barbachan JJ, Quadros OF. Distribution of CD8 and CD20 lymphocytes in chronic periapical inflammatory lesions. *Braz Dent J.* 2003;14(3):182-6.
- 15 Furseth R. The resorption processes of human deciduous teeth studied by light microscopy, microradiography and electron microscopy. *Arch Oral Biol.* 1968;13(4):417-31.
- 16 *Manual de imuno-histoquímica: Sociedade Brasileira de Patologia;* 1999.
- 17 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.
- 18 Rodini CO, Lara VS. Study of the expression of CD68+ macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(2):221-7.
- 19 Bolan M. Estudo da expressão de linfócitos CD45RO e CD20, macrófagos CD68 e células de Langerhans CD1a em lesões perirradiculares de dentes decíduos. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2007.

- 20 Suzuki T, Kumamoto H, Kunimori K, Ooya K. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(1):46-52.
- 21 Cordeiro, MM. Rocha, MJC. The effects of periradicular inflammation and infection on a primary tooth and permanent successor. *J Clin Pediatr Dent.* 2005;29(3):193-200.
- 22 Durward CS. Space maintenance in the primary and mixed dentition. *Ann R Australas Coll Dent Surg.* 2000;15:203-5.
- 23 Kalra N, Sushma K, Mahapatra GK. Changes in developing succedaneous teeth as a consequence of infected deciduous molars. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2000;18(3):90-4.
- 24 Leroy R, Bogaerts K, Lesaffre E, Declerck D. Impact of caries experience in the deciduous molars on the emergence of the successors. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(2):106-10.
- 25 Piattelli A, Artese L, Rosini S, Quaranta M, Musiani P. Immune cells in periapical granuloma: morphological and immunohistochemical characterization. *J Endod.* 1991;17(1):26-9.
- 26 Torabinejad M, Eby WC, Naidorf IJ. Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. *J Endod.* 1985;11(11):479-88.
- 27 Bourgeois C, Tanchot C. Mini-review CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation. *Eur J Immunol.* 2003;33(12):3225-31.
- 28 Blattman JN, Cheng LE, Greenberg PD. CD8(+) T cell responses: it's all downhill after their prime. *Nat Immunol.* 2002;3(7):601-2.
- 29 Simsek S, Duruturk L. A flow cytometric analysis of the biodefensive response of deciduous tooth pulp to carious stimuli during physiological root resorption. *Arch Oral Biol.* 2005;50(5):461-8.
- 30 Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest.* 2004;114(9):1198-208.
- 31 Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-) CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood.* 2005;105(7):2828-35.
- 32 Chen W, Ford MS, Young KJ, Zhang L. The role and mechanisms of double negative regulatory T cells in the suppression of immune responses. *Cell Mol Immunol.* 2004;1(5):328-35.
- 33 Pine CM, Harris RV, Burnside G, Merret MC. An investigation of the relationship between untreated decayed teeth and dental sepsis in 5-year-old children. *Br Dent J.* 2006; 200(1):45-7.

Table 1 – Primary antibodies used to characterize inflammatory cells in periradicular lesions

Antibody	Dilution	Clone / code	Source
anti-CD3	1:80	Policlonal / A0452	Dako
anti-CD4	1:50	1F6 / 18-2282	Zymed
anti-CD8	1:100	1A5 / 18-2289	Zymed

Table 2 – Patients data and percentage of positive T cells for each sample.

Sample	Diagnosis	Tooth	Sex	Age	% Positive T cells		
					CD3	CD4	CD8
1	Granuloma	74	M	9y 4m	-*	-*	1.2
2	Abscess	85	M	6y	3.6	0	0
3	Abscess	75	M	9y 1m	12.2	0	2.3
4	Abscess	85	M	9y 5m	5.6	0	2.5
5	Granuloma	85	F	5y	9.4	0,5	4.3
6	Granuloma	75	F	11y 4m	3.7	0	2.1
7	Abscess	85	M	7y 3m	3.8	0	3.2
8	Abscess	65	M	6y 10m	8.1	0	2.1
9	Abscess	74	F	6y 4m	-*	0	2.5
	Mean			7y 10m	6.62	0.06	2.37
	Standard Deviation			-	3.35	0.17	0.95

Legend: M: male; F: female; y: years; m: months

\* Inadequated section for analysis.

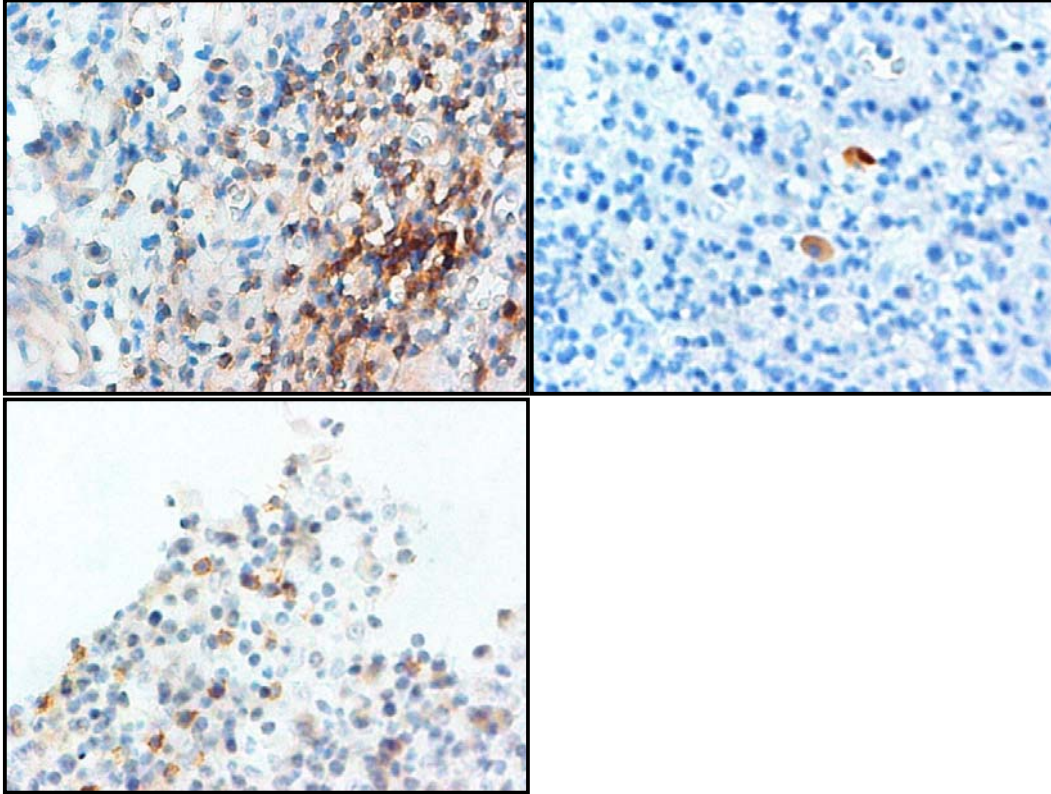


Figure 1 – Immunohistochemical staining for CD3+ (A), CD4+ (B) and CD8+ cells (C) in periapical lesion. Original magnification x66.

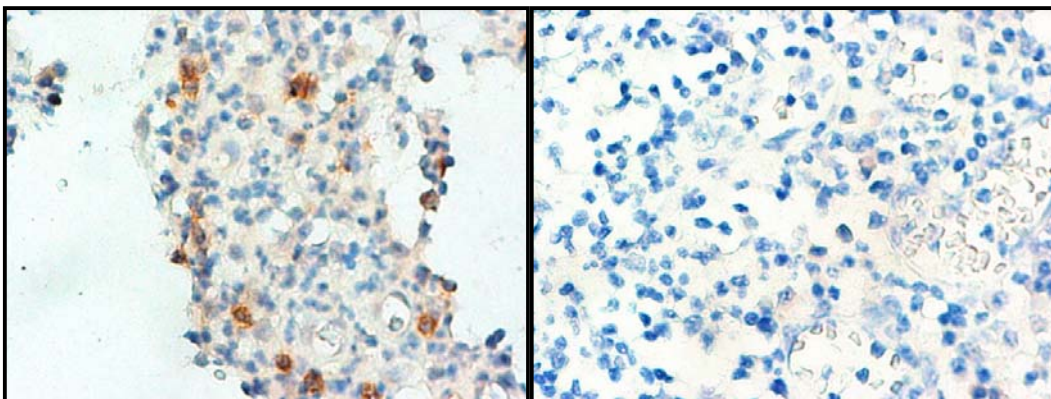


Figure 2 – Immunohistochemical staining for CD8+ (A) and CD4- cells (B) in periapical lesion. Original magnification x66.

### 3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Revinter; 1995.
- Alavi AM, Gulabivala K, Speight PM. Quantitative analysis of lymphocytes and their subsets in periapical lesions. *Int Endod J*. 1998;31(4):233-41.
- 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.
- Barkhordar RA, Desouza YG. Human T-lymphocyte subpopulations in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1988;65(6):763-6.
- Behrman RE. *Tratado de Pediatria*. 4 ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan; 1994. p. 811.
- Blattman JN, Cheng LE, Greenberg PD. CD8(+) T cell responses: it's all downhill after their prime. *Nat Immunol*. 2002;3(7):601-2.
- Bolan M, Rocha MJC. Histopathological study of physiological and pathological resorptions in human primary teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007.
- Bolan M. Estudo da expressão de linfócitos CD45RO e CD20, macrófagos CD68 e células de Langerhans CD1a em lesões periradiculares de dentes decíduos. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2007.
- Bourgeois C, Tanchot C. Mini-review CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation. *Eur J Immunol*. 2003;33(12):3225-31.
- Carmona IT, Diz Dios P, Scully C. An update on the controversies in bacterial endocarditis of oral origin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93(6):660-70.
- Carneiro-Sampaio MMS, Grumach AS. *Imunologia e Alergia Pediátrica*. São Paulo: Savier; 1992.
- Chen W, Ford MS, Young KJ, Zhang L. The role and mechanisms of double negative regulatory T cells in the suppression of immune responses. *Cell Mol Immunol*. 2004;1(5):328-35.
- Cordeiro, MM. Rocha, MJC. The effects of periradicular inflammation and infection on a primary tooth and permanent successor. *J Clin Pediatr Dent*. 2005;29(3):193-200.
- da Silva DB, Souza IP, Cunha MC. Knowledge, attitudes and status of oral health in children at risk for infective endocarditis. *Int J Paediatr Dent*. 2002;12(2):124-31.
- Droz D, Koch L, Lenain A, Michalski H. Bacterial endocarditis: results of a survey in a children's hospital in France. *Br Dent J*. 1997;183(3):101-5.
- Durward CS. Space maintenance in the primary and mixed dentition. *Ann R Australas Coll Dent Surg*. 2000;15:203-5.
- Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood*. 2005;105(7):2828-35

- Furseth R. The resorption processes of human deciduous teeth studied by light microscopy, microradiography and electron microscopy. *Arch Oral Biol.* 1968;13(4):417-31.
- Gorczynski R, Stanley J. *Imunologia Clínica.* Rio de Janeiro: Reichmann e Affonso Editores; 2001.
- Hanson LA, Korotkova M, Haversen L, Mattsby-Baltzer I, Hahn-Zoric M, Silfverdal SA, et al. Breast-feeding, a complex support system for the offspring. *Pediatr Int.* 2002;44(4):347-52.
- Hanson LA, Korotkova M, Lundin S, Haversen L, Silfverdal SA, Mattsby-Baltzer I, et al. The transfer of immunity from mother to child. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;987:199-206.
- Hanson LA, Korotkova M, Telemo E. Breast-feeding, infant formulas, and the immune system. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003;90(6 Suppl 3):59-63.
- Hanson LA, Korotkova M. The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection. *Semin Neonatol.* 2002;7(4):275-81.
- Hanson LA. Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1998;81(6):523-33.
- Hanson LA. Human milk and host defence: immediate and long-term effects. *Acta Paediatr Suppl.* 1999;88(430):42-6.
- Jameson SC. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(8):547-56.
- Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest.* 2004;114(9):1198-208.
- Kalra N, Sushma K, Mahapatra GK. Changes in developing succedaneous teeth as a consequence of infected deciduous molars. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2000;18(3):90-4.
- Kiss C. Cell-to-cell interactions. *Endodontic Topics.* 2004;8:88-103.
- Lawton AR, Cooper MD. Ontogeny of immunity. *Immunologic disorders in infants & children.* 4 ed. Philadelphia: Saunders Company; 1996. p. 1-11.
- Leroy R, Bogaerts K, Lesaffre E, Declerck D. Impact of caries experience in the deciduous molars on the emergence of the successors. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(2):106-10.
- Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J.* 2003;36(7):464-71.
- Lukic A, Vasilijic S, Majstorovic I, Vucevic D, Mojsilovic S, Gazivoda D, et al. Characterization of antigen-presenting cells in human apical periodontitis lesions by flow cytometry and immunocytochemistry. *Int Endod J.* 2006;39(8):626-36.
- Manual de imuno-histoquímica: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999.
- Philippi CK, Rados PV, Sant'ana Filho M, Barbachan JJ, Quadros OF. Distribution of CD8 and CD20 lymphocytes in chronic periapical inflammatory lesions. *Braz Dent J.* 2003;14(3):182-6.
- Piattelli A, Artese L, Rosini S, Quaranta M, Musiani P. Immune cells in periapical granuloma: morphological and immunohistochemical characterization. *J Endod.* 1991;17(1):26-9.
- Pine CM, Harris RV, Burnside G, Merrett MC. An investigation of the relationship between untreated decayed teeth and dental sepsis in 5-year-old children. *Br Dent J.* 2006;200(1):45-7; discussion 29.
- Rocha B, Tanchot C. CD8 T cell memory. *Semin Immunol.* 2004;16(5):305-14.
- Rodini CO, Lara VS. Study of the expression of CD68+ macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(2):221-7.



- Schluns KS, Lefrancois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(4):269-79.
- Serratine AC. Intensidade, localização e conseqüências da infecção em molares decíduos com cárie profunda, rarefação óssea na região da furca, perfuração do assoalho da câmara pulpar em raízes residuais, avaliadas sob microscopia óptica [Tese]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2002.
- Sigal LH, Ron Y. The immune response of normal children. *Immunology and inflammation - Basic mechanisms and clinical consequences.* New York: McGraw Hill; 1994. p. 563-71.
- Simsek S, Duruturk L. A flow cytometric analysis of the biodefensive response of deciduous tooth pulp to carious stimuli during physiological root resorption. *Arch Oral Biol.* 2005;50(5):461-8.
- Siqueira JF, Dantas CJS. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. Rio de Janeiro: Medsi; 2000.
- Smith AJ, Adams D. The dental status and attitudes of patients at risk from infective endocarditis. *Br Dent J.* 1993;174(2):59-64.
- Sprent J, Tough DF. T cell death and memory. *Science.* 2001;293(5528):245-8.
- Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Basic & Clinical Immunology.* 8th ed. Connecticut, USA: Appleton & Lange; 1997.
- Suzuki T, Kumamoto H, Kunimori K, Ooya K. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(1):46-52.
- Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J.* 1998;31(5):311-25.
- Tanchot C, Rocha B. CD8 and B cell memory: same strategy, same signals. *Nat Immunol.* 2003;4(5):431-2.
- Telemeo E, Hanson LA. Antibodies in milk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1996;1(3):243-9.
- Torabinejad M, Eby WC, Naidorf IJ. Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. *J Endod.* 1985;11(11):479-88.
- Vilela MMS. Desenvolvimento do sistema imune na criança. *Alergia e imunologia na infância e na adolescência.* São Paulo: Atheneu; 2001. p. 327-42.

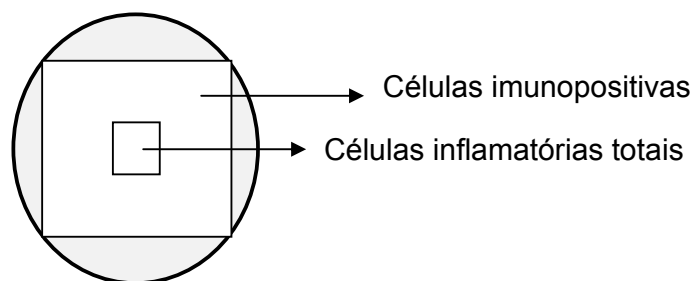
## APÊNDICES

### Apêndice A - Técnica de quantificação celular

Todos os cortes foram analisados com o microscópio Olympus BX 40, sob a mesma objetiva de 100X em óleo de imersão, com graticulo de Muller acoplado a uma das oculares. Este graticulo constitui-se de dois quadrantes onde o menor equivale a 1/9 do maior.

No quadrante maior foi contado o número de células imunopositivas e no menor o número de células inflamatórias totais. A porcentagem de células imunopositivas foi calculada com a seguinte fórmula: % células positivas = total de células imunopositivas/ total de células inflamatórias totais X 9.

Então, na área de maior infiltrado inflamatório foram contados 10 campos consecutivos, e os valores obtidos foram somados e divididos por 10 para se obter a média por corte histológico.



## Apêndice B - Registro da contagem de células

<b>1</b> campos	<b>CD3*</b>		<b>CD4 *</b>		<b>CD8</b>	
	n	N	n	N	n	N
1					1	6
2					0	4
3					0	2
4					2	5
5					2	5
6					1	5
7					0	7
8					0	7
9					0	5
10					0	8
<b>total</b>					6	486
<b>%</b>					1,2%	

\* sem material para análise

% células positivas =  $n / N \times 9$

<b>2</b> campos	<b>CD3</b>		<b>CD4</b>		<b>CD8</b>	
	n	N	N	N	n	N
1	4	8	0	3	0	2
2	1	6	0	2	0	2
3	2	3	0	3	0	3
4	1	5	0	2	0	2
5	1	5	0	2	0	2
6	2	5	0	1	0	1
7	1	5	0	3	0	3
8	4	6	0	2	0	2
9	1	6	0	2	0	1
10	1	7	0	1	0	1
<b>total</b>	18	495	0	189	0	153
<b>%</b>	3,6		0		0	

<b>3</b> campos	<b>CD3</b>		<b>CD4</b>		<b>CD8</b>	
	n	N	N	N	n	N
1	10	5	0	4	1	2
2	7	5	0	3	0	4
3	6	7	0	3	1	3
4	6	10	0	2	2	5
5	4	5	0	3	1	0
6	2	7	0	3	0	3
7	5	7	0	3	0	4
8	10	5	0	2	0	3

<b>9</b>	9	6	0	2	0	2
<b>10</b>	7	3	0	1	1	4
<b>total</b>	66	540	0		6	252
<b>%</b>	12,2		0		2,3	

<b>4</b>	<b>CD3</b>		<b>CD4</b>		<b>CD8</b>	
<b>campos</b>	<b>n</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>n</b>	<b>N</b>
<b>1</b>	2	3	0	4	3	6
<b>2</b>	4	5	0	3	1	7
<b>3</b>	4	5	0	3	2	5
<b>4</b>	1	7	0	3	1	3
<b>5</b>	2	3	0	2	0	2
<b>6</b>	1	4	0	3	0	4
<b>7</b>	2	3	0	3	1	2
<b>8</b>	1	5	0	2	0	4
<b>9</b>	2	4	0	2	0	3
<b>10</b>	4	6	0	2	1	3
<b>total</b>	23	405	0	243	9	351
<b>%</b>	5,6		0		2,5	

<b>5</b>	<b>CD3</b>		<b>CD4</b>		<b>CD8</b>	
<b>campos</b>	<b>n</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>n</b>	<b>N</b>
<b>1</b>	10	12	1	12	4	6
<b>2</b>	12	11	0	10	5	5
<b>3</b>	11	10	0	9	4	5
<b>4</b>	7	6	0	12	1	5
<b>5</b>	6	6	0	5	2	4
<b>6</b>	3	7	1	10	1	3
<b>7</b>	9	12	0	12	2	8
<b>8</b>	6	13	1	6	0	6
<b>9</b>	7	9	0	5	0	4
<b>10</b>	9	8	1	6	1	5
<b>total</b>	80	846	4	783	20	459
<b>%</b>	9,4		0,5		4,3	

<b>6</b>	<b>CD3</b>		<b>CD4</b>		<b>CD8</b>	
<b>campos</b>	<b>n</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>n</b>	<b>N</b>
<b>1</b>	2	4	0	4	1	12
<b>2</b>	1	6	0	2	2	8
<b>3</b>	3	5	0	4	4	7
<b>4</b>	3	9	0	5	1	4
<b>5</b>	2	8	0	3	2	5
<b>6</b>	1	7	0	3	0	4
<b>7</b>	2	6	0	3	1	6
<b>8</b>	2	4	0	4	1	5
<b>9</b>	2	3	0	4	0	4

<b>10</b>	1	4	0	2	0	7
<b>total</b>	19	504	0	306	12	558
<b>%</b>	3,7		0		2,1	

<b>7</b>	<b>CD3</b>		<b>CD4</b>		<b>CD8</b>	
<b>campos</b>	<b>n</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>n</b>	<b>N</b>
<b>1</b>	2	4	0	2	1	3
<b>2</b>	3	5	0	1	2	2
<b>3</b>	1	4	0	3	0	2
<b>4</b>	1	3	0	4	0	1
<b>5</b>	2	2	0	4	1	1
<b>6</b>	1	4	0	3	1	0
<b>7</b>	0	4	0	2	0	0
<b>8</b>	1	5	0	2	0	2
<b>9</b>	1	2	0	1	0	3
<b>10</b>	0	2	0	2	0	3
<b>total</b>	12	315	0	216	5	153
<b>%</b>	3,8		0		3,2	

<b>8</b>	<b>CD3</b>		<b>CD4</b>		<b>CD8</b>	
<b>campos</b>	<b>n</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>n</b>	<b>N</b>
<b>1</b>	4	5	0	4	1	3
<b>2</b>	5	4	0	2	0	2
<b>3</b>	3	5	0	1	0	2
<b>4</b>	4	6	0	3	1	3
<b>5</b>	4	5	0	2	0	2
<b>6</b>	3	5	0	3	0	1
<b>7</b>	3	5	0	1	0	4
<b>8</b>	2	3	0	1	1	4
<b>9</b>	4	3	0	4	1	3
<b>10</b>	1	4	0	3	0	2
<b>total</b>	33	405	0	216	5	234
<b>%</b>	8,1		0		2,1	

<b>9</b>	<b>CD3*</b>		<b>CD4</b>		<b>CD8</b>	
<b>campos</b>	<b>n</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>n</b>	<b>N</b>
<b>1</b>			0	3	2	4
<b>2</b>			0	4	1	3
<b>3</b>			0	3	1	3
<b>4</b>			0	3	0	2
<b>5</b>			0	2	0	1
<b>6</b>			0	4	1	3
<b>7</b>			0	3	1	4
<b>8</b>			0	4	0	4

<b>9</b>			0	2	0	4
<b>10</b>			0	2	1	3
<b>total</b>			0	270	7	279
<b>%</b>			0		2,5	

\* sem material para análise

## **ANEXOS**

### **ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos**



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE CEP: 88040-900 - FLORIANÓPOLIS - SC  
TELEFONE (048) 234-1755 - FAX (048) 234-4069

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

#### Parecer Consubstanciado

Projeto nº: 110/2002

Título do Projeto: Achados histológicos encontrados em dentes deciduos com reabsorção fisiológica e patológica.

Pesquisador Responsável: Prof. Maria José de Carvalho Rocha.

Instituição onde será realizado o estudo: Clínica do Programa de PG em Odontologia - UFSC

Data de apresentação ao CEPESH: 07/07/2002

Objetivos: Realizar um estudo histológico através da microscopia óptica em dentes deciduos com reabsorção fisiológica e patológica. Serão analisadas todas as fichas correspondente ao material contido em frascos com formol a 10%. As fichas completas e com material adequado, serão radiografadas e fotografadas. A distribuição da amostra será feito de acordo com o padrão de reabsorção (patológica ou fisiológica).

Sumário do Projeto: É um projeto bem elaborado, relevante, os autores sobejamente capacitados, e a documentação apresentada está completa e correta. Somos de parecer pela aprovação do presente processo.

Comentários frente à Resolução CNS 196/96 e complementares: Trata-se de um projeto relevante, bem elaborado, seus autores estão capacitados e a documentação apresentada de conformidade com o que a legislação requer. Somos de parecer pela aprovação do presente projeto.

Parecer do CEPESH:

aprovado

reprovado

com pendência (detalhes pendência)\*

retirado

aprovado e encaminhado ao CONEP

Comentários frente à Resolução CNS 196/96 e complementares: Trata-se de um projeto relevante, bem elaborado, seus autores estão capacitados e a documentação apresentada de conformidade com o que a legislação requer. Somos de parecer pela aprovação do presente projeto.

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado por unanimidade, em reunião deste Comitê na data de 29/07/2002.

Florianópolis, 29 de maio de 2002

Profa Vera Lúcia Bosco  
Coordenadora

## ANEXO B - Currículo resumido da autora

- 2004 - atual** Doutorado em Odontologia.  
Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Brasil.  
*Título:* Pesquisa de subpopulações de linfócitos T em lesões perirradiculares de dentes decíduos humanos
- 2002 - 2003** Mestrado em Odontologia.  
Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Brasil.  
*Título:* Avaliação in vitro da difusão de íons Ca e OH de materiais endodônticos em dentes decíduos, *Ano de Obtenção:* 2004.  
*Orientador:* Maria José de Carvalho Rocha.  
*Palavras-chave:* hidróxido de cálcio; espectrometria de absorção atômica; difusão de íons hidroxila e cálcio; dentes decíduos.
- 2000 - 2001** Especialização em Odontopediatria.  
Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Brasil. Ano de finalização: 2001.
- 1995 - 1999** Graduação em Odontologia.  
Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Brasil.

### **Produção bibliográfica**

#### **Capítulos de livros publicados**

ROCHA, Maria José de Carvalho; NUNES, A. C. G. P. Traumatismos em Dentes Permanentes de Crianças e Adolescentes . In: Sada Assed. (Org.). Odontopediatria - Bases Científicas para a Prática Clínica. 1 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005, v. 1, p. 769

#### **Artigos completos publicados em periódicos**

RAMOS-JORGE, ML ; BOSCO, Vera Lúcia ; PERES, Marco Aurélio; NUNES, A. C. G. P. The impact of treatment of dental trauma on the quality of life of adolescents - a case-control study in southern Brazil.. **Dental Traumatology**, v. 23, p. 114-119, 2007.

BOLAN, Michele ; NUNES, A. C. G. P.; ROCHA, Maria José de Carvalho ; CANTO, Graziela de Luca . Talon cusp: Report of a case. **Quintessence International**, Germany, v. 37, n. 7, p. 509-514, 2006.

NUNES, A. C. G. P; ROCHA, Maria José de Carvalho . Hydroxyl and calcim ions diffusion from endodontic materials through roots of primary teeth- in vitro study. **Journal Of Applied Oral Science**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 187-192, 2005.

#### **Resumos publicados em anais de congressos**

NUNES, Ana Cristina Gerent Petry ; ROCHA, M. J. C. Cronologia de Erupção, rizogênese e rizólise na dentição decídua de cães da raça Beagle para pesquisas in vivo. In: 22a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica-SBPqO, 2005, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research, 2005. v. 19. p. 131-131.

NUNES, Ana Cristina Gerent Petry ; ROCHA, M. J. C . Qual a atitude do Pediatra no atendimento da criança com o dente traumatizado?. In: II Congresso Internacional de Especialidades Pediátricas, 2005, Curitiba. Criança 2005, 2005. p. 14.



BOLAN, Michele; NUNES, Ana Cristina Gerent Petry ; ROCHA, M. J. C. Integração Cirurgião dentista vs Pediatra no esclarecimento das consequências sistêmicas da infecção dental. In: II Congresso Internacional de Especialidades Pediátricas, 2005, Curitiba. Criança 2005, 2005. v. 2. p. 67.

NUNES, A. C. G. P.; ROCHA, Maria José de Carvalho . Avaliação in vitro da difusão de íons Ca e OH de materiais endodônticos em dentes decíduos. Anais V Encontro Sul Brasileiro de Odontopediatria. Jaraguá do Sul : Gráfica Régis, 2005. v. 1. p. 14.

NUNES, A. C. G. P.; CARDOSO, Mariane ; ROCHA, Maria José de Carvalho . Importancia da proervação de traumas leves em dentes permanentes. In: Congresso Nacional da ABOPREV, 2004, Porto Alegre, 2004.

NUNES, A. C. G. P.; ROCHA, Maria José de Carvalho . Apexificação em dentes permanentes jovens traumatizados. In: Congresso Nacional da ABOPREV, 2004, Porto Alegre, 2004.

KUMMER, Thais Regina ; NUNES, A. C. G. P. ; BOLAN, Michele ; ROCHA, Maria José de Carvalho . Considerações técnicas na realização de radiografias em crianças de até 36 meses. In: Congresso Nacional da ABOPREV, 2004, Porto Alegre, 2004.

NUNES, A. C. G. P.; ROCHA, Maria José de Carvalho . Avaliação in vitro da difusão de íons Ca e OH de materiais endodônticos em dentes decíduos. In: 21a Reunião anual da sociedade brasileira de pesquisa odontológica, 2004, Águas de Lindóia, 2004.

BOLAN, Michele ; NUNES, A. C. G. P. Abordagem endodontica multipla em criança - técnica UFSC. In: 16o Congresso Internacional de Odontologia do Rio de Janeiro, 2003, Rio de Janeiro, 2003.

ARRUDA, Maria Luiza; NUNES, A. C. G. P.; CORDEIRO, Mabel Mariela Rodrigues . Alteração de desenvolvimento de dente permanente após infecção no decíduo antecessor. In: encontro academico de atualização odontológica, 2003, Florianópolis, 2003

NUNES, A. C. G. P; BOLAN, Michele ; ROCHA, Maria José de Carvalho ; CANTO, Graziela de Luca . Cúspide em Garra: relato de um caso clínico. In: XXXIV Encontro do grupo brasileiro de professores de ortodontia e odontopediatria, 2003, Diamantina, 2003.

NUNES, A. C. G. P.; CARDOSO, Mariane ; ROCHA, Maria José de Carvalho . Importance of follow-up of light traumas in permanent teeth. In: XIII World Congress on dental traumatology, 2003, Santiago. Networking the evidence: Los expertos comunican la evidencia, 2003. v. 1. p. 100.

NUNES, A. C. G. P.; ROCHA, Maria José de Carvalho ; CARDOSO, Mariane . Repair of the periapical lesions in traumatized teeth. In: XIII World Congress on dental traumatology, 2003, Santiago. Networking the evidence: Los expertos comunican la evidencia, 2003. v. 1. p. 72.

NUNES, A. C. G. P.; BOLAN, Michele ; ROCHA, Maria José de Carvalho . Technical considerations in accomplishing x-rays in children up to 36 months of age. Dentomaxillofacial Radiology, v. 32, n. 4, p. 263, 2003.

NUNES, A. C. G. P.; CARDOSO, Mariane ; ROCHA, Maria José de Carvalho . Importância da proervação de traumas leves em dentes permanentes. Jaraguá do Sul. Encontro Sul Brasileiro de Odontopediatria 4, 2003. v. 1. p. 24.

NUNES, A. C. G. P.; ROCHA, Maria José de Carvalho ; FRANCESCHINI, Caroline; GRASSI, Michele Ribeiro . Importância da proervação de traumas leves em dentes permanentes. In: XIX Congresso brasileiro de odontopediatria, 2003, Campo Grande, 2003

NUNES, A. C. G. P ; CARDOSO, Mariane ; ROCHA, Maria José de Carvalho . Reparo das lesões em dentes permanentes traumatizados. In: 16o Congresso Internacional de Odontologia do Rio de Janeiro, 2003, Rio de Janeiro, 2003.

NUNES, A. C. G. P.; GRASSI, Michele Ribeiro ; CARDOSO, Mariane ; FRANCESCHINI, Caroline ; ROCHA, Maria José de Carvalho . Solução temporária para perda precoce de dentes decíduos anteriores traumatizados. In: XIX Congresso brasileiro de odontopediatria, 2003, Campo Grande, 2003.

NUNES, A. C. G. P.; CARDOSO, Mariane ; GRASSI, Michele Ribeiro ; FRANCESCHINI, Caroline ; ROCHA, Maria José de Carvalho . Solução temporária para perda precoce de dentes anteriores traumatizados. Jaraguá do Sul. Encontro Sul Brasileiro de Odontopediatria, 2003. v. 1. p. 35

NUNES, A. C. G. P.; CARDOSO, Mariane ; ROCHA, Maria José de Carvalho . Solução temporária para perda precoce de dentes permanentes anteriores traumatizados em adolescentes. In: 16o Congresso Internacional de Odontologia do Rio de Janeiro, 2003, Rio de Janeiro, 2003.

CORDEIRO, Mabel Mariela Rodriguez; NUNES, A. C. G. P.; REIS, Claudina Lizarda da Silva ; OLIVEIRA, Joeci de . Traumatismos de dentes permanentes na comunidade:o papel da UFSC. In: 3a SEPEX - Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFSC, 2003, Florianópolis. Anais da 3a SEPEX, 2003. v. 1.

CORDEIRO, Mabel Mariela Rodrigues; NUNES, A. C. G. P.; ROCHA, Maria José de Carvalho . Avaliação da relação entre o tempo de permanência do dente avulsionado na cavidade bucal e o protocolo de atendimento. Anais da 19a Reunião Anual da SBPqO. São Paulo : Faculdade de Odontologia: Universidade de São Paulo, 2002. v. 16. p. 186.

NUNES, A. C. G. P.; CARDOSO, Mariane; ROCHA, Maria José de Carvalho . Reparo das lesões em dentes permanentes traumatizados v.s. atendimento precoce. Florianópolis- SC. 12o Livro anual do grupo brasileiro de professores de ortodontia e odontopediatria. Belo Horizonte MG : Fumarc, 2002. v. 1.

NUNES, A. C. G. P.; ROCHA, Maria José de Carvalho; GROSSEMAN, S.. Abordagem das emergências clínicas pelo odontopediatra. Florianópolis. 12o Livro anual do grupo brasileiro de professores de ortodontia e odontopediatria. Belo Horizonte MG: Fumarc, 2002. v. 1.

NUNES, A. C. G. P.; COELHO, Meire Ferreira; OLIVEIRA, Joeci . Proteção as radiações do paciente odontopediátrico e gestantes. Florianópolis. 12o Livro anual do grupo brasileiro de ortodontia e odontopediatria. Belo Horizonte : Fumarc, 2002. v. 1.

NUNES, A. C. G. P.; CARDOSO, Mariane; ROCHA, Maria José de Carvalho. Traumas leves v.s sequelas, A importância da preservação. Canela - RS. 11º Livro anual do grupo brasileiro de professores de ortodontia e odontopediatria. Belo Horizonte: Fumarc, 2001. v. 1. p. 86.

NUNES, A. C. G. P.; CARDOSO, Mariane; ROCHA, Maria José de Carvalho. Solução temporária para perda precoce de dentes anteriores traumatizados. Canela-RS. 11º Livro Anual do Grupo brasileiro de professores de ortodontia e odontopediatria. Belo Horizonte : Fumarc, 2001. v. 1. p. 203-204

COSTA, Carolina Covolo da; CARDOSO, Mariane; NUNES, A. C. G. P. ; ROCHA, Maria José de Carvalho . Soluções temporárias para perda precoce de dentes permanentes anteriores traumatizados em adolescentes. In: 10 Congresso da ABOPREV. Rio de Janeiro : ABOPREV, 2001. p. 35.

COSTA, Carolina Covolo da ; CARDOSO, Mariane ; NUNES, A. C. G. P. ; ROCHA, Maria José de Carvalho . In: XXII Semana Odontológica de Santa Maria, 2001.