

**MICHELE BOLAN**

**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA PRESENÇA DE LINFÓCITOS T,  
LINFÓCITOS B E MACRÓFAGOS EM LESÕES PERIRRADICULARES DE  
DENTES DECÍDUOS.**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Odontologia, da  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
como parte dos requisitos 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

MICHELE BOLAN

**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA PRESENÇA DE LINFÓCITOS T,  
LINFÓCITOS B E MACRÓFAGOS EM LESÕES PERIRRADICULARES DE  
DENTES DECÍDUOS.**

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, 07 de fevereiro 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<sup>a</sup>. Elena Riet Correa Rivero  
*Membro*

---

Prof. Dr. Paulo Nelson Filho  
*Membro*

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Mariane Cardoso  
*Membro*

---

Prof. Dr. Edelson Flavio Moratto  
*Membro*

*À Deus,*  
*por estar sempre por perto me iluminando e me guiando,*  
*pelas oportunidades que insistes, incansavelmente em me oferecer,*  
*por me permitir sonhar!*

*Aos meu queridos e amados pais, **Evacir e Maristela***  
*por permitirem a realização deste sonho.*  
*Obrigada porque, mesmo distantes, estiveram sempre ao meu lado.*  
*Obrigada pela minha educação, por me ensinarem a importância da*  
*responsabilidade e da busca pela felicidade. Não sei como*  
*expressar em palavras todo meu respeito, amor e gratidão a*  
*vocês. Mãe, obrigada pela confiança, pelo apoio nas minhas*  
*decisões e pelo incentivo a ir sempre em frente.*

## **Agradecimento Especial**

Agradeço a minha orientadora, **Maria José de Carvalho Rocha** que viveu comigo o desejo de realizar este sonho. Obrigada por acreditar que eu conseguiria. Obrigada pela orientação segura, por estar sempre disposta a ajudar, pelas palavras de incentivo, pelos ensinamentos e o carinho. Obrigada por ser cúmplice das minhas idéias e experiências e por compartilhar comigo as suas... Obrigada por se preocupar comigo e com meu futuro. Obrigada por tornar tão agradável a realização desta jornada. Professora, por favor, esteja sempre por perto para que eu possa continuamente aprender um pouco mais, para ser não somente uma profissional melhor, mas principalmente um ser humano melhor. Obrigada por me permitir ser mais feliz.

Muito obrigada!

## AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, **Cristiane, Renata, Rafael**, sei que mesmo longe estarão sempre ao meu lado, orgulhosos das minhas conquistas. Obrigada por formarem esta maravilhosa família, a quem devo todo o amor e respeito.

À Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do seu coordenador Prof<sup>o</sup>. Dr. **Ricardo de Souza Vieira**, pela oportunidade de aprendizado.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC, em especial aos da Área de Concentração Odontopediatria, Prof<sup>a</sup> Dra. **Maria José de Carvalho Rocha**, Prof<sup>a</sup> Dra. **Vera Lucia Bosco**, Prof<sup>a</sup> Dra. **Isabel Cristina Santos Almeida**, Prof<sup>o</sup> Dr. **Ricardo de Souza Vieira**, Prof<sup>a</sup> Dra. **Joecí de Oliveira** e psicóloga **Rosamaria Areal** pela dedicação, ensinamentos e amizade constante. Obrigada por acreditarem em mim.

Obrigada aos meus **tios, tias, primos e primas**, por vibrarem comigo a cada conquista.

Em especial, aos meus tios **Cirlene e Luiz** e aos meus primos **Luciana e Tiago**, pela convivência, por me receberem com carinho e atenção para ouvir meus problemas e minhas vitórias. Obrigada por acreditarem em mim e sempre me incentivarem.

A minha avó **Maria Wilma** e meu tio **Tarcísio**, por me auxiliarem financeiramente na realização dos meus sonhos, pelo carinho incondicional, pelas palavras de ajuda e coragem.

Ao meu amado **Eduardo**, pela companhia, carinho e incentivo. Obrigada pela confiança, dedicação, pelo amor nas horas de chatece, pela compreensão nas horas de nervosismo, pelo sorriso nas horas de alívio. Obrigada por ser tão especial. Obrigada pelo auxílio na tradução do artigo.

Aos meus colegas e amigos de Doutorado, **Ana, Ângela, Carla, Eduardo, Isabelita, Meire e Miriam**, pelo companheirismo, apoio e amizade.

Ao professor **Cleo Nunes de Souza**, pela grandeza de coração e sua vontade de sempre ajudar a todos.

A professora **Elena Riet Correa**, por compreender e se dispor a auxiliar incondicionalmente. Obrigada por me receber com carinho e atenção para ouvir minhas dúvidas e ajudar a solucioná-las.

As minhas amigas **Mariane, Maria Letícia, Taís e Karin** pela amizade durante estes anos de aprendizado e realizações. Agradeço a cumplicidade, lealdade, por escutarem. Obrigada pela ajuda nos trabalhos, solução das dúvidas e compartilharem suas experiências profissionais e pessoais.

Ao setor de patologia do Hospital Universitário, em especial a **Claúdia, Daniele e Gabriella** pelo auxílio, atenção no preparo e obtenção das lâminas.

Às funcionárias **Beth e Ivalda** da disciplina de Odontopediatria, pela atenção e carinho com que sempre atenderam às minhas solicitações.

Ao curso de Agronomia da UFSC, representado pelo professor Dr. **Miguel Pedro Guerra**, por permitir a utilização do fotomicroscópio para a realização desta pesquisa, e à funcionária **Luísa**, pelo auxílio durante a execução da parte experimental.

Ao laboratório Santa Luzia, representado pela bioquímica **Márcia Roberge**, pelo empréstimo do microscópio e do graticulo.

À secretária da pós-graduação, **Ana Maria Frandolozo**, pela presteza e disponibilidade.

A **TODOS** os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste sonho.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>           | <b>11</b> |
| <b>2 ARTIGO.....</b>                     | <b>22</b> |
| <b>2.1 Versão em Português.....</b>      | <b>22</b> |
| 2.1.1 Tabelas.....                       | 39        |
| 2.1.2 Figuras.....                       | 40        |
| <b>2.2 Versão em Inglês.....</b>         | <b>42</b> |
| 2.2.1 Tabelas.....                       | 57        |
| 2.2.2 Figuras.....                       | 58        |
| <b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b> | <b>60</b> |
| <b>4 APÊNDICE.....</b>                   | <b>64</b> |
| <b>5 ANEXO.....</b>                      | <b>81</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|               |   |
|---------------|---|
| <b>IgG</b>    | - Imunoglobulina G                      |
| <b>IgA</b>    | - Imunoglobulina A                      |
| <b>IgE</b>    | - Imunoglobulina E                      |
| <b>IgM</b>    | - Imunoglobulina M                      |
| <b>CD45RO</b> | - clone de diferenciação 45RO           |
| <b>CD20</b>   | - clone de diferenciação 20             |
| <b>CD68</b>   | - clone de diferenciação 68             |
| <b>CD1a</b>   | - clone de diferenciação 1a             |
| <b>%</b>      | - por cento                             |
| <b>pH</b>     | - potencial hidrogeniônico              |
| <b>ATPS</b>   | - 3-aminopropyltriethoxysilene          |
| <b>EDTA</b>   | - etileno diamino-tetracético dissódico |
| <b>PBS</b>    | - tampão fosfato salina                 |
| <b>°C</b>     | - graus centígrados                     |
| <b>M</b>      | - molar                                 |
| <b>mM</b>     | - milimolar                             |
| <b>kDa</b>    | - quilo dalton                          |
| <b>µm</b>     | -micro metro                            |
| <b>+</b>      | - positivo                              |
| <b>SD</b>     | - standard deviation                    |



BOLAN, Michele. **Estudo imuno-histoquímico da presença de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos em lesões perirradiculares de dentes decíduos.** 2007. 86 f. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de Concentração Odontopediatria) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## RESUMO

A lesão periapical é resultado de uma reação inflamatória local causada por microrganismos do canal radicular infectado e seus produtos. A interação entre as células inflamatórias e os microrganismos suscita uma resposta imune específica e inespecífica. Reações imunológicas mediadas por linfócitos T e B e macrófagos têm sido implicadas em lesões periapicais em dentes permanentes. Devido à falta de estudos relacionados à participação do sistema imune em lesões perirradiculares em dentes decíduos e à própria imaturidade do sistema imunológico da criança, esta pesquisa propôs verificar a presença de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos em lesões perirradiculares de dentes decíduos. Quatorze lesões perirradiculares (abscesso agudo, abscesso crônico e granuloma) foram analisadas. A técnica de imuno-histoquímica foi realizada para identificar linfócitos T, linfócitos B e macrófagos, utilizando anticorpos monoclonais específicos anti-humanos CD45RO, CD20 e CD68, respectivamente. As células foram quantificadas por meio de análise microscópica dos cortes histológicos. Os dados revelaram que a média da porcentagem de células positivas CD45RO foi de 11,76; de células CD20 positivas foi de 5,25; células positivas CD68 foi de 10,92. Os resultados indicam que linfócitos T e B e macrófagos constituem a maior parte do infiltrado inflamatório em lesões perirradiculares em dentes decíduos indicando que a reação imune humoral e mediada por células está presente. É relevante a participação do sistema imune nos processos inflamatórios perirradiculares em dentes decíduos.

BOLAN, Michele. *Immunohistochemical study of presence of T cells, B cells and macrophages in periradicular lesions of deciduous teeth*. 2007. 86 f. 2007. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de Concentração Odontopediatria) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## **ABSTRACT**

The periapical lesion is the result of a local inflammatory reaction caused by bacteria and its products, which are placed on the root canal. The interaction between inflammatory cells and bacteria elicit both specific and non-specific immune responses. Immunological reactions mediated by T cells, B cells and macrophages have been observed in periapical lesions of permanent teeth. Due to the lack of studies evaluating the role of the immune system in periapical lesions of deciduous teeth and considering the potentially systemic effects that these infections can cause in children, especially because of the immaturity of their immune system, we sought to evaluate the presence of T cells, B cells and macrophages on periradicular lesions in deciduous teeth. 14 periradicular lesions (acute abscess, chronic abscess and granuloma) were analyzed. The immunohistochemistry technique was performed using CD45RO, CD20, CD68 monoclonal antibodies aiming to identify T cells, B cells and macrophages, respectively. Cells were quantified by microscopic analysis of histological sections. Mean percentage of CD45RO + cells was 11.76; CD20+ cells was 5.25; CD68+ cells was 10.92. Our results showed that T and B cells and macrophages comprise the majority of the inflammatory infiltrate on periradicular lesions in deciduous teeth. We concluded that both humoral and cell mediated immune reactions take place in periradicular lesions of deciduous teeth. The immune system plays an important role on the periradicular inflammatory processes in deciduous teeth.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

### **1 Considerações Gerais sobre o Sistema Imune**

O sistema imunológico é formado por um complexo de várias células, cuja principal função é reconhecer os antígenos que penetram no organismo, neutralizá-los e ou eliminá-los (Siqueira, Dantas, 2000).

A primeira linha de defesa, chamada de sistema imune inato ou inespecífico, é formada por células e moléculas que conferem proteção imediata ao hospedeiro, como os fagócitos (macrófagos e neutrófilos), células natural killer e o sistema complemento (Takahashi, 1998; Delves, Roitt, 2000a; Gorczynski, Stanley, 2001). Há ainda o sistema imune adaptativo ou específico, formado principalmente por linfócitos.

Em contraste com a rapidez da resposta imune inata, as células envolvidas com a resposta imune adaptativa necessitam de dias para desempenhar sua ação efetora, e cada célula reconhece somente um antígeno. Após o contato inicial com o antígeno, há uma expansão clonal destas células, conservando um suprimento de células de memória, que podem responder rapidamente à exposição subsequente ao mesmo antígeno. Os linfócitos, uma vez ativados, produzem moléculas solúveis como anticorpos, citocinas e quimiocinas, que vão auxiliar na resposta imune. A resposta inata e adaptativa atua simultaneamente (Delves, Roitt, 2000a; Medzhitov, Janeway, 2000; Gorczynski, Stanley, 2001).

O recrutamento e ativação das células da resposta imune adaptativa durante a exposição a um antígeno dependem da ação das células apresentadoras de antígeno (macrófagos, linfócito B e células dendríticas) e das citocinas durante a ação da resposta imune inata, que resultará na produção de moléculas efetoras (anticorpo e citocina) (Delves, Roitt, 2000a; Gorczynski, Stanley, 2001; Jiang, Chess, 2006).

Quando um microrganismo vence a barreira inespecífica, geralmente provoca uma reação inflamatória local, com a ocorrência dos eventos próprios da inflamação, como o extravasamento de plasma e aumento do número de leucócitos que por vezes são

suficientes para impedir a progressão da infecção. Entretanto, o edema local provoca um aumento da drenagem linfática que acaba por levar antígenos livres ou associados a células, até o linfonodo. No linfonodo, ocorrerá a interação entre o antígeno e o linfócito por meio das células apresentadoras de antígenos. Estas células apresentam em sua membrana moléculas codificadas capazes de reconhecer inespecificamente o antígeno e apresentá-los aos linfócitos T que, a partir deste momento, tornam-se ativados (Klein, Sato, 2000a,b). Os linfócitos T ativados são responsáveis pela ativação dos linfócitos B que irão se diferenciar em plasmócitos e secretar imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD) (Delves, Roitt, 2000b).

A simples interação de uma imunoglobulina solúvel com o antígeno poderá impedir que este interaja com outra molécula do organismo. Em se tratando de uma infecção, esta propriedade participará da neutralização de toxinas e do bloqueio de adesão de bactérias a superfícies (Delves, Roitt, 2000b).

O sistema complemento constitui um conjunto de proteínas que facilitam a eliminação dos microrganismos, principalmente na lise de bactérias extracelulares gram negativas, possuindo um papel importante na resistência anti-infecciosa. Existem duas vias para ativação do complemento, denominadas vias de ativação alternativa e clássica. Para ativar a via alternativa do complemento (imunidade inata) é necessária a deposição dos fragmentos gerados espontaneamente em uma superfície celular microbiana. Por outro lado, o estímulo inicial da via clássica do complemento (imunidade adaptativa) é a ligação da IgM ou IgG à um antígeno (Delves, Roitt, 2000b; Walport, 2001a,b).

## **2 Considerações Gerais sobre o Sistema Imune na Criança**

Todas as células que fazem parte do sistema imune derivam-se de células primitivas multipotentes. Estas células primordiais são precursoras tanto das linhagens linfocitárias, como das linhagens fagocitárias (série granulocitária, sistema monócito-macrófago), e também das linhagens eritrocitárias e megacariocitária (Delves, Roitt, 2000a).

O sistema imunológico na criança inicia seu desenvolvimento nas primeiras semanas de vida intra-uterina, alcançando sua maturação na adolescência. As células do sistema imunológico são encontradas inicialmente no saco vitelínico, depois no fígado fetal e a partir da segunda metade da gestação, na medula óssea. Deste ponto em diante, há uma migração para os sítios de diferenciação, sendo o timo para os linfócitos T e a medula óssea para os linfócitos B (Carneiro-Sampaio, Grumach, 1992; Igal, Ron, 1994).

Já a linhagem de células fagocitárias torna-se evidente durante o segundo mês de gestação, antes mesmo do aparecimento dos linfócitos. Estas células após sua diferenciação na medula óssea são encontradas livres na corrente sanguínea. No período neonatal, o número de neutrófilos e macrófagos é semelhante ao de adultos normais. Entretanto, a adesão dos neutrófilos ao endotélio é reduzida em aproximadamente 40% com relação à apresentada pelos adultos. Isto torna a migração dos neutrófilos através dos vasos sanguíneos diminuída e a quimiotaxia destas células em direção ao agente agressor mais lenta. As taxas das substâncias quimiotáticas para os neutrófilos só alcançam a competência do adulto quando a criança completa 5 anos de idade (Carneiro-Sampaio, Grumach, 1992; Igal, Ron, 1994).

Quanto à resposta imune mediada por células T, após a 13ª semana de vida intra-uterina torna-se periférica, podendo ser detectados no baço, no fígado e no sangue

circulante, onde posteriormente poderão interagir com os antígenos e proliferar (Carneiro-Sampaio, Grumach, 1992; Igal, Ron, 1994).

As crianças apresentam ao nascimento uma proporção maior de linfócitos TCD4 em relação aos TCD8 (3:1) que no adulto, no qual esta proporção é de 2:1. No entanto, os valores tornam-se 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 efectoras da resposta imunológica adaptativa já estejam presentes em números idênticos aos do adulto, a produção de certas linfocinas, interferon  $\gamma$  e interleucina-4 estão diminuídas no início da infância (Carneiro-Sampaio, Grumach, 1992).

Em relação à resposta imune produtora de anticorpos (resposta humoral), os linfócitos B dos bebês têm a capacidade de se diferenciarem em plasmócitos produtores de IgM, alcançando os valores totais equivalentes ao adulto por volta de 1 ano de idade. Contudo, apenas a partir dos 2 anos de idade se diferenciarão em plasmócitos produtores de IgG e aos 5 anos serão capazes de produzirem IgA. Este fenômeno ocorre devido à deficiência na produção de linfocinas indutoras pelas células TCD4 (Carneiro-Sampaio, Grumach, 1992).

A IgG encontrada no recém-nascido é na sua quase totalidade oriunda do sangue materno. Esta passagem ocorre a partir da 15ª semana de vida intra-uterina. As demais classes de imunoglobulinas não atravessam a barreira placentária. Assim as concentrações de IgA, IgD e IgE no recém-nascido são reduzidas (Carneiro-Sampaio, Grumach, 1992).

Os valores de IgG, semelhantes aos do adulto, só são encontrados por volta dos 7 anos de idade, porém a aquisição da fração IgG2 é bem mais tardia e mesmo aos 12 anos de idade os seus valores médios podem estar aquém daqueles encontrados em adultos normais. A IgG2 é particularmente importante como opsonina para as bactérias

capsuladas, e sua deficiência interfere na evolução de doenças causadas por esse tipo de bactéria (Carneiro-Sampaio, Grumach, 1992).

A IgG constitui cerca de 75% das imunoglobulinas circulantes e desempenham uma função importante na erradicação dos microrganismos, facilitando a opsonização de fagócitos, ativação do complemento e neutralização de toxinas. A IgM está constante em 25% da totalidade de imunoglobulinas, possuindo a capacidade de ativar a via clássica do complemento, permitindo a fagocitose e destruição das bactérias. A IgA é encontrada nas secreções, impedindo a ligação dos microrganismos com o epitélio, alcançando os valores normais apenas no início da adolescência. A IgE está sempre ligada a mastócitos e basófilos, levando à liberação dos mediadores inflamatórios e vasoativos dos grânulos destas células nas reações alérgicas. Já a função da IgD, ainda está sendo investigada (Carneiro-Sampaio, Grumach, 1992).

Pelas considerações realizadas, os pesquisadores consideram que nos primeiros anos de vida há uma imaturidade do sistema imunológico, o que confere à criança uma vulnerabilidade às doenças infecciosas (Carneiro-Sampaio, Grumach, 1992; Igal, Ron, 1994).

### **3 Conseqüências gerais da infecção dentária**

A imaturidade do sistema imunológico e do próprio mecanismo envolvido nas reações inflamatórias, como descrito anteriormente, faz do paciente infantil uma presa fácil para a disseminação sistêmica das infecções. A manutenção de focos de infecção na criança pode comprometer sua saúde geral.

A boca constitui a fonte de uma variedade de antígenos, incluindo numerosos microrganismos, para o sistema alimentar e o sistema respiratório. Várias doenças bucais

importantes, incluindo cárie dentária, doença gengival e periodontal são decorrentes de um desequilíbrio dos microrganismos na cavidade bucal e a resposta do hospedeiro (Stites, Terr, Parslow, 2000).

Estudos relatam que em torno 40% das bactérias envolvidas em bacteremias em crianças são de origem dental. Os Streptococcus comuns na cavidade bucal, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. lactis*, *S. viridans* e *S. mutans* foram encontrados em algumas doenças como sinusite, abscesso cerebral, meningite, parotidite, endocardite, pneumonia e septicemia (Behrman, 1994).

As espécies *Actinomyces israelii* e *naeslundii*, presentes na microbiota indígena da cavidade bucal foram encontradas no pus dos abscessos intracraniais, nas mastoidites crônicas e nas secreções de pneumonias causadas por aspiração de saliva (Brook, 2000).

As espécies *Prevotella intermédia*, *Prevotella melaninogenica* e *Porphyromonas assacharolytica*, que podem se instalar na placa supra gengival madura, estando presentes nas necroses pulpares e abscessos dentários, também estão associados às pneumonias por aspiração, abscessos pulmonares, sinusites crônicas, infecções das articulações e osteomielites, principalmente dos ossos da face (Brook, 2000).

O gênero *Peptostreptococcus* pode ser predominante em infecções respiratórias, incluindo a sinusite crônica e os abscessos pulmonares, nas otites média crônicas, enquanto os *Streptococcus* microaerófilos são particularmente importantes no desenvolvimento de sinusites crônicas e abscessos cerebrais (Brook, 2000).

Uma série de estudos epidemiológicos em diferentes países mostrou que 14 a 20% dos casos de endocardite estão associados à infecção dentária (Carmona, Dios, Scully, 2002). De acordo com dados do Incor, 40% da endocardite bacteriana em brasileiros são advinda da infecção dental, destes, 25% levam a óbito. O streptococcus viridans é o



principal causador da endocardite bacteriana em crianças (Smith, Adams, 1993; Droz et al., 1997; Silva, Souza, Cunha, 2002; Carmona, Dios, Scully, 2002).

O *Streptococcus viridans*, num período entre 4 e 12 horas após o nascimento são os primeiros microrganismos a se estabelecerem na boca, constituindo um dos microrganismos mais persistentes. Este mesmo microrganismo é o mais abundante na cavidade bucal e é encontrado em canais radiculares infecctados (Fourniol, 1998).

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 *Esherichia coli*, microrganismos comumente encontrados na cavidade bucal (Smith, Adams, 1993).

#### **4 Conseqüências locais da infecção dentária**

Os produtos do metabolismo bacteriano encontrados nas lesões cariosas quando atingem o tecido pulpar direta ou indiretamente, suscitam respostas de defesa traduzidas por reações inflamatórias que podem ser reversíveis ou irreversíveis. Dependendo da intensidade e virulência bacteriana, assim como da resistência do hospedeiro, a infecção bacteriana poderá levar a uma pulpíte reversível ou irreversível. Este processo inflamatório, na tentativa de impedir o avanço da infecção faz com que o tecido pulpar necrose (Kiss, 2004).

Em decorrência da necrose pulpar e da comunicação com o meio bucal, o sistema de canal radicular passa a abrigar as bactérias, suas enzimas e suas toxinas, assim como os

produtos da proteólise oriundos da degeneração do tecido pulpar. As substâncias provenientes do canal radicular, ao entrarem em contato com os tecidos periapicais, podem atuar como antígenos. Dependendo da natureza e da quantidade desses antígenos, da duração da exposição aos tecidos periapicais, uma variedade de alterações específicas e inespecíficas podem ocorrer. Em função da resistência do hospedeiro e das condições locais, bem como da patogenicidade da microbiota, esta penetração de elementos agressores pode resultar num processo inflamatório agudo intenso, caracterizando uma pericementite aguda seguida de um abscesso. No entanto, a exposição excessiva e persistente dos antígenos periapicais em condições locais favoráveis, pode resultar num processo inflamatório fugaz seguindo-se a instalação de fenômenos inflamatórios e imunopatológicos específicos, que podem resultar em focos de destruição tecidual. Desta forma, têm lugar as lesões periapicais crônicas, em especial os granulomas e cistos apicais (Torabinejad, Eby, Naidorf, 1985; Marton, Kiss, 2000).

Nos tecidos, o processo inflamatório agudo pode originar um abscesso caracterizado pelo aparecimento de uma região central constituída por material supurativo formado por granulócitos neutrófilos íntegros e em via de degeneração. Podem também ser observados linfócitos e macrófagos em meio aos neutrófilos. Os granulomas periapicais são descritos como um tecido granulomatoso delimitado por uma cápsula fibrosa e infiltrado por células inflamatórias, os neutrófilos, fagócitos, linfócitos, células plasmáticas e eosinófilos (Torabinejad, Eby, Naidorf, 1985). As lesões representam uma reação de defesa contra o conteúdo do canal radicular infectado. A presença das células plasmáticas, linfócitos e monócitos indicam que a resposta imune humoral é mediada por células está ocorrendo (Piattelli et al., 1991).

A infecção proveniente das lesões de cárie é apontada como o principal fator etiológico das lesões perirradiculares nos dentes decíduos, tais como abscessos e granulomas (Serratine,2002; Bolan, Rocha, 2006).

As infecções endodônticas no dente decíduo, similares aquelas do dente permanente, são polimicrobianas com o desenvolvimento de interação microbiana. Os canais radiculares de dentes decíduos com lesão periapical apresentam uma predominância de microrganismos anaeróbios e estreptococos (Pazelli et al., 2003).

Estudos realizados desde a década de 60, demonstram a presença de bactérias como: *Streptococcus salivaris*, *Staphylococcus albus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus nutis*, *Streptococcus α,β, γ, hemolíticos*, *Staphylococcus aureus*, *Bacteriódes*, *Prevotella* em dentes decíduos com necrose pulpar (Marsh, Largent, 1967; Tomic-Karovic, Jelinek, 1971; Brook, Grimm, Kielich, 1981).

## **5 Técnica de Imuno-histoquímica**

A imuno-histoquímica ou imunocitoquímica é um método utilizado para localizar um antígeno específico no tecido ou na célula baseado numa reação antígeno-anticorpo (Taylor et al., 2002). A técnica é fundamentada na imuno-reatividade do anticorpo com uma proteína específica (antígeno), que por sua vez é reconhecido por um anti-anticorpo denominado de anticorpo secundário. Em seguida a propriedade química de um complexo enzimático conjugado ao anticorpo secundário reage com uma substância cromógena, conferindo um produto final corado à reação positiva (Vandersande, 1983) (figura 1).

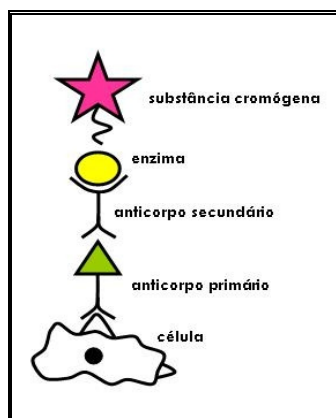


Figura 1- Técnica de imuno-histoquímica

Os anticorpos primários geralmente utilizados nesta técnica são os anticorpos monoclonais. Estes são produzidos em laboratório contra antígenos de células ou tecidos e são utilizados para reconhecer um epítipo específico de determinada proteína. A produção do anticorpo monoclonal requer a imunização de um animal, geralmente um camundongo, ou seja, um antígeno é injetado no animal e as células B se tornam ativadas para produção do anticorpo específico contra este antígeno. As células B são removidas do baço e fusionadas com células cancerígenas formando hibridomas. Os hibridomas multiplicam-se rapidamente e indefinidamente produzindo uma grande quantidade de anticorpos (figura 2). Os anticorpos que reconhecem antígenos da membrana celular, usados para diferenciar populações celulares, são definidos como “Cluster of differentiation”(CD). O CD45 RO está presente nos linfócitos T, o CD 20 nos linfócitos B e o CD68 nos macrófagos (Roitt, Brustoff, Male,1999) (figura 3).



Figura 2- Técnica de produção de anticorpos monoclonais.

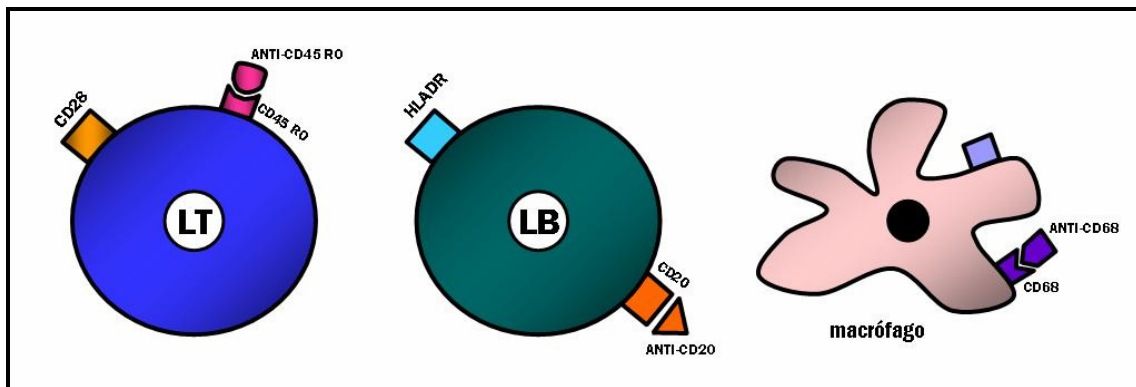


Figura 3- Células inflamatórias com seus marcadores específicos de superfície. (LT-linfócito T; LB-linfócito B)

Muitas pesquisas que utilizam a técnica de imuno-histoquímica relatam diferentes padrões de distribuição e concentração de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos em lesões inflamatórias periapicais em dentes permanentes (Yanagisawa, 1980; Piattelli et al., 1991; Marton, Kiss, 1993; Wallstrom et al., 1993; Rodini, Lara, 2001; Liapatas, Nakou, Rontogianni, 2003; Philippi et al., 2003; Rodini, Batista, Lara, 2004). No entanto, pesquisas semelhantes em dentes decíduos são inexistentes.

**Estudo imuno-histoquímico da presença de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos em lesões perirradiculares de dentes decíduos.**

Michele Bolan\*; Daniele de Almeida Lima; Cláudia Pinto Figueiredo; Gabriella Di Giunta; Maria José de Carvalho Rocha;

**Michele Bolan\***

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

**Daniele de Almeida Lima**

Cirurgiã Dentista; Especialista em Fisiologia; Mestre em microscopia e análise microscópica em Biologia; Hospital Universitário; Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

**Cláudia Pinto Figueiredo**

Farmacêutica Bioquímica; Mestre em Biotecnologia, Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina, Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, Brasil

**Gabriella Di Giunta**

Médica Patologista, Hospital Universitário, Universidade Federal de 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: Delminda da Silveira, 235 / 101-E

Agrônômica- Florianópolis- SC BRASIL CEP 88025-500

**email:** michelebolan@hotmail.com

**Fone** + 55 48 3332544 / +55 48 99834619

**Fax** +55 48 2348776

## **RESUMO**

Esta pesquisa propôs verificar a presença de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos nas lesões perirradiculares em dentes decíduos. Quatorze lesões perirradiculares (abcesso agudo, abcesso crônico e granuloma) foram analisadas. A técnica imuno-histoquímica foi realizada para identificar linfócitos T, linfócitos B e macrófagos utilizando anticorpos monoclonais específicos anti-humanos CD45RO, CD20 e CD68, respectivamente. As células foram quantificadas através da análise microscópica dos cortes histológicos. Os dados revelaram que a média da porcentagem de células positivas CD45RO foi de 11,76; de células CD20 positivas foi de 5,25 e células positivas CD68 foi de 10,92. Os resultados indicam que os linfócitos T e B e macrófagos constituem a maior parte do infiltrado inflamatório indicando que a reação imune humoral e mediada por células está presente nas lesões perirradiculares de dentes decíduos. É relevante a participação do sistema imune nos processos inflamatórios perirradiculares em dentes decíduos.

## **INTRODUÇÃO**

O tecido pulpar, quando exposto às bactérias da cavidade bucal, desenvolve um processo inflamatório que se estende aos tecidos periapicais, se deixado sem tratamento. O estímulo bacteriano e seus produtos agem como antígenos, capazes de suscitar uma reação imunológica nos tecidos periapicais. O tecido perirradicular é infiltrado por células específicas e inespecíficas, envolvidas na resposta imunológica local. A apresentação do antígeno ocorre no tecido perirradicular levando a ativação das células imunes<sup>1</sup>. Como

conseqüência deste processo há o desenvolvimento de lesões perirradiculares e o aparecimento de reabsorção patológica das raízes.<sup>2,3</sup>

Estas células fazem parte do sistema imunológico, o qual é formado por um complexo de várias células como os fagócitos (macrófagos e neutrófilos), células natural killer e linfócitos, cuja principal função é reconhecer os antígenos que penetram no organismo, neutralizá-los e ou eliminá-los.<sup>4-8</sup> Nos primeiros anos de vida, há uma imaturidade do sistema imunológico, o que confere a criança uma vulnerabilidade maior às doenças infecciosas.<sup>9</sup> As células responsáveis pela resposta humoral, os linfócitos B, secretarão imunoglobulinas (IgG, IgA e IgE) igualmente ao nível encontrado no adulto somente aos 7 anos. As células da resposta imune celular, os linfócitos T, têm sua função secretora de linfocinas diminuída em relação ao adulto. Isto colabora com a diminuição na função dos macrófagos. Embora o número de neutrófilos e macrófagos no período neonatal seja semelhante ao de adultos normais, a migração dos neutrófilos em direção ao agente agressor é mais lenta, pois as taxas das substâncias quimiotáticas para os neutrófilos só alcançam a competência do adulto quando a criança completa 5 anos de idade.<sup>10</sup>

A imaturidade do sistema imunológico e do próprio mecanismo envolvido nas reações inflamatórias, como descrito anteriormente, faz do paciente infantil uma presa fácil para a disseminação sistêmica das infecções. A manutenção de focos de infecção na criança pode comprometer sua saúde geral.<sup>11</sup>

A boca constitui a fonte de uma variedade de antígenos, incluindo numerosos microrganismos para o sistema alimentar e o sistema respiratório. Várias doenças bucais importantes incluindo cárie dentária, doença gengival e periodontal são decorrentes de um desequilíbrio entre os microrganismos bucais e a resposta do hospedeiro.<sup>12</sup>



A infecção proveniente das lesões de cárie é apontada como o principal fator etiológico das lesões perirradiculares nos dentes decíduos, tais como abscessos e granulomas.<sup>13,14</sup>

O canal radicular infectado abriga milhares de bactérias em um local onde as defesas só podem ser realizadas pelos tecidos que circundam o forame apical (dentes anteriores) ou a região de furca (dentes posteriores). Esta defesa do organismo se traduz em reação inflamatória inespecífica ou específica<sup>15</sup>, requisitando do organismo infantil permanentes esforços para o combate ao agressor que se encontra abrigado no canal radicular, porém mandando para o organismo os produtos do seu metabolismo no caso das bactérias ou os produtos da proteólise dos tecidos necróticos .

Atualmente, a Odontopediatria se depara com crianças com dentes acometidos pela doença cárie, que não receberam tratamento e se mantêm na cavidade bucal justificado pelo fato de ser um dente temporário. Já foi provado previamente que estes dentes são verdadeiros reservatórios de bactérias.<sup>13,14</sup>

A literatura demonstra que nos dentes permanentes o sistema imune está envolvido nas lesões periapicais.<sup>15-22</sup> É coerente extrapolar que este mecanismo pode estar presente nas lesões perirradiculares de dentes decíduos, no entanto não há ainda comprovação científica.

O objetivo deste estudo foi analisar a presença de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos nas lesões perirradiculares em dentes decíduos, com o intuito de verificar a participação do sistema imune no local do processo.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1 Espécimes**

Quatorze molares decíduos com lesões perirradiculares foram obtidos de crianças entre 3 e 11 anos de idade, atendidas na Clínica de Odontopediatria da Universidade Federal de Santa Catarina. Estes dentes foram removidos devido a uma extensa reabsorção radicular patológica, perfuração do assoalho pulpar ou ampla destruição coronal que atingia as distâncias biológicas, requisitos estes que contra-indicavam o tratamento endodôntico. Após a extração, os dentes foram armazenados em formol a 10%.

A exodontia dos dentes e sua posterior utilização foi realizada após obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido assinados pelos responsáveis dos pacientes. A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética da Universidade Federal de Santa Catarina.

### **2 Preparo laboratorial dos espécimes**

Os dentes foram analisados macroscopicamente e quando possuía estrutura suficiente o tecido mole aderido foi removido com uma lâmina de bisturi, para a confecção de cortes histológicos separados.

Os dentes foram desmineralizados em solução de etileno diamino-tetracético dissódico (EDTA) a 10%, tamponado em pH 7,3, durante 4 semanas. Após a completa descalcificação, os dentes foram lavados por 24 horas, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os fragmentos de tecido mole foram

lavados por 24 horas, desidratados em álcool, diafanizadas em xilol e incluídos em parafina.

A partir dos blocos de parafina, foram realizados 5 cortes seriados de 3  $\mu\text{m}$ , montados em lâminas diferentes. Um dos cortes foi corado pelo método da Hematoxilina e Eosina (HE)<sup>23</sup> para o diagnóstico histopatológico e outro pelo Brown e Brenn (BB) para analisar a presença de bactérias<sup>24</sup>. Os outros cortes foram montados em lâminas histológicas silanizadas (S3003, Dako, Cytomation, Carpinteria, CA, USA) e executada a técnica de imuno-histoquímica pelo método da imunoperoxidase.

### **3 Técnica Imuno-histoquímica**

Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados por passagens sucessivas em etanol acompanhado pela incubação com solução de peróxido de hidrogênio a 3,0% durante 20 minutos e lavagem com água destilada, para o bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução tampão citrato 0,01M, pH 6,0 (MERCK, São Paulo/SP, Brazil) por 45 minutos, em banho-maria, a uma temperatura 95-98°C, com o intuito de reativar os sítios antigênicos. Após lavagem com água destilada, as lâminas foram submersas em tampão salina fosfato (PBS) 10mM, pH 7,2-7,4 (SIGMA CHEMICAL CO, St. Louis, MO, USA).

Para cada anticorpo monoclonal (Tabela 1), um corte foi realizado. A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida durante 12 horas a uma temperatura de 2-8°C. A seguir, estas foram lavadas com tampão PBS por 2 vezes, por 5 minutos cada, à temperatura ambiente. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM conjugado com um polímero de peroxidase (EN VISION, Dako) pronto para uso em

câmara úmida durante 1h à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens utilizando-se PBS por 5 minutos, à temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a uma revelação colorimétrica com solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobiphenyltetrahydrochloride) previamente diluído em tampão imidazol pH 7,2 e peróxido de hidrogênio a 0,3% (DAKO). Após a revelação, foram realizadas a contra-coloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, etanol 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em Entellan® (MERCK, Darmstadt, Germany). Para cada reação foi utilizado um controle positivo (linfonodo). O controle negativo foi realizado pela abolição do anticorpo primário nas reações. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelos anticorpos.

#### **4 Avaliação dos linfócitos T, linfócitos B e macrófagos**

A análise das lâminas foi realizada com a utilização de microscópio de luz (Olympus Bx 40).

O número de células positivas foi contado em 10 campos microscópicos, examinados no aumento de 100X com um graticulo de Muller, em uma área representativa da lesão, ou seja, com o maior infiltrado inflamatório. O resultado foi expresso como a média da porcentagem de células positivas. A porcentagem de células positivas foi calculada como a proporção do número total de células inflamatórias.<sup>19,22</sup>

Uma análise qualitativa foi realizada. A distribuição das células marcadas positivamente foi observada, nos aumentos de 20 e 40X, e classificadas como difusa ou focal.

## RESULTADOS

Os resultados estão sumarizados na Tabela 2.

Um total de 14 lesões perirradiculares de molares decíduos superiores e inferiores foram analisadas. A média de idade dos pacientes que possuíam a lesão foi 7,3 (variando de 3,9 – 11,4), destes nove eram do sexo masculino e cinco do feminino. Através da análise das lâminas coradas pelo HE, as lesões foram diagnosticadas, como abscesso agudo (n=2), abscesso crônico (n=7), granuloma (n=2) e granuloma epiteliado (n=3) e destas 3 possuíam bactérias na lesão (figura 1).

A análise imuno-histoquímica revelou que a média de células positivas CD45RO (linfócito T) foi maior em relação às outras células pesquisadas. A média da porcentagem de células positivas CD45RO foi de 11,76 (desvio padrão= $\pm$ 12,87). Na maioria da amostra (n=12), estas células estavam distribuídas de forma difusa, na parte mais central da lesão coincidente com a região de maior infiltrado de células. A porcentagem de células positivas CD20 (linfócito B) foi 5,25 (desvio padrão=  $\pm$ 5,69). Estas células estavam distribuídas em sua maioria de maneira focal (n=8), em locais de maior infiltrado celular. Em alguns casos (n=3) onde as células B estavam dispostas de maneira focal, o número de células B ultrapassou o número de células T. A média da porcentagem de células positivas CD68 (macrófagos) foi de 10,92 (desvio padrão= $\pm$ 4,98). Os macrófagos estavam localizados dispersos na lesão, próximo à neutrófilos (Figura 1, 2, 3, 4). Nos espécimes que a lesão estava aderida ao dente observou-se odontoclastos expressando imunoreatividade para CD68 (Figura 5).

## DISCUSSÃO

A técnica de imuno-histoquímica é um método que permite visualizar a distribuição celular em um tecido. Porém, a composição celular das lesões pode variar de acordo com o campo examinado devido à distribuição variável das células nas lesões periapicais. Os campos examinados foram selecionados a partir da área de maior infiltrado devido à heterogeneidade da lesão, como realizado previamente por Alavi; Gulabivala; Speight<sup>25</sup> e Rodini e Lara<sup>19</sup>. Sendo assim, os resultados obtidos não se referem à lesão como um todo. Pode-se notar que os macrófagos estavam dispostos homogeneamente nas lesões diferente do que foi visualizado em relação às outras células.

Os resultados encontrados nesta pesquisa são semelhantes àquelas relatadas por outros autores sobre os constituintes das lesões periapicais em dentes permanentes.<sup>15-22</sup> Este estudo corrobora com estudos anteriores os quais reportam que os mecanismos imunes celular e humoral estão envolvidos na patogênese da lesão periapical.<sup>26,27</sup> A composição primária das lesões periapicais é de linfócitos T, linfócitos B, células plasmáticas, macrófagos, neutrófilos e mastócitos.<sup>28</sup>

Esta pesquisa, por constituir o primeiro estudo imuno-histoquímico de lesões perirradiculares em dentes decíduos, teve seus achados comparados com os resultados encontrados em dentes permanentes.

Na presente pesquisa, observou-se na maioria dos casos que a disposição dos linfócitos T era difusa e seu número excedeu o de linfócitos B. Este resultado coincide com os achados de outros autores.<sup>2,17,25,27,29-32</sup> Akamine et al.<sup>33</sup> relataram que o maior número de células T, efetoras da resposta imune celular, no infiltrado inflamatório pode ser devido ao seu envolvimento na progressão e desenvolvimento da lesão, enquanto que

as células B, efectoras da resposta imune humoral, participam principalmente do processo de reparo.

Johannssen; Nilsen; Skaug<sup>34</sup> reportaram que as células T foram mais numerosas na lesão crônica quando comparada à lesão aguda, enquanto que células B foram mais numerosas na lesão aguda.

Os linfócitos B foram mais comumente encontrados de maneira focal, corroborando os achados de alguns autores.<sup>2,17,30</sup> Lukic et al.<sup>30</sup>, estudando vinte granulomas periapicais, fez uma distinção entre infiltrado difuso e focal de acordo com a densidade e o padrão de distribuição das células. Com isto, verificou que as células T estão no infiltrado mononuclear difuso, e as células B predominaram no infiltrado mononuclear focal. Ressaltou ainda que o infiltrado focal está relacionado a uma resposta imune humoral secundária, induzida por antígenos pulpaes e microbianos do canal radicular. Em três casos observados neste estudo quando as células B predominavam em relação às células T, as primeiras encontravam-se dispostas focalmente.

Em todos os espécimes, os linfócitos T e B estavam localizados na porção mais central da lesão, em áreas de infiltrado inflamatório e raramente detectados na região periférica próxima ao tecido fibroso. Estes dados estão de acordo com outros pesquisadores.<sup>2,17</sup> Pode-se inferir que esta localização mais central das células T e B esteja relacionada à abertura do forame apical dos canais radiculares infectados ou reabsorções patológicas que constituem via de trânsito de bactérias e/ou produtos do seu metabolismo, desencadeando uma resposta imune aos antígenos do canal. Philippi et al.<sup>21</sup> concluíram que a cápsula fibrosa, região mais afastada da agressão, possui mais células envolvidas com a remodelação e é praticamente livre de células imunes específicas e inespecíficas.

Os macrófagos, como visto também por outros pesquisadores,<sup>2,19</sup> estavam distribuídos de maneira difusa por toda a lesão. A presença dos macrófagos é extremamente importante para a resposta protetora na lesão periapical, bem como para o desenvolvimento e progressão da reação inflamatória. O macrófago ativado é a primeira linha de defesa local, compreendendo fagocitose e a produção de prostaglandinas, enzimas e citocinas em resposta às bactérias do canal infectado. Citocinas, tais como interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) são estimuladores de reabsorção óssea e contribuem com a expansão da lesão. Além disto, o macrófago tem ação na imuno-indução, agindo como célula apresentadora de antígeno. Ele pode ativar células T para iniciar uma resposta imune ou ativar as células T para o subsequente estímulo para que células B produzam anticorpos.<sup>31</sup>

Aquelas células multinucleadas que mostraram imunoreatividade para CD68 sugere que células CD68 positivas podem conter precursores de odontoclastos como também visto por Angelova et al.<sup>35</sup> As células multinucleadas estão presentes na reabsorção fisiológica de dentes decíduos.<sup>14</sup> A presença de células multinucleadas positivas para CD68, nos permite entender que estas células também presentes na reabsorção patológica dos dentes decíduos estão relacionadas à rápida destruição das raízes destes dentes, observada radiograficamente. Nos dentes permanentes, as reabsorções radiculares também ocorrem, porém de forma mais lenta. Isto tem importância clínica, pois quando há comprometimento periapical do dente decíduo, o plano de tratamento do paciente (exodontia ou endodontia) deve ser elaborado rapidamente, a fim de evitar maiores seqüelas para o sistema estomatognático e para a saúde geral da criança. Os linfócitos T exercem também uma função na reabsorção radicular através da secreção de citocinas que ativam macrófagos.



Diante do que foi exposto, é importante ressaltar que a presença de lesões perirradiculares em dentes decíduos desencadeia uma resposta imunológica local no organismo da criança. No entanto, autores relatam o comprometimento sistêmico por microrganismos envolvidos nas lesões periapicais. Malmstrom e Natvig<sup>36</sup> sinalizaram que o fator reumatóide contido em células plasmáticas foi demonstrado em lesões periapicais de pacientes com doença reumatóide. Considerando este achado, há a possibilidade de que esta lesão promova alterações patológicas sistêmicas. Laine et al.<sup>37</sup> seguem a mesma linha de pensamento e afirma que estas lesões podem formar um foco de bacteremia, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Radics et al.<sup>38</sup> citam que o granuloma periapical pode comprometer a saúde geral pela produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Estas citocinas, tais como interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF) desencadeiam a fase aguda da inflamação caracterizada por febre e aumento da velocidade de hemossedimentação. Os autores são unânimes ao afirmarem que futuras investigações são indispensáveis para analisar a relação entre focos infecciosos locais e manifestações sistêmicas principalmente em crianças.

Com estes achados, pode-se também afirmar que a atenção dispensada ao paciente que possui o dente decíduo comprometido endodonticamente deve ser igual ou maior àquela dispensada aos pacientes adultos. Esta afirmação baseia-se no fato de que a criança, além de possuir o sistema imune imaturo<sup>9,10</sup> geralmente tem mais de um dente comprometido com lesão periapical. Estes dentes, mantidos na cavidade bucal, geram transtornos de ordem local, tais como reabsorção do tecido ósseo e dental, danos ao dente sucessor permanente e, também, de ordem geral, como inapetência, baixo peso, febre e incapacidade funcional. Assim, pesquisas importantes e relevantes nesta área são necessárias, a fim de gerar assertivas e subsídios científicos para preservação da saúde do

paciente infantil, através não só da conscientização dos profissionais para a realização de tratamentos adequados, assim como da população para a procura imediata de um profissional para a resolução do problema.

## **CONCLUSÃO**

A participação do sistema imune nos processos inflamatórios perirradiculares em dentes decíduos é relevante. Os resultados mostraram que os linfócitos T, B e macrófagos constituem a maior parte do infiltrado inflamatório. Isto indica que a reação imune humoral e mediada por células está presente nas lesões perirradiculares de dentes decíduos.

## REFERÊNCIAS

- 1 Kaneko T, Okiji T, Kan L, Takagi M, Suda H. Ultrastructural analysis of MHC class II molecule-expressing cells in experimentally induced periapical lesions in rat. *J Endod* 2001;27:337-42.
- 2 Susuki T, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K. Immunohistochemical analysis of CD1a-labeled Langerhans cells in human dental periapical inflammatory lesions- correlation with inflammatory cells and epithelial cells. *Oral Diseases* 2001;7:336-43.
- 3 Cardoso M, Rocha MJC. Identification of factors associated with pathological root resorption in traumatized primary teeth. *Dent Traumatol.* no prelo. Aceito em 06 agosto 2006.
- 4 Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J* 1998;31:311-25.
- 5 Siqueira JF, Dantas CJS. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. Rio de Janeiro: Medsi: 2000; 238 p.
- 6 Delves PJ, Roitt IM. The Immune System.1. *N Engl J Med* 2000;343(1):37-50.
- 7 Delves PJ, Roitt IM. The Immune System.2. *N Engl J Med* 2000;343(2):108-17.
- 8 Gorczynski R, Stanley J. *Imunologia Clínica*. Rio de Janeiro:Reichmann e Affonso Editores: 2001; 355p.
- 9 Carneiro-Sampaio MMS, Grumach AS. *Imunologia e alergia pediátrica*.2.ed. São Paulo: Savier:1992; p.3-27.
- 10 Igal LH, Ron Y. *Immunology and inflammation. Basic mechanisms and clinical consequences*. New York:McGraw Hill:1994; p.563-71.

- 11 Brook I. Anaerobic infections in children. *Adv Pediatr* 2000;47:395-437.
- 12 Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Imunologia Médica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan: 2000; 689p.
- 13 Serratine ACP. 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. 2002. [Tese de Doutorado]. Florianópolis: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina. 2002.
- 14 Bolan M, Rocha MJC. Histopathological study of physiological and pathological resorptions in human primary teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2006. in press. Aceito em 28 de novembro de 2006.
- 15 Marton, IJ, Kiss C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. *Int Endod J* 1993;26(2):131-6.
- 16 Yanagisawa S. Pathologic study of periapical lesions 1. Periapical granulomas: clinical, histopathologic and immunohistopathologic studies. *J Oral Pathol* 1980;9:288-300.
- 17 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.
- 18 Wallstrom JB, Torabinejad M, Kettering J, Mcmillan P, Linda L. Role of T cells in the pathogenesis of periapical lesions: a preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;76(2):213-8.
- 19 Rodini CO, Lara VS. Study of expression of CD68+ macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2001;92:221-7.

- 20 Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J* 2003;36:464-71.
- 21 Philippi CK, Rados PV, Sant'ana Filho M, Barbachan JJD, Quadros OF. Distribution of CD8 and CD20 lymphocytes in chronic periapical inflammatory lesions. *Braz Dent J* 2003;14(3):182-6.
- 22 Rodini CO, Batista AC, Lara VS. Comparative immunohistochemical study of presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: Possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2004;97:59-63.
- 23 Volnei WG, Siqueira WC. *Histotecnologia básica*. 2.ed. p.138-144, 1981.
- 24 Ribeiro FC. Distribuição das bactérias nas estruturas mineralizadas de dentes com necrose pulpar e granuloma apical. [Dissertação de Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.1997.
- 25 Alavi AM, Gulabivala K, Speight PM. Quantitative analysis of lymphocytes and their subsets in periapical lesions. *Int Endod J* 1998;31:233-41.
- 26 Torabinejad M, Kettering JD. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endod* 1985;11(3):122-5.
- 27 Stashenko P, Yu SM. T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. *J Dent Res* 1989;68(5):830-4.
- 28 Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod* 1992;18(9):422-6.
- 29 Barkhordar RA, Desouza YG. Human T-lymphocyte subpopulations in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988;65(6):763-6.

- 30 Lukic A, Arsenijevic N, Vujanic G, Ramic Z. Quantitative analysis of the immunocompetent cells in periapical granuloma: correlation with the histological characteristics of the lesions. *J Endod* 1990;16(3):119-22.
- 31 Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J Endod* 1996;22(6):311-6.
- 32 Matsuo T, Ebisu S, Shimabukuro Y, Ohtake T, Okada H. Quantitative analysis of immunocompetent cells in human periapical lesions: correlations with clinical findings of the involved teeth. *J Endod* 1992;18(10): 497-500.
- 33 Akamine A, Hashiguchi I, Toriya Y, Maeda K. Immunohistochemical examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1994;10:121-28.
- 34 Johannessen AC, Nilsen R, Skaug N. Enzyme histochemical characterization of mononuclear cells in human dental periapical chronic inflammatory lesions. *Scand J Dent Res* 1984;92:325-33.
- 35 Angelova A, Takagi Y, Okiji T, Kaneko T, Yamashita Y. Immunocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. *Arch Oral Biol* 2004;49:29-36.
- 36 Malmstrom M, Natvig JB. IgG rheumatoid factor in dental periapical lesions of patients with rheumatoid disease. *Scand J Rheumatol* 1975;4(4):177-85.
- 37 Laine M, Venta I, Hyrkas T, Ma J, Konttinen Yt. Chronic inflammation around painless partially erupted third molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2003;95:277-82.
- 38 Radics T, Kiss C, Tar I, Marton JJ. Interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in apical periodontitis: correlation with clinical and histologic findings of the involved teeth. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:9-13.

**Tabela 1: Anticorpos utilizados na pesquisa.**

| Anticorpo primário                              | Especificidade                     | Diluição | Clone | Marca          |
|---|------------------------------------|----------|-------|----------------|
| Anticorpo monoclonal de rato anti-humano CD45RO | Glicoproteína 180 kDa em células T | 1:500    | OPD4  | DakoCytomation |
| Anticorpo monoclonal de rato anti-humano CD20   | Polipeptídeos 33 kDa em células B  | 1:100    | L26   | DakoCytomation |
| Anticorpo monoclonal de rato anti-humano CD68   | Glicoproteína 110kDa em macrófagos | 1:300    | EBM11 | DakoCytomation |

**Tabela 2- Dados do paciente, diagnóstico histológico, presença de infecção na lesão e quantificação das células imuno-positivas para cada espécime.**

| Espécime             | Dente | Sexo | Idade  | Diagnóstico          | Infecção na lesão | Avaliação Imuno-histoquímica*** |             |              |
|----------------------|-------|------|--------|----------------------|-------------------|---------------------------------|-------------|--------------|
|                      |       |      |        |                      |                   | CD45RO                          | CD20        | CD68         |
| 1                    | 65    | F    | 10a 4m | Abcesso agudo        | não               | 6%                              | 9%*         | 7%           |
| 2                    | 74    | M    | 9a 4m  | Granuloma epiteliado | não               | 12%                             | 6%*         | 6%           |
| 3                    | 74    | M    | 6a 1m  | Granuloma            | não               | 10%                             | -**         | 21%          |
| 4                    | 74    | M    | 4a 9m  | Abcesso crônico      | sim               | 15%                             | 3%*         | 10%          |
| 5                    | 85    | M    | 6a     | Abcesso crônico      | não               | 10%                             | 11%*        | 6%           |
| 6                    | 75    | M    | 9a 1m  | Abcesso crônico      | não               | 10%                             | 7%          | 17%          |
| 7                    | 85    | M    | 6a 11m | Abcesso crônico      | sim               | 7%                              | 0,3%*       | 15%          |
| 8                    | 85    | M    | 9a 5m  | Abcesso crônico      | não               | 11%                             | 3%          | 3%           |
| 9                    | 85    | F    | 5a     | Granuloma epiteliado | não               | 6%                              | 1%*         | 8%           |
| 10                   | 75    | F    | 11a 4m | Granuloma            | não               | 2%                              | 0           | 11%          |
| 11                   | 64    | F    | 3a 9m  | Granuloma epiteliado | não               | 53%*                            | 19%*        | 10%          |
| 12                   | 85    | M    | 7a 3m  | Abcesso crônico      | não               | 4%*                             | 9%*         | 16%          |
| 13                   | 65    | M    | 6a 10m | Abcesso crônico      | não               | -**                             | 0           | 10%          |
| 14                   | 74    | F    | 6a 4m  | Abcesso agudo        | sim               | 7%                              | 0           | 13%          |
| <b>Média</b>         |       |      |        |                      |                   | <b>11,76</b>                    | <b>5,25</b> | <b>10,92</b> |
| <b>Desvio padrão</b> |       |      |        |                      |                   | <b>12,87</b>                    | <b>5,69</b> | <b>4,98</b>  |

\*distribuição focal

\*\* perda do corte histológico

\*\*\* porcentagem de células positivas por 10 campos microscópicos

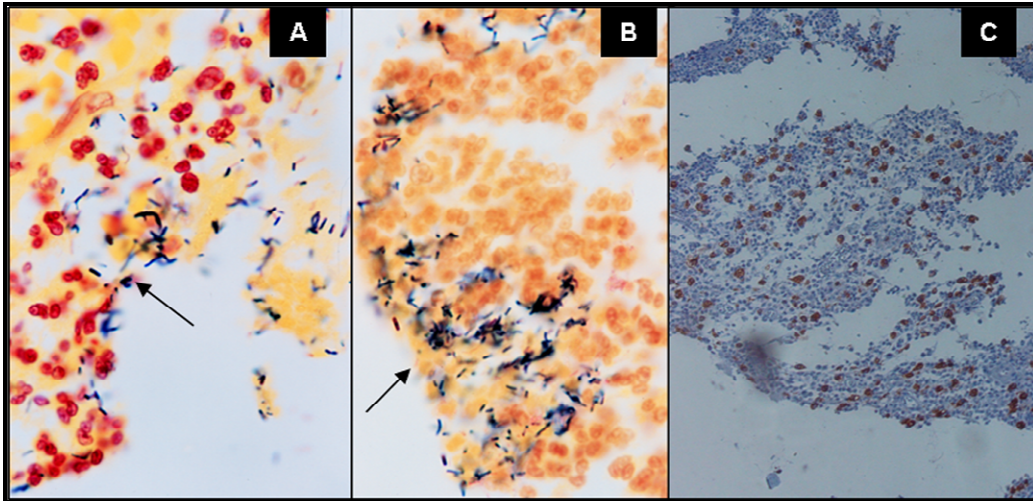


Figura 1- (A, B) Corte histológico da lesão perirradicular (Abscesso agudo) corado pela técnica de Brown e Brenn evidenciando bactérias (↗) na lesão. Aumento 330X. (C) Cortes histológicos corado pela técnica de imuno-histoquímica mostrando células CD68 positivas no abscesso agudo, distribuído de forma difusa. Aumento 33X.

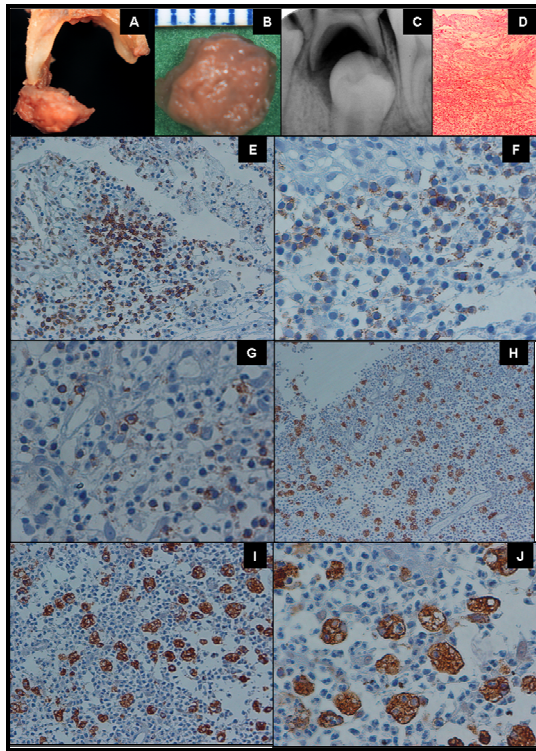


Figura 2- (A, B) Aspecto macroscópico da lesão periapical aderida ao dente e após sua remoção. (C) Radiografia periapical do dente comprometido. (D) Corte histológico da lesão perirradicular (Granuloma) corado pela técnica da hematoxilina-eosina. Aumento 33X. Cortes histológicos corados pela técnica de imuno-histoquímica mostrando a presença do infiltrado linfocitário: CD45RO positivas (E) e CD20 positivas (F,G) distribuídas focalmente e células CD68 positivas (H,I,J) distribuídas difusamente. Aumento 66X, 132X, 132X, 33X, 66X, 132X respectivamente

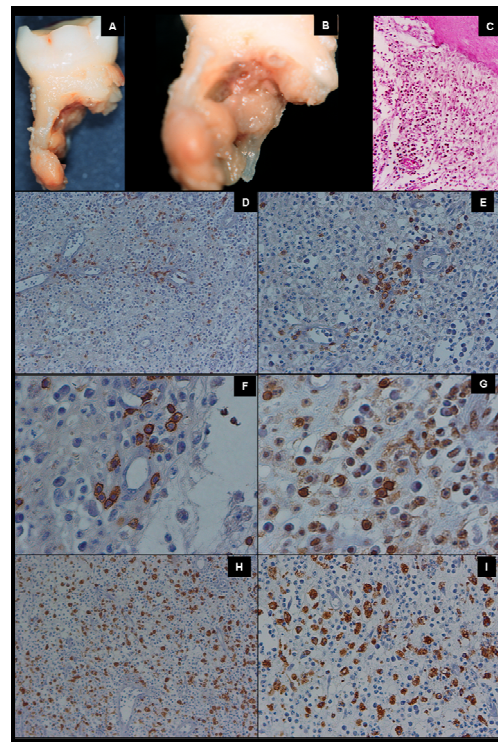


Figura 3 - (A, B) Aspecto macroscópico da lesão perirradicular. (C) Corte histológico da lesão perirradicular (Abscesso crônico) corado pela técnica da hematoxilina-eosina. Aumento 66X. Cortes histológicos corados pela técnica de imuno-histoquímica mostrando a presença de células CD20 positivas (D,E,F), células CD45RO positivas (G) e células CD68 positivas (H,I). Aumento 33X, 66X, 132X, 132X, 33X, 66X respectivamente.



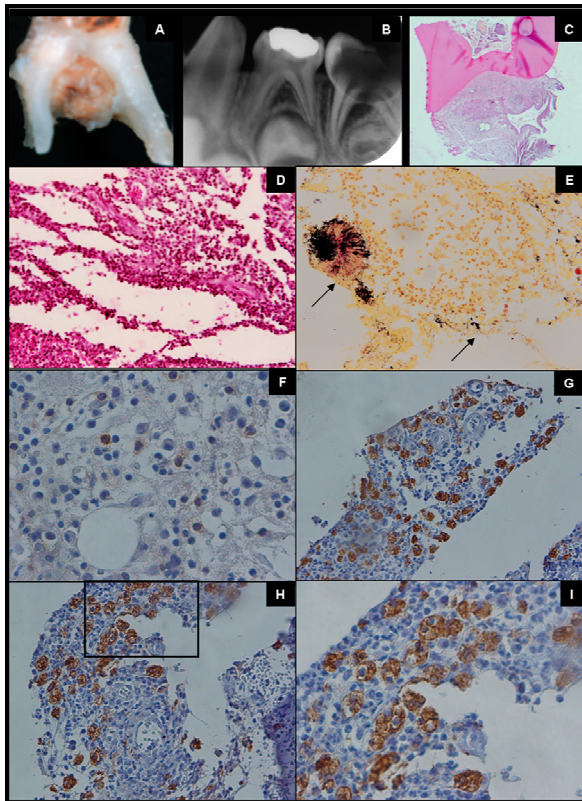


Figura 4- (A) Aspecto macroscópico da lesão perirradicular aderida à região de furca de um 2º molar inferior. (B) Radiografia periapical do dente comprometido. Corte histológico da lesão perirradicular (Abscesso crônico) corado pela técnica da hematoxilina-eosina (C,D) e Brown e Brenn (E) mostrando a presença de bactérias (↗) na lesão. Aumento 6,6X, 66X, 66X respectivamente. Cortes histológicos corados pela técnica de imuno-histoquímica mostrando a presença de células CD20 positivas (F) e células CD68 positivas (G,H,I). Aumento 132X, 66X, 66X, 132X.

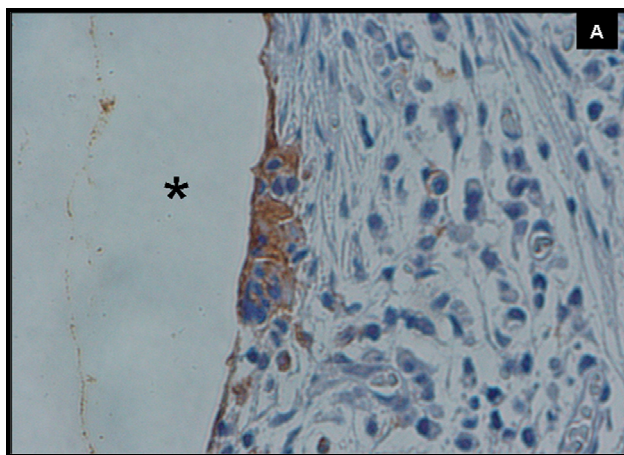


Figura 5 - Fotomicrografia mostrando a presença de odontoclastos próximo à superfície radicular (\*) com expressão para CD68. Aumento 132X.

***Immunohistochemical study of presence of T cells, B cells and macrophages in periradicular lesions of deciduous teeth.***

Michele Bolan; Daniele de Almeida Lima; Cláudia Pinto Figueiredo; Gabriella Di Giunta; Maria José de Carvalho Rocha

**Michele Bolan\***

Master in Odontology; Doctoral student of Odontology in Pediatric Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

**Daniele de Almeida Lima**

Master in microscopy and microscopic analysis in Biology, University Hospital, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

**Cláudia Pinto Figueiredo**

Master in Biotechnology, University Hospital, Federal University of Santa Catarina, Vale do Itajaí University, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

**Gabriella Di Giunta**

Pathologist, University Hospital, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

**Maria José de Carvalho Rocha**

PhD in Endodontia; Assistant professor of Pediatric Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

**\*Mailing address:** Rua: Delminda da Silveira, 235 / 101-E

Agronômica- Florianópolis- SC BRAZIL CEP 88025-500

**email:** michelebolan@hotmail.com

**Phone** 55 + 48 + 3332544 / 55 + 48 + 99834619

**Fax** 55 + 48 + 2348776

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the presence of immune system related cells in periradicular lesions of deciduous teeth. 14 periradicular lesions (acute abscess, chronic abscess and granuloma) were analyzed. The immunohistochemistry technique was performed using CD45RO, CD20, CD68 monoclonal antibodies aiming to identify T cells, B cells and macrophages, respectively. Cells were quantified by microscopic analysis of histological sections. Mean percentage of CD45RO + cells was 11.76; CD20+ cells was 5.25; CD68+ cells was 10.92. Our results showed that T and B cells and macrophages comprise the majority of the inflammatory infiltrate. We concluded that both humoral and cell mediated immune reactions take place in periradicular lesions of deciduous teeth. The immune system plays an important role on the periradicular inflammatory processes in deciduous teeth.

## **INTRODUCTION**

The pulpal tissue can develop an inflammatory process when exposed to bacteria from the mouth. If untreated, this process can reach the periapical tissue. The bacteria and its products act as antigens capable of triggering an inflammatory reaction in affected periapical tissues.<sup>1</sup> As a consequence, the pathological root resorption appears and causes periradicular lesions.<sup>2,3</sup>

The periradicular tissue presents both specific and non-specific cells that are linked to the local immune response. These cells are part of the immune system, which is formed by a complex group of several cells such as phagocytes (macrophages and

neutrophils), natural killer cells and lymphocytes. Their role is to recognize antigens that penetrate the body and neutralize or eliminate them.<sup>4-8</sup>

In the first years of life, children have an immature immune system. This causes a greater vulnerability to infectious diseases.<sup>9</sup> The cells capable of triggering humoral response, B cells, will not produce immunoglobulin in a level equal to adults until the age of seven. T cells, which are responsible for cellular immune response, present a diminished lymphokines production in children when compared to adults. Although the number of neutrophils and macrophages in the neonatal period is similar to adults' rates, migration of neutrophils towards aggressive agents is slower because of the lower amount of chemotactic factors. These rates will only reach normal values by the age of 5.<sup>10</sup>

The immaturity of both the immune system and the mechanism involved in inflammatory reactions, as described, makes the children an easy quarry for systemic dissemination of infections. The maintenance of infectious focus in children can compromise their health as a whole.<sup>11</sup>

The mouth is the source for a variety of antigens including numerous microorganisms for both gastrointestinal and respiratory system. Several important oral diseases including dental caries, gingival and periodontal diseases are consequences of an imbalance between oral microorganisms and host defense.<sup>12</sup>

The infection caused by caries lesions has been pointed as the main etiological factor for the development of periradicular lesions in deciduous teeth, such as abscesses and granulomas.<sup>13,14</sup>

The infected periradicular canal is the shelter for thousands of bacteria that can only be destroyed by surrounding tissues from either the apical foramen (anterior teeth) or the furcation region (posterior teeth).<sup>15</sup> The host defense is based on an inflammatory

reaction that will require permanent efforts to combat the aggressor in the radicular canal. This process will, uneventfully, release products from bacteria metabolism and proteolysis of necrotic tissues to the organism.

Nowadays, Pediatric Dentistry faces a challenge: children keep carious teeth in the mouth which have not been treated properly due to the false impression that they will uneventfully exfoliate and therefore do not require treatment. It is been proved that these teeth are significant bacteria focuses.<sup>13,14</sup>

Studies have shown that the immune system is involved in periapical lesions in permanent teeth.<sup>15-22</sup> It is reasonable to say that this mechanism may be present in deciduous teeth presenting with periradicular lesions. However, no scientific proof had been produced, yet.

The aim of the present study is to verify the participation of the immune system by quantifying the presence of T cells, B cells and macrophages in periradicular lesions of deciduous teeth.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **1 Specimens**

Fourteen deciduous molar teeth with periradicular lesion were obtained from children (aged 3-11 years old) at the Pediatric Dentistry Clinic of the Federal University of Santa Catarina state. Teeth were extracted due to advanced pathological root resorption, pulpal chamber floor perforation or large coronal destruction which made endodontic treatment unfeasible. Teeth were fixed in neutral-buffered formalin (10%).

The protocol for extraction and use of human samples was approved by the Ethics Committee of the institution .

## **2 Tissue preparation**

Teeth were analysed macroscopically. When it possess struture, tissue attached to the teeth's roots was removed so that the histological sections could be confectioned. Teeth were decalcified by a 10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution (pH 7,3) for 4 weeks. After that, decalcified teeth and tissue samples were washed in water for 24 hours, dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in paraffin. Five sections of 3 µm thickness were obtained from each block and then mounted on a slide, separatelly. One section was stained with hematoxylin-eosin<sup>23</sup> (HE) for histopathological diagnosis. Another section was stained with Brown-Brenn (BB) technique to demonstrate the presence of bacteria.<sup>24</sup> The other four sections were mounted on Silane-coated glass slides (S3003, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) and processed in the standard manner for immunohistochemistry, using an immunoperoxidase method.

## **3 Immunohistochemistry**

Sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in descending concentrations of ethanol, followed by incubation on 3% hydrogen peroxide solution for 20 minutes and washed in distilled water to eliminate endogenous peroxidase activity. Then, sections were immersed in 0,01 M citrate buffer solution (pH 6.0) for 45 minutes at 95-98°C, to expose the antigens. After being washed with distilled water, the sections

were incubated in 10mM phosphatase-buffered saline (PBS) solution (pH 7.2-7.4) (SIGMA CHEMICAL CO, St. Louis, MO, USA).

For each monoclonal antibody (Table 1) one section was performed. The monoclonal antibody solution was applied to the sections and the slides were maintained in a wet chamber for 12 hr at 2-8°C. Sections were then washed with PBS twice, for 5 minutes each at room temperature followed by incubations with anti-IgG/IgM secondary antibody conjugated with a peroxidase labelled polymer (EN VISION, Dako) for 1 hr at room temperature and washed again twice with PBS for 5 minutes each, at room temperature. The sections were submitted to a chromogenic reaction with a solution containing 0.03% 3,3-diaminobenzidine diluted in imidazole buffer (pH 7.2) and 0,3% hydrogen peroxide (Dako). After staining, the sections were counter-stained with Harris' hematoxylin, dehydrated in ascending concentrations of ethanol solutions, cleared in xylene and mounting in Entellan® (MERCK, Darmstadt, Germany). A lymph node was used as a positive control. Negative control was obtained by suppressing the application of primary antibodies. Stained cells were identified by the appearance of a brown ring surrounding the cellular membrane.

#### **4 Evaluation of immunostaining**

All sections were examined in a Olympus Bx 40 light microscope. The number of stained cells was counted in 10 consecutive microscopic high-power fields using a Muller eyepiece graticule at X100 magnification. Fields were selected by choosing the most representative region of each specimen, which was the place presenting the most cellular inflammatory infiltrate. Results were expressed as the mean percentage of

positive cells which was calculated as the proportion of the total number of inflammatory cells.<sup>19,22</sup>

The distribution of stained cells was examined at X20 and X40 magnification and classified as diffuse or focal.

## RESULTS

Results were summarized in table 2.

A total of 14 periradicular lesions of upper and lower molar deciduous teeth were examined. The patients consisted of 9 males and 5 females with a mean age of 7.3 (ranged from 3.9 to 11.4 years). Histological diagnosis was acute abscess (n=2), chronic abscess (n=7), granuloma (n=2) and epitheliated granuloma (n=3). Three lesions presented bacteria interiorly (figure 1).

Immunohistochemical analysis showed that the mean of CD45RO+ cells was greater than other examined cells. The mean  $\pm$  SD of CD45RO (cell T) + cells was  $11.76 \pm 12.87$ . In the majority of the sample (n=12) these cells were distributed on a diffuse manner, on the inner area of lesion where cell infiltrate was more intense. The mean  $\pm$  SD of CD20+ cells (cell B) was  $5.25 \pm 5.69$ . These cells were distributed focally (n=8), in region where the cell infiltrate was more intense. When B cells were focally distributed (3 samples) they outnumbered T cells. The mean  $\pm$  SD of CD68+ cells (macrophages) was  $10.92 \pm 4.98$ . Macrophages were diffusely distributed on the lesion and placed close to neutrophils (Fig. 1,2,3,4). When the lesion was attached to the teeth odontoclasts expressing immunoreactivity for CD68 were observed (Fig. 5).



## DISCUSSION

The Immunohistochemical technique is a method used to visualize the cellular distribution in a tissue. Due to the variable distribution of cells in periradicular lesions, the cell distribution may vary according to the field under exam. The examined fields were chosen by selecting the area with greatest infiltrate, as previously done by Alavi et al.<sup>25</sup> and Rodini and Lara<sup>19</sup>. For example, one could notice that macrophages were spread on the entire lesion meanwhile other cells didn't present this pattern. This said, it is worth to say that the obtained results do not reflect the pattern of the entire lesions.

The results confirm that the constitutive pattern of periapical lesions in deciduous teeth is the same as observed in permanent teeth by several authors.<sup>15-22</sup> Both cellular and humoral immune mechanisms are involved on the pathogenesis of the periapical lesion in deciduous teeth,<sup>26,27</sup> which is primarily formed by T cells, B cells, plasmatic cells, macrophages, neutrophils and mastocytes.<sup>28</sup>

As this is the first research to evaluate periradicular lesions in deciduous teeth by using immunohistochemical techniques we have compared our findings with prior published studies regarding permanent teeth.

In the present study, the number of T cells exceeded the number of B cells in the majority of specimens. The T cells had a diffuse pattern of distribution. This result is the same as found by others authors.<sup>2,17,25,27,29-32</sup> Akamine et al.<sup>33</sup> reported that the greater number of T cells in the inflammatory infiltrate may occur due to its involvement in the development and progression of the lesion, while B cells main participation is on the repair process.

Johannssen et al.<sup>34</sup> reported that T cells were more numerous in chronic lesions rather than acute lesions while plasmatic cells presented in a greater number in acute lesions.

B cells were more commonly found in focal patterns as some authors<sup>2,17,30</sup> have reported. Lukic et al.<sup>30</sup> studied 20 granulomas and developed a criteria to separate infiltrates according to the density and distribution pattern of cells. They observed that T cells are mainly located in the diffuse mononuclear infiltrate, while B cells are mostly seen in the focal mononuclear infiltrate. It is important to say that the focal infiltrate is related to a secondary humoral immune response, which is induced by pulpal and bacterial antigens of the radicular canal. Our study had 3 cases in which B cells were more numerous than T cells. In such cases, the B cells were distributed focally.

In all specimens, both B and T cells were localized on the inner portion of the lesion and rarely were visualized in the outer regions, near the fibrotic tissue. These findings are in agreement with other author's reports.<sup>2,17</sup> This pattern of distribution may be related to the opening of the radicular canals' apical foremen, through which the traffic of bacteria or it's metabolism products may occur. Philippi et al.<sup>21</sup> concluded that the fibrotic capsule, a region placed more distantly of the primary aggression, has cells related to remodeling rather than immune system related cells.

Accordingly to what has been said by others authors,<sup>2,19</sup> our specimens presented macrophages spread on the lesion as a whole. The presence of macrophages is extremely important not only for the protective response but also for the development and maintenance of the inflammatory reaction. The activated macrophage constitutes the first line of defense by performing phagocytosis and producing prostaglandines as a reaction for the presence of bacteria on the infected canal. Cytokines such as interleukin 1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) stimulate bone resorption and contribute to the

expansion of the lesion. Furthermore, the macrophage, which is an antigen presenting cell, activates T cells that will either start an immune response themselves or activate B cells in order to produce antibodies.<sup>31</sup>

CD68+ multinucleated cells suggest that they may contain odontoclasts precursors as stated by Angelova et al.<sup>35</sup> Multinucleated cells are present in physiological root resorption of deciduous teeth.<sup>14</sup> The presence of CD68+ multinucleated cells confirms that these cells are also present in pathological root resorption of deciduous teeth and are linked to the rapid root destruction we observed radiographically. Root resorption also occurs in permanent teeth, however it takes more time. This said, it is important to emphasize that once the periapical involvement has been confirmed it is important to provide treatment as soon as possible so that we can diminish or even completely avoid sequels to the stomatognathic system and children's general health. T cells also contribute to the root resorption by secreting cytokines.

It is important to emphasize that the presence of periradicular lesions in deciduous teeth undoubtedly triggers a local inflammatory response in the children's organism. However, systemic involvement caused by bacteria located on periradicular lesions has been reported. Malmstrom and Natvig<sup>36</sup> showed that the rheumatoid factor contained in plasmatic cells was found in periapical lesions of children with rheumatoid disease. Laine et al.<sup>37</sup> state that these lesions may constitute a bacteremia focus, specially in immunocompromised patients. Radics et al.<sup>38</sup> say that the periapical granuloma may compromise the general health by secreting proinflammatory cytokines. These cytokines such as interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) trigger the acute phase characterized by fever, hemocrit sedimentation speed. We are in complete agreement with the cited authors and we emphasize the importance of further studies in

order to clarify the relation between these infectious focuses and the systemic modifications they promote.

Our findings allow us to state that the care provided to patients who have endodontically compromised deciduous teeth must be the same to that provided to adult patients. This statement is hold not only by the fact that children possess an immature immune system<sup>9,10</sup> but also by the fact that they usually present more than one teeth affected by periapical lesions. If these teeth remain in the mouth they will, uneventfully, cause local reactions such as bone and dental resorption, damage to the permanent teeth and systemic reactions such as lack of appetite, low weight, fever and disability. The general population, especially parents, must be instructed to prevent these conditions and seek for help as soon as possible when symptoms appear. Further studies are necessary to provide new insights and scientific proofs regarding this issue so that one can improve the care provided to children who have endodontically compromised deciduous teeth and are exposed to its systemic consequences.

## **CONCLUSION**

The immune system plays an important role on the periradicular inflammatory processes in deciduous teeth.

Our results showed that the T and B cells and macrophages comprise the majority of the inflammatory infiltrate. These findings indicate that both humoral and cell-mediated immune reactions are present in human periradicular lesion of deciduous teeth.

## REFERENCE

- 1 Kaneko T, Okiji T, Kan L, Takagi M, Suda H. Ultrastructural analysis of MHC class II molecule-expressing cells in experimentally induced periapical lesions in rat. *J Endod* 2001;27:337-42.
- 2 Susuki T, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K. Immunohistochemical analysis of CD1a-labeled Langerhans cells in human dental periapical inflammatory lesions- correlation with inflammatory cells and epithelial cells. *Oral Diseases* 2001;7:336-43.
- 3 Cardoso M, Rocha MJC. Identification of factors associated with pathological root resorption in traumatized primary teeth. *Dent Traumatol.* in press.
- 4 Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J* 1998;31:311-25.
- 5 Siqueira JF, Dantas CJS. Molecular and cellular inflammation mechanism. Rio de Janeiro: Medsi; 2000; 238 p.
- 6 Delves PJ, Roitt IM. The Immune System.1. *N Engl J Med* 2000;343(1):37-50.
- 7 Delves PJ, Roitt IM. The Immune System.2. *N Engl J Med* 2000;343(2):108-17.
- 8 Gorczynski R, Stanley J. Clinical immunology. Rio de Janeiro:Reichmann and Affonso Editors; 2001; 355p.
- 9 Carneiro-Sampaio MMS, Grumach AS. Pediatric allergy and immunology. 2.ed. São Paulo: Savier;1992. p.3-27.
- 10 Igal LH, Ron Y. Immunology and inflammation. Basic mechanisms and clinical consequences. New York:McGraw Hill;1994. p.563-71.
- 11 Brook I. Anaerobic infections in children. *Adv Pediatr* 2000;47:395-437.

- 12 Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Clinical Immunology*.9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000; 689p.
- 13 Serratine ACP. Intensity, localization and consequences of infection in deciduous molar with caries lesions, bone radiolucency in furcation region, floor perforation of pulp chamber: microscopic optic evaluation. [Doctoral thesis]. Florianópolis: Faculty of Odontology of Federal University of Santa Catarina; 2002.
- 14 Bolan M, Rocha MJC. Histopathological study of physiological and pathological resorptions in human primary teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2006. in press.
- 15 Marton, IJ, Kiss C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. *Int Endod J* 1993;26(2):131-6.
- 16 Yanagisawa S. Pathologic study of periapical lesions 1. Periapical granulomas: clinical, histopathologic and immunohistopathologic studies. *J Oral Pathol* 1980;9:288-300.
- 17 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.
- 18 Wallstrom JB, Torabinejad M, Kettering J, Mcmillan P, Linda L. Role of T cells in the pathogenesis of periapical lesions: a preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;76(2):213-8.
- 19 Rodini CO, Lara VS. Study of expression of CD68+ macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2001;92:221-7.
- 20 Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J* 2003;36:464-71.

- 21 Philippi CK, Rados PV, Sant'ana Filho M, Barbachan JJD, Quadros OF. Distribution of CD8 and CD20 lymphocytes in chronic periapical inflammatory lesions. *Braz Dent J* 2003;14(3):182-6.
- 22 Rodini CO, Batista AC, Lara VS. Comparative immunohistochemical study of presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: Possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2004;97:59-63.
- 23 Volnei WG, Siqueira WC. Basic histotechnology. 2.ed. Brasília: Manual.1981. p.138-44.
- 24 Ribeiro FC. Bacterial arrangement in the hard structure of non-vital teeth with necrotic pulp and apical granuloma. [Master thesis]. Bauru: Faculty of Odontology of University of São Paulo; 1982.
- 25 Alavi AM, Gulabivala K, Speight PM. Quantitative analysis of lymphocytes and their subsets in periapical lesions. *Int Endod J* 1998;31:233-41.
- 26 Torabinejad M, Kettering JD. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endod* 1985;11(3):122-5.
- 27 Stashenko P, Yu SM. T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. *J Dent Res* 1989;68(5):830-4.
- 28 Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod* 1992;18(9):422-6.
- 29 Barkhordar RA, Desouza YG. Human T-lymphocyte subpopulations in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988;65(6):763-6.

- 30 Lukic A, Arsenijevic N, Vujanic G, Ramic Z. Quantitative analysis of the immunocompetent cells in periapical granuloma: correlation with the histological characteristics of the lesions. *J Endod* 1990;16(3):119-22.
- 31 Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J Endod* 1996;22(6):311-6.
- 32 Matsuo T, Ebisu S, Shimabukuro Y, Ohtake T, Okada H. Quantitative analysis of immunocompetent cells in human periapical lesions: correlations with clinical findings of the involved teeth. *J Endod* 1992;18(10): 497-500.
- 33 Akamine A, Hashiguchi I, Toriya Y, Maeda K. Immunohistochemical examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1994;10:121-8.
- 34 Johannessen AC, Nilsen R, Skaug N. Enzyme histochemical characterization of mononuclear cells in human dental periapical chronic inflammatory lesions. *Scand J Dent Res* 1984;92:325-33.
- 35 Angelova A, Takagi Y, Okiji T, Kaneko T, Yamashita Y. Immunocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. *Arch Oral Biol* 2004;49:29-36.
- 36 Malmstrom M, Natvig JB. IgG rheumatoid factor in dental periapical lesions of patients with rheumatoid disease. *Scand J Rheumatol* 1975;4(4):177-85.
- 37 Laine M, Venta I, Hyrkas T, Ma J, Konttinen YT. Chronic inflammation around painless partially erupted third molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2003;95:277-82.
- 38 Radics T, Kiss C, Tar I, Marton IJ. Interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in apical periodontitis: correlation with clinical and histologic findings of the involved teeth. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:9-13.



**Table 1: Primary antibodies used to characterize inflammatory cells in periradicular lesions.**

| Antibody                          | Specificity                        | Dilution | Clone | Source         |
|-----------------------------------|------------------------------------|----------|-------|----------------|
| Mouse monoclonal antihuman CD45RO | 180 kDa glycoprotein on T cells    | 1:500    | OPD4  | DakoCytomation |
| Mouse monoclonal antihuman CD20   | 33 kDa polypeptide on B cells      | 1:100    | L26   | DakoCytomation |
| Mouse monoclonal antihuman CD68   | 110kDa glycoprotein on macrophages | 1:300    | EBM11 | DakoCytomation |

**Table 2- Patients data, histological diagnosis, bacteria presence and positive cell quantification for each sample.**

| Sample nº                  | Tooth | Sex | Age    | Diagnosis              | Infection on lesion | Immunohistochemical evaluation*** |             |              |
|----------------------------|-------|-----|--------|------------------------|---------------------|-----------------------------------|-------------|--------------|
|                            |       |     |        |                        |                     | CD45RO                            | CD20        | CD68         |
| 1                          | 65    | F   | 10y 4m | Acute abscess          | No                  | 6%                                | 9%*         | 7%           |
| 2                          | 74    | M   | 9y 4m  | Epitheliated granuloma | No                  | 12%                               | 6%*         | 6%           |
| 3                          | 74    | M   | 6y 1m  | Granuloma              | No                  | 10%                               | -**         | 21%          |
| 4                          | 74    | M   | 4y 9m  | Chronic abscess        | Yes                 | 15%                               | 3%*         | 10%          |
| 5                          | 85    | M   | 6y     | Chronic abscess        | No                  | 10%                               | 11%*        | 6%           |
| 6                          | 75    | M   | 9y 1m  | Chronic abscess        | No                  | 10%                               | 7%          | 17%          |
| 7                          | 85    | M   | 6y 11m | Chronic abscess        | Yes                 | 7%                                | 0,3%*       | 15%          |
| 8                          | 85    | M   | 9y 5m  | Chronic abscess        | No                  | 11%                               | 3%          | 3%           |
| 9                          | 85    | F   | 5y     | Epitheliated granuloma | No                  | 6%                                | 1%*         | 8%           |
| 10                         | 75    | F   | 11y 4m | Granuloma              | No                  | 2%                                | 0           | 11%          |
| 11                         | 64    | F   | 3y 9m  | Epitheliated granuloma | No                  | 53%*                              | 19%*        | 10%          |
| 12                         | 85    | M   | 7y 3m  | Chronic abscess        | No                  | 4%*                               | 9%*         | 16%          |
| 13                         | 65    | M   | 6y 10m | Chronic abscess        | No                  | -**                               | 0           | 10%          |
| 14                         | 74    | F   | 6y 4m  | Acute abscess          | Yes                 | 7%                                | 0           | 13%          |
| <b>Mean</b>                |       |     |        |                        |                     | <b>11,76</b>                      | <b>5,25</b> | <b>10,92</b> |
| <b>Standard Desviation</b> |       |     |        |                        |                     | <b>12,87</b>                      | <b>5,69</b> | <b>4,98</b>  |

\* focal distribution

\*\* lose of the section

\*\*\* percentage of number of cells per 10 fields of vision.

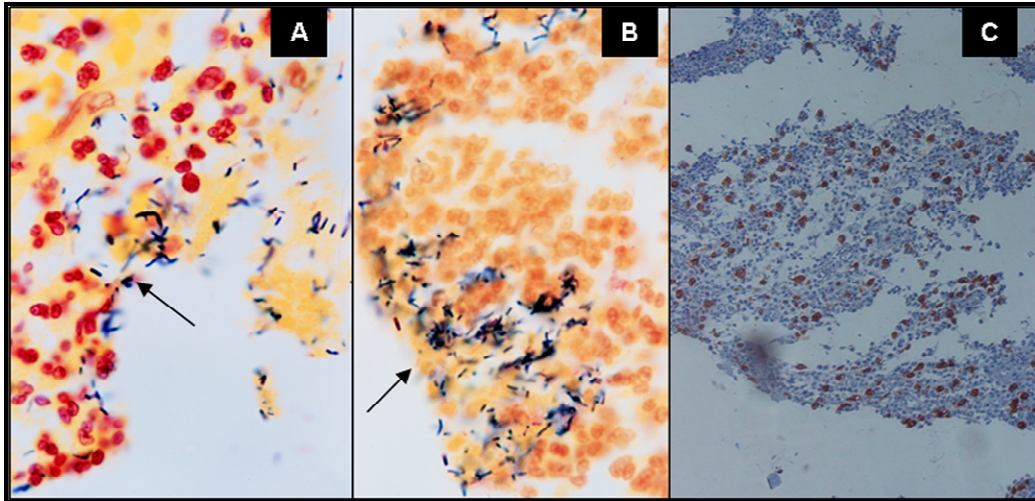


Figure 1- (A,B) Histological section of lesion (acute abscess) stained by BB technique showing bacteria (↗) on the lesion. Original magnification X330. (C) Immunohistochemical staining of CD68+ cells diffusely distributed. Original magnification X33.

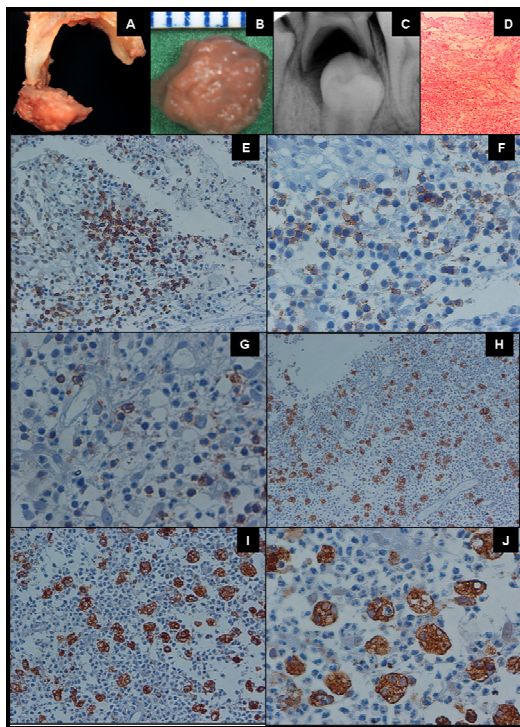


Figure 2- (A) Macroscopic aspect of the lesion attached to tooth and after being removed (B). (C) Periapical radiography of tooth (D) Histological section of lesion (granuloma) stained by HE technique. Original magnification X33. Immunohistochemical staining for CD45RO+ cells (E), CD20+ cells (F,G) focally distributed and CD68+ cells diffusely distributed (H,I,J). Original magnification X66, X132, X132, X33, X66, X132 respectively.

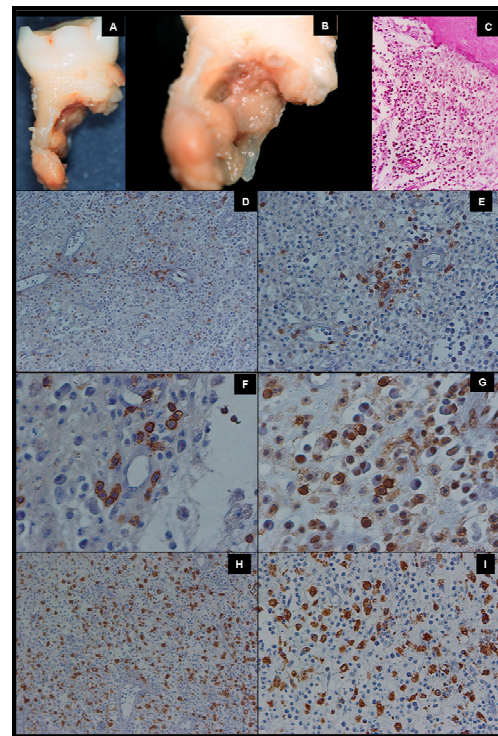


Figure 3- (A,B) Macroscopic aspect of the lesion. (C) Histological section of lesion (chronic abscess) stained by HE technique. Original magnification X66. Immunohistochemical staining for CD20+ cells (D,E,F), CD45RO+ cells (G), and CD68+ cells (H,I). Original magnification X33, X66, X132, X132, X33, X66 respectively.

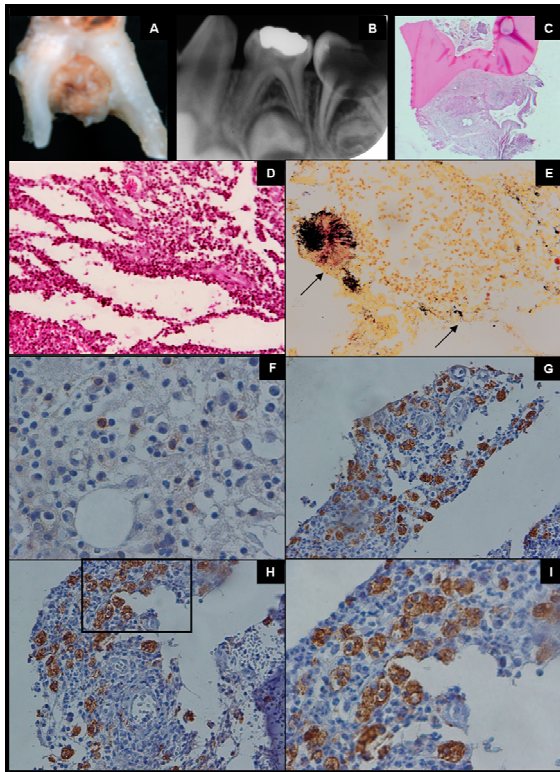


Figure 4- (A) Macroscopic aspect of the lesion attached to furcation region of the second lower molar. (B) Periapical radiography of tooth. Histological section of lesion (chronic abscess) stained by HE (C,D) and BB techniques (E) showed the presence of bacteria (↗) on the lesion. Original magnification X6.6, X66, X66 respectively. Immunohistochemical staining for CD20+ cells (F) and CD68+ cells (G,H,I). Original magnification X132, X66, X66, X132 respectively.

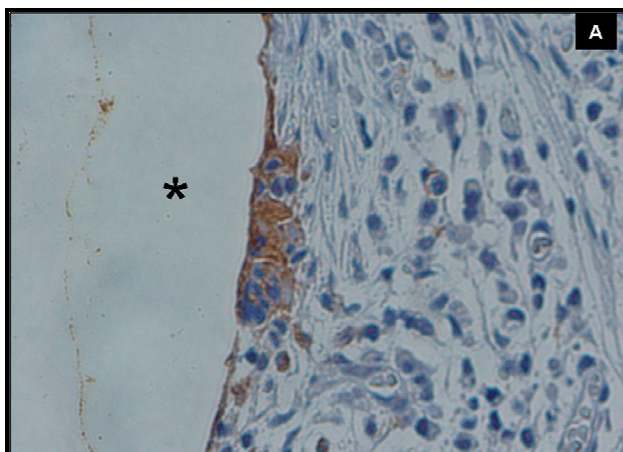


Figure 5- Immunohistochemical staining for CD68+ cells. Section showed the presence of odontoclasts expressing CD68 near root surface (\*). Original magnification X132.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Siqueira JF, Dantas CJS. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. Rio de Janeiro: Medsi: 2000; 238 p.
- Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. Int Endod J 1998;31:311-25.
- Delves PJ, Roitt IM. The Immune System.1. N Engl J Med 2000;343(1):37-50.
- Gorczyński R, Stanley J. Imunologia Clínica. Rio de Janeiro:Reichmann e Affonso Editores: 2001; 355p.
- Medzhitov R, Janeway C.. Innate Immunity. N Engl J Med 2000;343(5):338-44.
- Jiang H, Chess L. Regulation of Immune Responses by T Cells. N Engl J Med 2006;354(11):1166-76.
- Klein J, Sato A. The HLA System.1. N Engl J Med 2000;343(10):702-9.
- Klein J, Sato A. The HLA System.2. N Engl J Med 2000;343(11):782-6.
- Delves PJ, Roitt IM. The Immune System.2. N Engl J Med 2000;343(2):108-17.
- Walport MJ.Complement.1. N Engl J Med 2001;344(14):1058-66.
- Walport MJ.Complement.2. N Engl J Med 2001;344(15):1140-4.
- Carneiro-Sampaio MMS, Grumach AS. Imunologia e alergia pediátrica.2.ed. São Paulo: Savier: 1992; p.3-27.
- Igal LH, Ron Y. Immunology and inflammation. Basic mechanisms and clinical consequences. New York:McGraw Hill:1994;p.563-71.
- Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Imunologia Médica. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan: 2000; 689p.

- Behrman RE. Tratado de pediatria. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 1994; 811p.
- Brook I. Anaerobic infections in children. *Adv Pediatr* 2000;47:395-437.
- Carmona IT, Dios PD, Scully C. An update on the controversies in bacterial endocarditis of oral origin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2002;93(6):660-70.
- Smith AJ, Adams D. The dental status and attitudes of patients at risk from infective endocarditis. *Br Dent J* 1993;174:59-63.
- 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;183:101-5.
- Silva DB, Souza IPR, Cunha MCSA. Knowledge, attitudes and status of oral health in children at risk for infective endocarditis. *Int J Paediat Dent* 2002;12:124-31.
- Fourniol A. Pacientes especiais e a odontologia. São Paulo: Santos, 1998.472p.
- Kiss C. Cell-to-cell interactions. *Endodontics Topics* 2004;8:88-103.
- Torabinejad M, Eby WC, Naidorf IJ. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endod* 1985;11(3):122-5.
- Marton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:139-50.
- 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.
- Serrattine ACP. 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. 2002. [Tese de Doutorado]. Florianópolis: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina. 2002.

-Bolan M, Rocha MJC. Histopathological study of physiological and pathological resorptions in human primary teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2006. in prelo. Aceito em 28 de novembro de 2006.

-Pazelli LC, Freitas AC, Ito IY, Souza-Gugelmin MC, Medeiros AS, Nelson-Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp chronic periapical lesions. *Pesqui Odontol Brás* 2003;17(4):367-71.

-Marsh S, Largent MD. A bacteriological study of the pulp canals of infected primary molars. *J Dent Child* 1967;34(6):460-70.

-Tomic-Karovic K, Jelinek E. Comparative study of bacterial flora in the surroundings, the root canals and sockets of deciduous molars. *Int Dent J* 1971;21(3): 375-88.

Brook I, Grimm S, Kielich RB. Bacteriology of acute periapical abscess in children. *J Endod* 1981;7 (8):378-80.

-Taylor CR, Shi SR, Barr NJ, Wu N. Techniques of imunohistochemistry: Principles, Pitfalls, and Standardization. In: Dabbs, DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry*. 2002. p. 3-43.

-Vandersande F. Immunohistochemical double staining techniques. In: Cuello AC. *Immunohistochemistry*. New York: John Wiley & Sons 1983;257.

-Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 4.ed. London.UK: Mosby Co.

-Yanagisawa S. Pathologic study of periapical lesions 1. Periapical granulomas: clinical, histopathologic and immunohistopathologic studies. *J Oral Pathol* 1980;9:288-300.

-Marton, IJ, Kiss C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. *Int Endod J* 1993;26(2):131-6.

-Wallstrom JB, Torabinejad M, Kettering J, Mcmillan P, Linda L. Role of T cells in the pathogenesis of periapical lesions: a preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;76(2):213-8.

-Rodini CO, Lara VS. Study of expression of CD68+ macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2001;92:221-7.

-Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J* 2003;36:464-71.

-Philippi CK, Rados PV, Sant'ana Filho M, Barbachan JJD, Quadros OF. Distribution of CD8 and CD20 Lymphocytes in Chronic Periapical Inflammatory lesions. *Braz Dent J* 2003;14(3):182-6.

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