

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

**Aspectos Inflamatórios e Imunológicos de Pulpites
Dentárias Humanas**

Kely Firmino Bruno

Tese de Doutorado

**Goiânia
2009**

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

**Aspectos Inflamatórios e Imunológicos de Pulpites
Dentárias Humanas**

Modalidade de Artigo Científico

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela

**Goiânia
2009**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: Kely Firmino Bruno

Orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela

Membros:

1. Carlos Estrela

2. Aline Carvalho Batista

3. Elismauro Francisco de Mendonça

4. Gilson Blitzkow Sydney

5. João Carlos Gabrielli Biffi

Data: 18 / 09 / 2009

Dedico este trabalho...

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

“O amor é paciente, é bondoso.

Não tem inveja, não é orgulhoso, não é arrogante, nem escandaloso.

Não busca seus próprios interesses, não se irrita, não guarda rancor.

Não se alegra com a injustiça, mas se rejubila com a verdade.

Tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

O amor jamais acabará.” (I Coríntios 13, 4-8)

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| Lista de Tabelas | ix |
| Lista de Figuras | x |
| Siglas e Abreviaturas | xi |
| Resumo | xii |
| Abstract | xiv |
| 1. Caracterização do Problema | 1 |
| 2. Objetivos | 6 |
| 3. Material e Métodos | 7 |
| 4. Publicações..... | 13 |
| 5. Considerações Finais | 36 |
| 6. Referências | 40 |
| 7. Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa | 44 |
| Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido..... | 46 |
| Anexo 3 - Soluções e etapas da técnica de Hematoxilina e Eosina | 50 |
| Anexo 4 - Soluções e etapas da técnica de Imunoistoquímica | 52 |
| Anexo 5 - Normas de publicação do Journal of Endodontics | 56 |
| Anexo 6 - Artigo publicado | 64 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos e protocolos das reações de imunoistoquímica

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

Figura 4 - Densidade das células CD4⁺, CD45RO⁺, CD68⁺ e CD20⁺ por mm² nos grupos de pulpites com intenso infiltrado inflamatório e levemente colagenizadas (G1) e de pulpites com escasso infiltrado inflamatório e intensa colagenização (G2). Resultados expressos como média e desvio padrão de células/mm². O Teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar grupos a um nível de significância de 0.05. (*) Diferença significativa na densidade de células CD68⁺ quando comparados G1 e G2.

SIGLAS E ABREVIATURAS

- APCs – antigen-presenting cells (células apresentadoras de antígenos)
- MHC class II – major histocompatibility complex class II (complexo maior de histocompatibilidade classe II)
- T reg – T regulatory (T regulatória)
- CTLA-4 – cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (linfócito T citotóxico antígeno-4)
- Foxp3 – forkhead transcription factor (fator transcricional)
- PVT – pulp vitality test (teste de vitalidade pulpar)
- SD – standard deviation (desvio padrão)
- IL – interleukin (interleucina)
- TNF- α – tumor necrosis factor alpha (fator de necrose tumoral alfa)
- INF- γ – interferon-gamma (interferon gama)
- CCL2/MCP-1 – monocyte chemotactic protein-1 (proteína-1 quimiotática para monócito)
- CCL20/MIP-3 α - macrophage inflammatory protein 3-alpha (proteína inflamatória de macrófago-3-alfa)
- FGFb – basic fibroblastic growth factor (fator de crescimento fibroblástico básico)
- VEGF – vascular endothelial growth factor (fator de crescimento endotelial vascular)
- TGF- β – transforming growth factor (fator de crescimento transformador beta)
- TB – toluidine blue (azul de toluidina)

RESUMO

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

Palavras chave

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

ABSTRACT

Introduction: Immune and inflammatory cells may contribute to host defense and microenvironmental changes during the pathogenesis of dental pulpitis. This study evaluated the microscopic characteristics and densities (per mm²) of tryptase⁺ mast cells, CD4⁺ T helper lymphocytes, CD45RO⁺ memory T lymphocytes, foxp3⁺ T regulatory lymphocytes, CD20⁺ B lymphocytes, CD68⁺ macrophages, and CD31⁺ blood vessels in human dental pulpitis (n = 38).

Methods: Tryptase, CD4, CD45RO, foxp3, CD20, CD68, and CD31 expressions were analyzed using immunohistochemistry; other microscopic features, such as intensity of inflammatory infiltrate and collagen deposition, were evaluated after staining with hematoxylin and eosin. **Results:** Two microscopic patterns of dental pulpitis were found: group 1 (G1) (n = 15) showed intense inflammatory infiltrate and mild collagen deposition; conversely, group 2 (G2) (n = 23) showed scarce inflammatory infiltrate and intense collagen deposition. The numbers of CD68⁺ and CD20⁺ cells and the density of blood vessels were higher in G1 than in G2. However, there were no differences in CD4⁺ and CD45RO⁺ cell densities between groups. When present, mast cells were equally distributed in G1 and G2, whereas foxp3⁺ cells were detected in 58.82% and 14.28% of the samples of G1 and G2.

Conclusions: Immune and inflammatory cell infiltration have different patterns in human dental pulpitis, which might reflect distinct microscopic characteristics and particular local defense capabilities.

Key Words

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

1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos avaliar as características microscópicas e as densidades (por mm²) de mastócitos triptase⁺, linfócitos T *helper* CD4⁺, linfócitos T de memória CD45RO⁺, linfócitos T regulatórios foxp3⁺, linfócitos B CD20⁺, macrófagos CD68⁺ e vasos sanguíneos CD31⁺ em pulpites dentárias humanas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de polpas dentárias

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

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

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

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

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

Microscopia óptica

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

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

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

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

Imunoistoquímica

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

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

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

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

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

Histoquímica

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

Análise quantitativa e qualitativa

O número de células triptase⁺ de mastócitos, CD4⁺, CD45RO⁺, foxp3⁺, CD20⁺ e CD68⁺ foi determinado nas pulpites dentárias humanas por meio de retículo de integração. Os vasos sanguíneos (CD31⁺) que apresentaram lúmen vascular foram considerados, inclusive aqueles de tamanho reduzido (microvasos). Todas as células imune-inflamatórias e vasos sanguíneos foram quantificados em 5 à 10 campos consecutivos e representativos (x400) e nesse aumento, cada campo no retículo de integração correspondeu a uma área de 0.0961 mm². O local e distribuição dessas células e vasos também foram avaliados.

Análises descritivas foram expressas como média e desvio padrão de *n* observações por mm². Análise comparativa de todas as populações celulares acima citadas foi realizada pelo Teste de Wilcoxon. Análise comparativa entre grupos experimentais foi realizada com teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Esse teste também foi utilizado para avaliar a possível associação entre as células imune-inflamatórias e os achados microscópicos. O valor de *p* menor do que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

4. PUBLICAÇÕES

Artigo 1 - Inflammatory and Immunological Aspects of Human Dental Pulpitis

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

Revista - Journal of Endodontics (Submetido).

Inflammatory and Immunological Aspects of Human Dental Pulpitis

Kely Firmino Bruno, DDS, MSc,¹ Júlio Almeida Silva, DDS, MSc,¹ Tarcília Aparecida Silva, DDS, MSc, PhD,² Aline Carvalho Batista, DDS, MSc, PhD,³ Ana Helena Gonçalves de Alencar, DDS, MSc, PhD,⁴ and Carlos Estrela, DDS, MSc, PhD⁵

Running Title: Immunological aspects of dental pulpitis

¹ Graduate Student, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil;

² Department of Oral Surgery and Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil;

³ Department of Stomatology (Oral Pathology), Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil;

⁴ Professor of Endodontics, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil;

⁵ Chairman and Professor of Endodontics, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

Address requests for reprints to Professor Carlos Estrela, Department of Stomatologic Sciences, Federal University of Goiás, Praça Universitária s/n, Setor Universitário, CEP 74605-220, Goiânia, GO, Brazil. E-mail address: estrela3@terra.com.br.

Abstract

Introduction: Immune and inflammatory cells may contribute to host defense and microenvironmental changes during the pathogenesis of dental pulpitis.

This study evaluated the microscopic characteristics and densities (per mm²) of tryptase⁺ mast cells, CD4⁺ T helper lymphocytes, CD45RO⁺ memory T lymphocytes, foxp3⁺ T regulatory lymphocytes, CD20⁺ B lymphocytes, CD68⁺ macrophages, and CD31⁺ blood vessels in human dental pulpitis (n = 38).

Methods: Tryptase, CD4, CD45RO, foxp3, CD20, CD68, and CD31 expressions were analyzed using immunohistochemistry; other microscopic features, such as intensity of inflammatory infiltrate and collagen deposition, were evaluated after staining with hematoxylin and eosin. **Results:** Two microscopic patterns of dental pulpitis were found: group 1 (G1) (n = 15) showed intense inflammatory infiltrate and mild collagen deposition; conversely, group 2 (G2) (n = 23) showed scarce inflammatory infiltrate and intense collagen deposition. The numbers of CD68⁺ and CD20⁺ cells and the density of blood vessels were higher in G1 than in G2. However, there were no differences in CD4⁺ and CD45RO⁺ cell densities between groups. When present, mast cells were equally distributed in G1 and G2, whereas foxp3⁺ cells were detected in 58.82% and 14.28% of the samples of G1 and G2.

Conclusions: Immune and inflammatory cell infiltration have different patterns in human dental pulpitis, which might reflect distinct microscopic characteristics and particular local defense capabilities.

Key Words

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

Materials and Methods

Dental pulp samples

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

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

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

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

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

Light microscopy

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

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

Immunohistochemistry

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

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

Histochemistry

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

Quantitative and qualitative analysis

The numbers of tryptase⁺ mast cells, CD4⁺, CD45RO⁺, foxp3⁺, CD20⁺, and CD68⁺ cells in the human dental pulps were calculated using the graticule. All CD31⁺ blood vessels with a vascular lumen were counted, even if they were very small (microvessels). All immune inflammatory cells and blood vessels were counted in 5-10 representative and consecutive microscopic high-power fields (400X magnification); at this magnification, each field of the graticule had an area of 0.0961 mm². The location and distribution of cells and blood vessels were also analyzed. Descriptive analyses were expressed as mean ± standard deviation (SD) of *n* observations per mm². The Wilcoxon test was used to compare all cell populations, and the non-parametric Mann-Whitney test, for comparisons between experimental groups. A *p* value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

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

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

The immune inflammatory cells evaluated were diffusely distributed throughout the pulp tissue in all samples (n = 38). Mast cells (Fig. 3A) were found in 23.6% of the samples at a low density (mean = 6.62 cells/mm²). We did not identify mast cells in these samples using TB staining. Similarly, foxp3⁺ T regulatory cells (Fig. 3B) were found in 34.21% of the samples at densities ranging from 1.14 to 27.05 cells/mm² (mean = 10.49 cells/mm²). Results also showed that, in all samples, there were lower densities of T helper lymphocytes (CD4⁺ cells) (Fig. 3C) and memory T lymphocytes (CD45RO⁺ cells) (Fig. 3D) than of macrophages (CD68⁺ cells) (Fig. 3E) and B lymphocytes (CD20⁺ cells) (Fig. 3F) (Wilcoxon, p < 0.05 for all comparisons).

The number of CD68⁺ cells per mm² was significantly higher in G1 than in G2 (Mann-Whitney, p = 0.004) (Fig. 4). Similarly, the density of CD20⁺ cells was higher in G1 than in G2, although this difference was not statistically significant (Mann-Whitney, p = 0.068). A similar number of CD4⁺ and CD45RO⁺ cells was found in both G1 and G2 (Mann-Whitney, p>0.05) (Fig. 4). When present, mast cells were equally distributed in G1 and G2. However, foxp3⁺ cells were found in 58.82% and 14.28% of the samples of G1 (n = 10) and G2 (n = 3). Findings also revealed a higher number of foxp3⁺ cells in G1 (mean = 13.67 cells/mm²) than in G2 (mean = 6.18 cells/mm²). The number of CD31⁺ blood vessels was significantly higher in G1 than in G2 (Mann-Whitney, p = 0.002) (Fig. 2).

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

Discussion

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

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

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

Immunohistochemistry method is more specific than metachromatic staining by TB.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

References

1. Bergenholtz G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. *J Endod* 1981;7:100-4.
2. Izumi T, Kobayashi I, Okamura K, Sakai H. Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth. *Arch Oral Biol* 1995;40:609-14.
3. Okiji T, Jontell M, Belichenko P, Dahlgren U, Bergenholtz G, Dahlström A. Structural and functional association between substance P and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves and accessory cells in the rat dental pulp. *J Dent Res* 1997;76:1818-24.
4. Nanci A. *Ten Cate's oral histology: Development, structure and function*, 6th ed. St Louis: Mosby; 2003.
5. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and molecular immunology*, 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2003.
6. Avery JK. *Oral development and histology*, 3rd ed. New York: Thieme; 2002.
7. Bergenholtz G. Pathogenic mechanisms in pulpal disease. *J Endod* 1990;16:98-101.
8. Holzer P. Local effector function of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: Involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 1988;24:739-68.
9. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:179-200.
10. Freitas P, Novaretti CP, Rodini CO, Batista AC, Lara VS. Mast cells and lymphocyte subsets in pulps from healthy and carious human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:95-102.
11. Rodini CO, Batista AC, Lara VS. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and

- periapical cysts: Possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:59-63.
12. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2514-23.
 13. Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *J Endod* 2007;33:773-81.
 14. Brody AR, Bonner JC, Overby LH. Interstitial pulmonary macrophages produce platelet-derived growth factor that stimulates rat lung fibroblast proliferation in vitro. *J Leukoc Biol* 1992;51:640-8.
 15. Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol* 1995;6:230-47.
 16. Pimenta FJ, Sá AR, Gomez RS. Lymphangiogenesis in human dental pulp. *Int Endod J* 2003;12:853-6.
 17. Akbar AN, Taams LS, Salmon M, Vukmanovic-Stejic M. The peripheral generation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Immunology* 2003;109:319-25.
 18. Chen W, Jin W, Hardegen N. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁺ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor *Foxp3*. *J Exp Med* 2003;198:1875-86.
 19. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 2007;8:457-62.
 20. Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. The dynamics of pulp inflammation: Correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1963;16:969-77.
 21. Närhi MVO. Dentinal and pulpal pain. In: Bergenholtz G, Hørsted-Bindslev P, Reit C. *Textbook of Endodontology*. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2003. p. 43-56.
 22. Farnoush A. Mast cells in human dental pulp. *J Endod* 1984;10:250-2.
 23. Walsh LJ, Davis MF, Xu LJ, Savage NW. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 1995;24:266-72.

24. Batista AC, Rodini CO, Lara VS. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. *Oral Dis* 2005;4:249-54.
25. Oliveira-Neto HH, Leite AF, Costa NL, Alencar RC, Lara VS, Silva TA, Leles CR, Mendonça EF, Batista AC. Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: Possible failure in the migration of these cells. *Oral Oncol* 2007;43:484-90.
26. Walsh LJ. Mast cells and oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:188-98.
27. Lehner T. Special regulatory T cell review: The resurgence of the concept of contrasuppression in immunoregulation. *Immunology* 2008;123:40-4.
28. Nakanishi T, Takahashi K, Hosokawa Y, Adachi T, Nakae H, Matsuo T. Expression of macrophage inflammatory protein 3alpha in human inflamed dental pulp tissue. *J Endod* 2005;31:84-7.
29. Mattuella LG, Figueiredo JAP, Nör JE, Araújo FB, Fossati ACM. Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in the pulp of human primary and young permanent teeth. *J Endod* 2007;33:1408-12.
30. Mattuella LG, Bento LW, Figueredo JAP, Nör JE, Araújo FB, Fossati ACM. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. *J Endod* 2007;33:524-30.

Acknowledgments

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

TABLE 1. Antibodies and protocols of immunohistochemical reactions

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

¹Dako (Carpinteria, CA, USA).

²Novocastra (New Castle, UK).

³Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

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

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

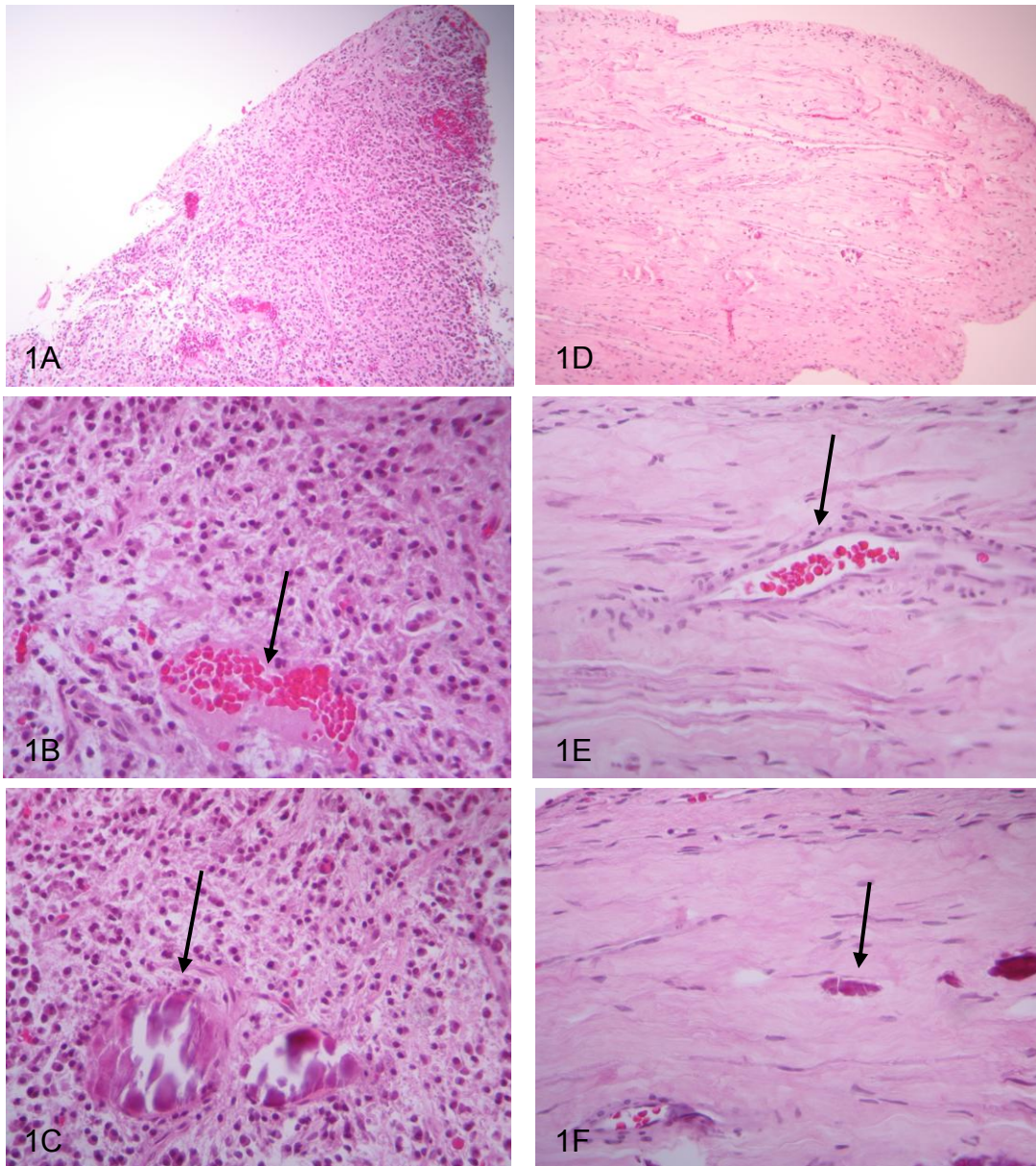


Figure 1. Dental pulp with intense inflammatory infiltrate and mild collagen deposition (A-C) and dental pulp with scarce inflammatory infiltrate and intense collagen deposition (D-F). Preserved, dilated and congested blood vessels (B and E - arrow) and calcifications (C and F - arrow). Hematoxylin and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

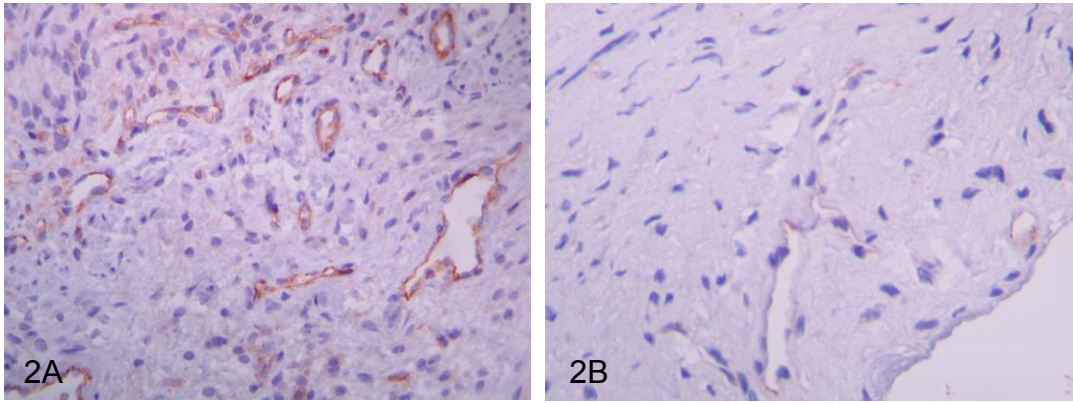


Figure 2. CD31⁺ blood vessels (brown stain) distributed in dental pulp with intense inflammatory infiltrate and mild collagen deposition (A) and in dental pulp with scarce inflammatory infiltrate and intense collagen deposition (B). Immunohistochemical staining. Original magnification: A and B, x 400.

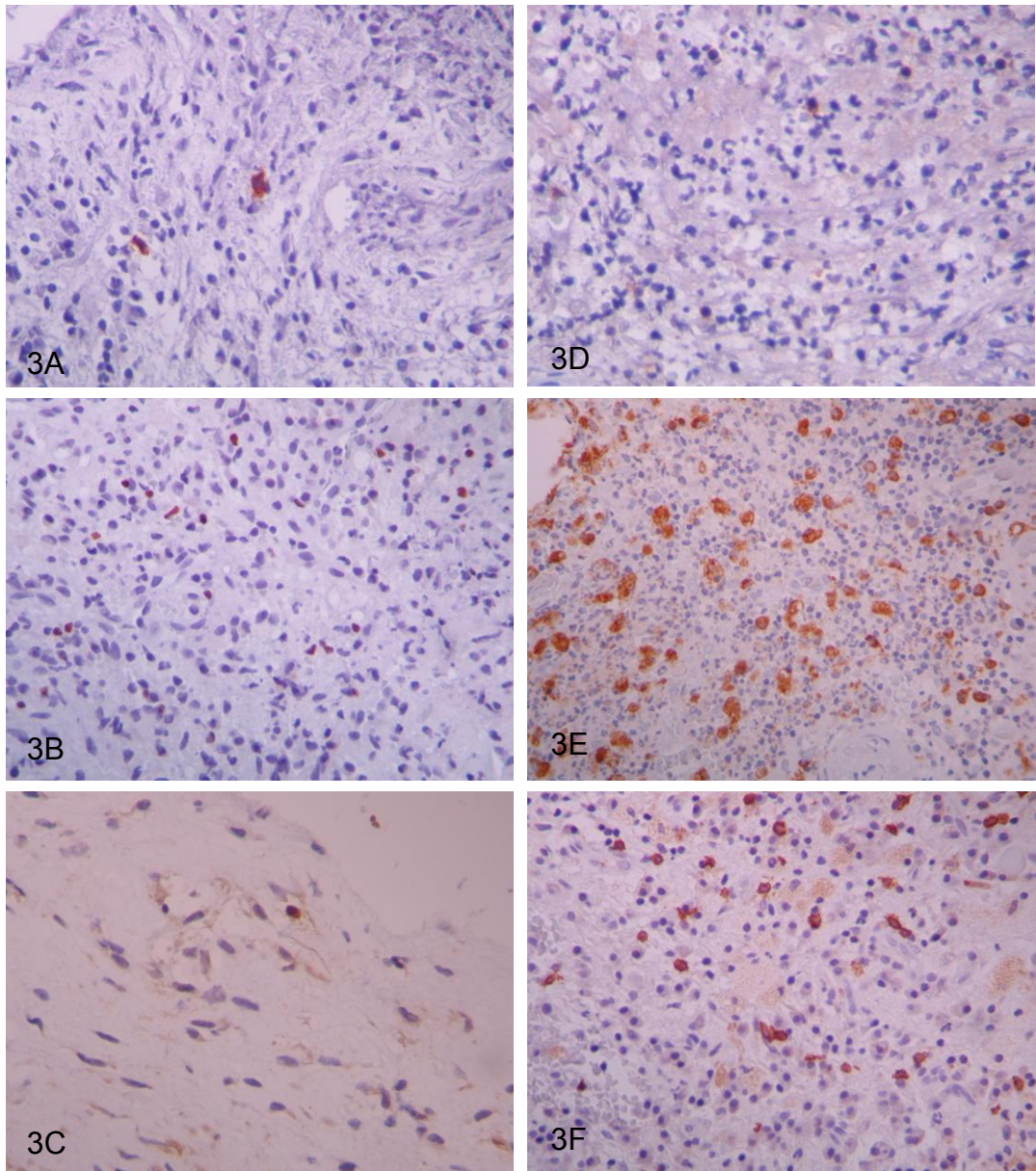


Figure 3. Representative immunostaining of triptase mast cells⁺ (A), foxp3⁺ T regulatory cells (B), CD4⁺ cells (C), CD45RO⁺ cells (D), CD68⁺ cells (E) and CD20⁺ cells (F) distributed in inflamed dental pulp. Immunohistochemical staining. Original magnification: A-F, x 400.

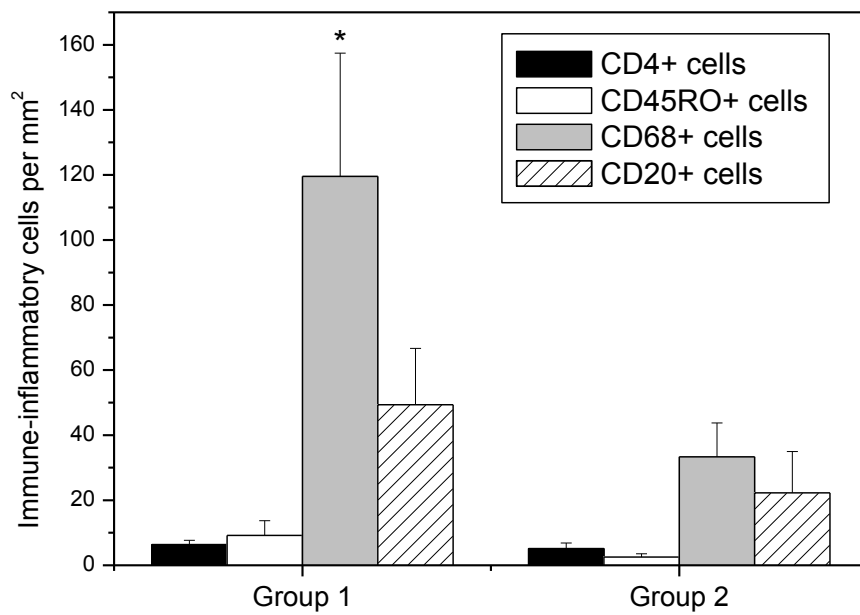


Figure 4. Density of CD4⁺, CD45RO⁺, CD68⁺, and CD20⁺ cells/mm² in G1 (dental pulp with intense inflammatory infiltrate and mild collagen deposition) and G2 (dental pulp with scarce inflammatory infiltrate and intense collagen deposition). Results are expressed as mean of positive cells/mm² ± SD. The Mann-Whitney test was used to compare groups at a level of significance set at 0.05. (*) Significant difference in CD68⁺ cell density in comparison of G1 with G2.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

As células imune-inflamatórias avaliadas estiveram difusamente distribuídas pelo tecido pulpar de todas as amostras. Os mastócitos estiveram ausentes na maioria delas e quando presentes (23,6%) mostraram-se igualmente distribuídos em G1 e G2, sendo detectados em baixa densidade (média de 6.62 cells/mm²). Esses achados estão de acordo com estudos prévios que reportaram pequenas populações ou ausência de mastócitos em polpas sadias e com inflamação em estágio inicial (Farnoush, 1984; Freitas *et al.*, 2007). O número reduzido dessas células em pulpites pode interferir com o mecanismo de defesa pulpar, uma vez que os mastócitos são células imunorregulatórias. Por outro lado, a ausência dessas células pode ser interpretada como uma forma de modulação da resposta inflamatória pulpar, por minimizar o aumento da pressão tecidual e prevenir a necrose do tecido (Walsh *et al.*, 1995; Walsh, 2003).

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

As células T regulatórias foxp3⁺ foram verificadas em 34,21% das amostras, também em baixa densidade (média de 10.49 cells/mm²). Esse fato é de extrema importância, uma vez que o presente estudo é pioneiro na identificação dessas células em polpas inflamadas. Observou-se maiores quantidades de células foxp3⁺ no G1, indicando o efeito das mesmas no controle da imunidade (Lehner, 2008), capaz de prevenir a inflamação exacerbada e a rápida necrose do tecido pulpar. Ainda, essas células podem causar um efeito supressor nas células T (Lehner, 2008), levando à diminuição das mesmas. Menores quantidades de células T CD4⁺ e CD45RO⁺ quando comparadas às células CD68⁺ e CD20⁺ foram identificadas em todas as amostras analisadas.

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

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

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

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

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

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

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

6. REFERÊNCIAS

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

13. Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *J Endod* 2007;33:773-81.
14. Holzer P. Local effector function of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: Involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 1988;24:739-68.
15. Izumi T, Kobayashi I, Okamura K, Sakai H. Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth. *Arch Oral Biol* 1995;40:609-14.
16. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:179-200.
17. Lehner T. Special regulatory T cell review: The resurgence of the concept of contrasuppression in immunoregulation. *Immunology* 2008;123:40-4.
18. Mattuella LG, Bento LW, Figueredo JAP, Nör JE, Araújo FB, Fossati ACM. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. *J Endod* 2007;33:524-30.
19. Mattuella LG, Figueiredo JAP, Nör JE, Araújo FB, Fossati ACM. Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in the pulp of human primary and young permanent teeth. *J Endod* 2007;33:1408-12.
20. Nanci A. Ten Cate's oral histology: Development, structure and function, 6th ed. St Louis: Mosby; 2003.
21. Närhi MVO. Dentinal and pulpal pain. In: Bergenholtz G, Hørsted-Bindslev P, Reit C. *Textbook of endodontology*. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2003. p. 43-56.
22. Okiji T, Jontell M, Belichenko P, Dahlgren U, Bergenholtz G, Dahlström A. Structural and functional association between substance P- and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves and accessory cells in the rat dental pulp. *J Dent Res* 1997;76:1818-24.
23. Oliveira-Neto HH, Leite AF, Costa NL, Alencar RC, Lara VS, Silva TA, Leles CR, Mendonça EF, Batista AC. Decrease in mast cells in oral

- squamous cell carcinoma: Possible failure in the migration of these cells. *Oral Oncol* 2007;43:484-90.
24. Pimenta FJ, Sá AR, Gomez RS. Lymphangiogenesis in human dental pulp. *Int Endod J* 2003;12:853-6.
 25. Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol* 1995;6:230-47.
 26. Rodini CO, Batista AC, Lara VS. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: Possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:59-63.
 27. Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. The dynamics of pulp inflammation: Correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1963;16:969-77.
 28. Walsh LJ, Davis MF, Xu LJ, Savage NW. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 1995;24:266-72.
 29. Walsh LJ. Mast cells and oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:188-98.
 30. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2514-23.
 31. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 2007;8:457-62

7. ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PROTOCOLO Nº
102/2007

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

PARECER CONSUBSTANCIADO

I – Identificação:

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

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

III – Sumário do projeto:

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

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

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

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

V – Parecer do COEP:

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

VI – Data da reunião: 11/02/2008

Assinatura do relator:

Assinatura do Coordenador/COEP:


Rita Goreti Amaral
Coordenadora do CEP/PRPPG/UFG

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

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

Pesquisador (a) responsável: Kely Firmino Bruno.

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

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

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

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

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

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

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

Nome e assinatura do pesquisador:

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____

RG: _____, CPF: _____, nº do

prontuário: _____, abaixo assinado, concordo em participar do

estudo “Análise das respostas inflamatória e imunológica de polpas

humanas de dentes permanentes”, como sujeito. Fui devidamente informado

e esclarecido pela pesquisadora Kely Firmino Bruno sobre a pesquisa, os

procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios

decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu

consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer

penalidade ou interrupção de meu acompanhamento / assistência /

tratamento.

Local e data: _____

Nome e assinatura do sujeito ou responsável: _____

Presenciamos a solicitação do consentimento, esclarecimentos sobre a

pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (não ligada à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

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

1 SOLUÇÕES

1.1 Hematoxilina de Harris

| | |
|--------------------------------|--------|
| Hematoxilina (cristais)..... | 5g |
| Álcool absoluto..... | 50mL |
| Alúmen de potássio..... | 100g |
| Água destilada..... | 1000mL |
| Óxido de mercúrio amarelo..... | 2,5g |

1.2 Eosina

Solução de eosina a 1%

| | |
|------------------------------|------|
| Solução A- Eosina..... | 1g |
| Água destilada..... | 20mL |
| Após a dissolução adicionar: | |
| Álcool 95%..... | 80mL |

Para usar diluir uma parte de eosina para três partes de álcool 80,0% e adicione 0.5mL de ácido acético glacial por 100mL de solução.

2 ETAPAS DA TÉCNICA DE H.E.

2.1 Desparafinização

| | |
|--------------|------------|
| Xilol 1..... | 15 minutos |
| Xilol 2..... | 15 minutos |
| Xilol 3..... | 15 minutos |

2.2 Hidratação

| | |
|------------------------|------------|
| Álcool absoluto 1..... | 2 segundos |
|------------------------|------------|

| | |
|------------------------|------------|
| Álcool absoluto 2..... | 2 segundos |
| Álcool absoluto 3..... | 2 segundos |
| Álcool 95%..... | 2 segundos |
| Álcool 70%..... | 2 segundos |
| Água corrente..... | 5 minutos |

2.3 Coloração

| | |
|-----------------------------|-----------------|
| Hematoxilina..... | 5 minutos |
| Lavar em água..... | tirar o excesso |
| Diferenciador..... | 10 segundos |
| Lavar em água corrente..... | 10 minutos |
| Eosina..... | 5 minutos |

2.4 Desidratação

| | |
|------------------------|------------|
| Álcool 70%..... | 2 segundos |
| Álcool 95%..... | 2 segundos |
| Álcool absoluto 1..... | 2 segundos |
| Álcool absoluto 2..... | 2 segundos |
| Álcool absoluto 3..... | 2 segundos |
| Xilol 1..... | 2 segundos |
| Xilol 2..... | 2 segundos |
| Xilol 3..... | 2 segundos |

2.5 Montagem das lâminas com os cortes corados com resina

Permout e lamínula

Anexo 4 - Soluções e etapas da técnica de Imunoistoquímica (FO/UFG)

(Protocolo adaptado dos Laboratórios de Imunoistoquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo – FOB/USP)

1- Passar as lâminas em xilol, 3 vezes, 10 minutos cada vez (pode ficar mais tempo);

2- Passar as lâminas em álcool, para hidratá-las:

- álcool absoluto: 2 minutos
- álcool absoluto: 2 minutos
- álcool 95%: 2 minutos
- álcool 70%: 2 minutos

3- Lavar as lâminas, 2 vezes, em PBS ou TBS (com Triton X-100);

*Solução de **PBS** (Receita FOB/USP)- O pH deve ser de 7.2-7.4:*

Para 2L de solução: 2,76g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$; 13,92g de K_2HPO_4 e 14,4g de NaCl

Para cada 1L de solução Tampão, pingar 1 gota de Triton X-100

*Solução de **TBS** (Receita FOB/USP)- O pH deve ser de 7.2-7.4:*

Para 2L de solução: 11,7g de TRIS e 17g de NaCl

Para cada 1L de solução Tampão, pingar 1 gota de Triton X-100

4- Lavar em água destilada morna (deixar 2 minutos no microondas);

5- Colocar as lâminas em Tampão Citrato (pH – 6,0) a 95°C (Banho Maria: 96-97°C) – Deixar por aproximadamente 25 a 30 minutos (**não** pode ser deixado por mais tempo);

- ❖ ***Tampão Citrato (Receita FOB/USP): 1,152g de ácido cítrico para 600mL de água destilada***

6- Manter as lâminas no Tampão Citrato em temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos - para um resfriamento progressivo;

7- Lavar as lâminas PBS ou TBS com Triton X-100;

8- Incubar as lâminas com H₂O₂ 3% em PBS ou TBS, por 30 a 40 minutos (pode ser deixado por mais tempo), para bloqueio da peroxidase endógena;

❖ *H₂O₂ 3% : 30 mL H₂O₂ 30 V para 220 mL PBS/ TBS*

9- Lavar as lâminas PBS ou TBS com Triton X-100;

10- Incubar as lâminas em solução de Leite Molico

❖ *Solução de Leite Molico (Receita FOB/USP): Para 250 mL de água destilada adicionar 10g de Leite Molico*

11- Secar as lâminas cuidadosamente (ao redor do corte), delimitar o corte com a caneta de silicone e colocá-las na bandejinha. Rapidamente deve-se adicionar o ANTICORPO PRIMÁRIO, o qual deve estar adequadamente diluído conforme padronização prévia. Não pode deixar os cortes secos!!!

❖ **O Anticorpo primário diluído deve ser mantido em GELO**

❖ *Os Acs primários serão diluídos em PBS-BSA, de maneira que, para cada 25mL de PBS sejam adicionados 0,25 g de BSA (pó) ou para cada 25 mL de PBS sejam adicionados 25 µL de BSA (líquido);*
média de

❖ *Aproximadamente utiliza-se 100 µL de solução (anticorpo) para cada lâmina;*

OVERNIGHT (Mínimo de 8 horas)

12- Lavagem com PBS ou TBS com Triton X-100, 6 vezes ou mais (utilizando da pipeta de Pasteur), e secar ao redor da delimitação da corte.

Devemos lavar MUITO BEM, temos que ter certeza que não estamos deixando resíduo de anticorpo;

13- Incubação com Ac secundário (pingar \pm 2 gotas para cada corte), em temperatura ambiente, usando o Kit DAKO LSAB + Peroxidase. Incubar com LINK (**SOLUÇÃO AMARELA**), por 15-30 minutos (pode ser deixado por mais tempo). O recipiente com a solução amarela deve ser mantido resfriado (em GELO);

14- Lavagem com PBS ou TBS com Triton X-100, 6 vezes ou mais (utilizando da pipeta de Pasteur), e secar ao redor da delimitação da corte. Devemos lavar MUITO BEM, temos que ter certeza que não estamos deixando resíduo de anticorpo;

15- Incubar com a *Streptavidina + Peroxidase* (**SOLUÇÃO VERMELHA**), por 15 a 30 minutos (pode ser deixado por + tempo). O recipiente com a solução vermelha deve ser mantido resfriado (em GELO);

16- Lavagem com PBS ou TBS com Triton X-100, 6 vezes ou mais (utilizando da pipeta de Pasteur), e secar ao redor da delimitação da corte. Devemos lavar MUITO BEM, temos que ter certeza que não estamos deixando resíduo de anticorpo;

17- Incubar com a solução de DAB

- ❖ Preparar o DAB: **1mL** de *substrato tamponado com H₂O₂* (recipiente maior) e **1 gota** de *DAB + cromógeno* (recipiente pequeno de tampa azul)

18- Colocar em água destilada em um berço de coloração de vidro;

19- Contra-corar:

- Hematoxilina: por 15 a 30 segundos (Máximo de 1 minuto). Retirar e lavar em água corrente por 5 a 10 minutos;

Passar no diferenciador (coloca e retira rapidamente) e deixar escorrer em água corrente por 10 minutos (*Esse passo - diferenciador - não é necessário se deixar pouco tempo na Hematoxilina*);

- Passar em álcool 70% (1 minuto), em álcool 95% (1 minuto), 2x em álcool absoluto (1 minuto cada);

- Passar 3 vezes em xilol (2 minutos em cada);

- Montar a lamínula com resina.

Anexo 5 – Normas de publicação do Journal of Endodontics

Guidelines for Publishing Papers in the JOE

Writing an effective article is a challenging assignment. The following guidelines are provided to assist authors in submitting manuscripts.

1. The *JOE* publishes original and review articles related to the scientific and applied aspects of endodontics. Moreover, the *JOE* has a diverse readership that includes full-time clinicians, full-time academicians, residents, students and scientists. Effective communication with this diverse readership requires careful attention to writing style.

2. General Points on Composition

Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (e.g., spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery since their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision, or have unacceptable grammar. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the *JOE*:

- a. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “ c” , below), or sentences with little to no transition within a paragraph.
- b. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors’

names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, “ In 1983, Langeland et al., reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “ Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al., 1983)” . In this example, the paragraph’ s subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.

- c. Sentences are stronger when written in the active voice, i.e., the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as “ was,” “ were,” “ could,” etc. For example: “ Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation” , can be edited to: “ Our results demonstrated that dexamethasone reduced inflammation” . Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.
- d. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of focus or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph.(This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)
- e. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “ Formerly, Endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method” , can be edited to “ Formerly, Endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation” . The use of parallel construction in sentences

simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.

- f. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “ Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used” , can be edited to “ Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study” .
- g. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’ s theme.

3. General Points on the Organization of Original Research Manuscripts

- a. **Please Note:** *Starting in 2009, all abstracts should be organized into sections that start with a one-word title (in bold), i.e., Introduction, Methods, Results, Conclusions, etc., and should not exceed more than 250 words in length.*
- b. **Title Page:** The title should describe the major conclusion of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your advertising billboard—it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (e.g., use “sodium hypochlorite” rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at www.icmje.org).
- c. **Abstract:** The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings and conclusions. The abstract should describe the new contributions made by this study. The word limitations (250 words) and the wide distribution of the abstract (e.g., PubMed) make this section challenging to write clearly. This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since

the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.

- d. **Introduction:** The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the *JOE*. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to provide sufficient detail. However, many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals.
- e. **Material and Methods:** The objective of the methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The three components to this section are the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the particular aspects used in the present study. The inclusion of a “methods figure” will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a commercial product, the manuscript should state that they either followed manufacturer’s protocol or specify any changes made to the protocol. Studies on humans should conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB approved the protocol and that informed consent was obtained. Studies involving animals should state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis, drop-outs from clinical trials, etc.

- f. **Results:** Only experimental results are appropriate in this section (i.e., neither methods nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study. Do not include all available data without justification, any repetitive findings will be rejected from publication. All Figs./Charts/Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings.

Figures: There are two general types of figures. The first type of figure includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photo-, radio- or micrographs take up one column-width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two columns-width figure (i.e., about 175 mm wide X 125 mm high when published in the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing on your part given the small size of each panel, you will only be able to illustrate the most important feature of each photomicrograph. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (e.g., “ A” , “ B” , etc.), in order for the reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Chang, et al, (*JOE* 28:90, 2002), Hayashi, et al, (*JOE* 28:120, 2002) and by Davis, et al (*JOE* 28:464, 2002). At the Editor’ s discretion, color figures may be published at no cost to the authors. However, the Editor is limited by a yearly allowance and this offer does not include printing of reprints.

The second type of figure are graphs (i.e., line drawings) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but

was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

Tables: Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not necessary:

| % NaOCl | N/Group | % Inhibition of Growth |
|---------|---------|------------------------|
| 0.001 | 5 | 0 |
| 0.003 | 5 | 0 |
| 0.01 | 5 | 0 |
| 0.03 | 5 | 0 |
| 0.1 | 5 | 100 |
| 0.3 | 5 | 100 |
| 1 | 5 | 100 |
| 3 | 5 | 100 |

Instead, the results could simply state that there was no inhibition of growth from 0.001-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03-3% NaOCl (N=5/group). Similarly, if the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure. These and many other suggestions on figure and table construction are described in additional detail in Day (1998).

g. **Discussion:** The conclusion section should describe the major findings of the study. Both the strength and weaknesses of the observations should be discussed. What are the major conclusions of the study? How does the data support these conclusions? How do these findings compare to the published literature? What are the clinical implications? Although this last section might be tentative given the nature of a particular study, the authors should realize that even preliminary clinical implications might have value for the clinical readership. Ideally, a review of the potential clinical significance is the last section of the discussion.

h. **References:** The reference style follows Index Medicus and can be efficiently learned from reading past issues of the *JOE*. Citations are

placed in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.

4. **Page Limitations for Manuscripts in the Category of Basic Science/Endodontic Techniques**

- a. **What is the limitation?** Original research reports in the category of basic science/endodontic techniques are limited to no more than 2,000 words (total for the abstract, introduction, methods, results and conclusions), and a total of three Figs./Charts/Tables. If a composite figure is used (as described above), then this will count as two of the three permitted Figs./Charts/Tables.
- b. **Does this apply to me?** Manuscripts submitted to the *JOE* can be broadly divided into several categories including review articles, clinical trials (e.g., prospective or retrospective studies on patients or patient records, or research on biopsies excluding the use of human teeth for technique studies), basic science/biology (animal or culture studies on biological research related to endodontics, or relevant pathology or physiology), and basic science/techniques (e.g., stress/strain/compression/strength/failure/composition studies on endodontic instruments or materials). Manuscripts submitted in this last category are the only category subject to these limitations. If you are not sure whether your manuscript falls within this category please contact the Editor by e-mail at jendodontics@uthscsa.edu.
- c. **Why page limitations?** Most surveyed stakeholders of the *JOE* desire timely publication of submitted manuscripts and an extension of papers to include review articles and other features. To accomplish these goals, we must reduce the average length of manuscripts since increasing the *JOE*'s number of published pages is prohibitively expensive. Although a difficult decision, restricting this one category of manuscripts accomplishes nearly all of these goals since ~40-50% of published papers are in this category.
- d. **How do I make my manuscript fit these limitations?** Adhering to the general writing methods described in these guidelines (and in the

resources listed below) will help to reduce the size of the manuscript. Authors are encouraged to focus on only the essential aspects of the study and to avoid inclusion of extraneous text and figures. The Editor will reject manuscripts that exceed these limitations.

5. **Available Resources:**

- a. Strunk W, White EB. The Elements of Style. Allyn & Bacon, 4th ed, 2000, ISBN 020530902X.
- b. Day R. How to Write and Publish a Scientific Paper. Oryx Press, 5th ed. 1998. ISBN 1-57356-164-9.
- c. Woods G. English Grammar for Dummies. Hungry Minds:NY, 2001 (an entertaining review of grammar).
- d. Alley M. The Craft of Scientific Writing. Springer, 3rd edition 1996 SBN 0-387-94766-3.
- e. Alley M. The Craft of Editing. Springer, 2000 SBN 0-387-98964-1.

Análise microscópica de polpas de dentes humanos permanentes traumatizados

**Kely Firmino BRUNO^a, Ana Helena Gonçalves de ALENCAR^b, Carlos ESTRELA^b,
Aline Carvalho BATISTA^c, Fabiana Cristina PIMENTA^d**

^a*Departamento de Endodontia, Universidade Paulista – UNIP,
74845-090 Goiânia - GO, Brasil*

^b*Departamento de Endodontia, Universidade Federal de Goiás – UFG,
74605-220 Goiânia - GO, Brasil*

^c*Departamento de Patologia Bucal, Universidade Federal de Goiás – UFG,
74605-220 Goiânia - GO, Brasil*

^d*Departamento de Microbiologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública,
Universidade Federal de Goiás – UFG, 74605-220 Goiânia - GO, Brasil*

Bruno KF, Alencar AHG, Estrela C, Batista AC, Pimenta FC. Microscopic analysis of the human pulp of permanent traumatized teeth. Rev Odontol UNESP. 2009; 38(1): 15-21.

Resumo: O presente estudo tem como objetivos analisar microscopicamente a polpa de 20 dentes humanos permanentes traumatizados com coroa intacta e diagnóstico clínico de necrose pulpar, e avaliar a confiabilidade desse diagnóstico mediante os achados histopatológicos. As amostras de polpas removidas foram coradas pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina, para avaliar possíveis alterações morfológicas, e pelo método de Brown e Brenn, para verificação de microrganismos. As análises - subjetiva geral e estatística (análise de diagnóstico) - revelaram que 3 dentes (15%) não apresentaram tecido pulpar, sendo caracterizados como autólise total, e 17 (85%) tiveram suas amostras de polpas analisadas à microscopia, sendo que 3 (15%) apresentaram necrose parcial sem condições de reparo e 14 (70%), necrose total; em 12 (65%) das 17 amostras de polpas, pôde ser verificada, pelo método de Brown e Brenn, a presença de microrganismos e nenhum dos critérios clínicos empregados no diagnóstico de necrose pulpar em dentes traumatizados foi patognomônico. Diante dos resultados, as seguintes conclusões podem ser destacadas: a) mediante os achados microscópicos, 100% dos dentes traumatizados estavam necróticos e em 65% destes, constatou-se presença de microrganismos; b) os testes de vitalidade pulpar ao calor, ao frio e o teste de percussão vertical foram os mais confiáveis para o diagnóstico de necrose pulpar nos dentes traumatizados.

Palavras-chave: *Traumatismo; necrose pulpar; microscopia.*

Abstract: This study microscopically analyzed the pulp of 20 human permanent traumatized teeth with intact crowns and clinical diagnosis of pulp necrosis, and evaluated this diagnosis concerning histopathologic findings. The removed pulp specimens were stained with hematoxylin and eosin, for evaluation of possible morphological alterations, and Brown e Brenn method, to verify microorganisms. General subjective analysis and statistical analyses (diagnostic analysis) revealed that 3 teeth (15%) did not present pulp tissue, being characterized as complete autolysis; analysis of pulp samples was performed on the other 17 (85%) cases, among which 3 (15%) exhibited partial necrosis without possibility of repair and 14 (70%) presented complete necrosis; in 12 (65%) out of 17 pulps the presence of microorganisms could be conformed by Brown and Brenn method and none of the clinical criteria employed for the diagnosis of pulp necrosis in traumatized teeth was pathognomonic. The present results allowed the following conclusions: concerning the microscopic findings, 100% of traumatized teeth presented pulp necrosis and 65% of them with microorganisms; the pulp vitality tests to heat, cold and vertical percussion test were the most reliable to diagnose pulp necrosis in traumatized teeth.

Keywords: *Trauma; pulp necrosis; microscopy.*

Introdução

Os traumatismos dentários têm representado um desafio frequente na clínica odontológica. Resultam em lesões às estruturas pulpares e periodontais que comprometem a estética e a função do aparelho estomatognático, além de representarem um sério problema de ordem emocional e psicológica para o paciente^{7,13}.

As principais alterações pulpares decorrentes dos traumatismos dentários são: necrose pulpar, obliteração e reabsorção do canal radicular^{5,8}. Na medida em que a necrose pulpar é a alteração mais frequente^{8,14}, o seu diagnóstico precoce se faz necessário previamente à invasão de microrganismos e ao início das reabsorções externas, para que se obtenha um prognóstico mais favorável. Todavia, esse diagnóstico é limitado e pode apresentar falhas, uma vez que ainda não existe precisão e tampouco padronização dos métodos de diagnóstico para determinação da condição pulpar pós-traumatismo^{5,12}.

Alguns critérios para o diagnóstico de necrose pulpar em dentes traumatizados, como ausência de resposta aos testes de vitalidade pulpar, escurecimento progressivo da coroa, radiolucidez periapical, paralização da rizogênese e resposta positiva ao teste de percussão vertical, têm sido sugeridos⁶. Entretanto, esses critérios são relativos e podem ter significados diferentes ao longo do período pós-traumatismo¹⁶, gerando insegurança quanto ao momento correto da intervenção endodôntica.

Os testes de vitalidade pulpar térmicos ao calor e ao frio (87,5%) e elétrico (62,5%) não se mostraram totalmente confiáveis na detecção de necrose pulpar²⁰. A alteração de coloração da coroa também não é patognômica de necrose pulpar, pois com a hemorragia intrapulpar pós-traumática, poderia haver o extravasamento de eritrócitos e subprodutos de sua decomposição para o tecido adjacente, tornando a coroa rósea ou acinzentada. Uma vez restabelecida a circulação normal da área, esses subprodutos poderiam ser removidos e a coroa recuperar sua coloração original⁴. A presença de áreas radiolúcidas localizadas no periápice de dentes luxados pode representar estágios intermediários do reparo pulpar, não sendo, necessariamente, indicativa de necrose pulpar². Em uma avaliação histobacteriológica de polpas extirpadas com diagnóstico clínico de necrose pulpar após traumatismo dentário, foi verificado que 9 a 14% dessas polpas tinham potencial para reparo e, portanto, não deveriam ter sido removidas³.

Essa dificuldade encontrada na clínica diária, de se realizar o diagnóstico preciso da necrose pulpar em dentes traumatizados, salienta a necessidade de novos estudos que tragam informações fundamentadas da histopatologia do tecido pulpar desses dentes.

Assim, o presente estudo tem como objetivos analisar microscopicamente a polpa de dentes humanos permanentes

traumatizados com diagnóstico clínico de necrose pulpar e verificar a confiabilidade desse diagnóstico mediante os achados histopatológicos.

Material e método

Procedimentos clínicos

Para este estudo, foram selecionados 20 pacientes do Projeto de Pesquisa e Extensão “Lugar de dente é na boca”, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia - GO, Brasil.

Os critérios de inclusão para amostra foram dentes que haviam sofrido traumatismo com acometimento dos tecidos periodontais (subluxação – 8 dentes; luxação extrusiva – 3 dentes; luxação lateral – 2 dentes, e avulsão – 7 dentes), com coroa intacta e diagnóstico clínico de necrose pulpar.

Os critérios de exclusão para amostra foram dentes portadores de fratura radicular, de lesão periapical, de bolsa periodontal, de reabsorções ou de obliteração do canal radicular.

Os seguintes dados clínicos foram coletados: a) tipo de traumatismo; b) data do traumatismo e tempo decorrido deste até a intervenção endodôntica; c) coloração da coroa; d) resposta aos testes de vitalidade pulpar (TVP) térmicos e elétrico (positiva ou negativa), conforme os seguintes procedimentos: para o teste de calor, utilizou-se bastão de guta-percha aquecido, que foi aplicado no centro da face vestibular do dente em questão, previamente lubrificado com vaselina, sob isolamento relativo; no teste de frio, utilizou-se o gás refrigerante Endofrost –50 °C (Roeko, Langenau - Alemanha), que foi aplicado no centro da face vestibular do dente em questão, sob isolamento relativo; para o teste elétrico: foi utilizado o aparelho *Endoanalyser* (Kerr, Michigan - EUA), colocando-se a ponta do eletrodo no centro da face vestibular lubrificada com flúor gel, sob isolamento relativo, e o valor de resposta fornecido foi anotado; e) resposta aos testes de percussão vertical (TPV) e horizontal (TPH) (positiva ou negativa); f) dor à palpação (ausente ou presente); g) sintomatologia (ausente ou presente); e g) mobilidade (normal ou aumentada).

Todos esses dados clínicos também foram coletados dos dentes contralaterais aos traumatizados, com o objetivo de verificar o padrão de resposta de cada paciente.

O exame radiográfico foi realizado com posicionador de radiografia para adulto (Indusbelo, Londrina - PR) e filme radiográfico Insight (Kodak, Eastman - EUA), em um mesmo aparelho de radiografia, garantindo-se tensão e intensidade de correntes constantes. A análise das radiografias ocorreu em ambiente de luz indireta, em momento diferente do exame clínico. Máscaras especiais de papel cartão preto foram confeccionadas para permitir melhor visualização da radiografia no negatoscópio.

Uma vez diagnosticada clinicamente a necrose pulpar, pela associação de no mínimo três critérios clínicos (alteração de coloração da coroa, resposta negativa aos testes de vitalidade pulpar térmicos e elétrico, resposta positiva aos testes de percussão vertical e horizontal, dor à palpação e mobilidade aumentada), os dentes foram submetidos à intervenção endodôntica. Cada dente selecionado foi isolado com dique de borracha e recebeu antissepsia com solução de hipoclorito de sódio a 1% (Probem, Catanduva - SP). A abertura coronária foi realizada e a remoção do tecido pulpar, quando presente, foi feita no comprimento de trabalho provisório com lima do tipo Hedström (Maillefer - Suíça), de calibre compatível com o canal radicular. O tecido pulpar removido foi colocado sobre papel cartolina autoclavado e dispensado em recipiente contendo formol a 10%, identificado com o número do paciente, para posterior análise microscópica. Esta análise foi realizada no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás – UFG.

Cada dente foi, então, devidamente preparado segundo o protocolo de tratamento endodôntico para dentes traumatizados do Projeto de Pesquisa e Extensão “Lugar de dente é na boca” da Faculdade de Odontologia da UFG. Esse protocolo preconiza a utilização de hidróxido de cálcio associado ao soro fisiológico ou água destilada como medicação intracanal na primeira sessão de tratamento endodôntico, devendo permanecer no canal radicular por 15 dias. A partir daí, preconiza-se a utilização do calen, que deve ser trocado a cada três meses, e o acompanhamento da condição do dente, por meio de exames clínico e radiográfico, até ser indicada a obturação do canal radicular, na ausência de reabsorções.

Um grupo controle, composto de 10 polpas de pré-molares hígidos extraídos por finalidade ortodôntica, permitiu a verificação das características microscópicas de um tecido pulpar normal. Após a exodontia desses dentes, o terço apical foi removido cuidadosamente com alveolótomo e o dente foi acondicionado em recipiente contendo formol a 10% tamponado. Depois de ser fixada a polpa, foram realizados sulcos perpendiculares ao longo eixo do dente, como se fossem anéis, com uma broca diamantada cilíndrica de número 4219, em alta rotação. Os fragmentos foram luxados com o auxílio de um cinzel e removidos com pinça clínica, permitindo a retirada da polpa íntegra. Esta foi colocada sobre papel cartolina autoclavado e dispensada em recipiente contendo formol a 10% tamponado, para posterior análise microscópica. Essa remoção do tecido pulpar foi baseada em estudos prévios^{15,18}.

Processamento microscópico

As amostras de polpas removidas foram processadas em aparelho histotécnico automatizado (OMA - DM20), onde foram desidratadas em bateria crescente de álcool, diafanizadas em xilol e imersas em parafina líquida, assumindo

a forma de blocos. Cortes seriados de 5,0 µm de espessura foram obtidos mediante a utilização de um micrótomo (Leica - RM2155) e colocados sobre lâmina histológica. Em seguida, os cortes foram submetidos a procedimentos de coloração. As lâminas foram coradas pela técnica de rotina Hematoxilina e Eosina (H.E.) e pelo método de Brown e Brenn (B.B.), e sendo montadas utilizando-se resina para montagem histológica Permount® e lamínulas 24 × 60.

Análise dos resultados

As lâminas coradas em H.E. foram submetidas à análise subjetiva geral com intuito de avaliar a hialinização do colágeno, a presença de vasos sanguíneos, de núcleos celulares, de filetes nervosos e calcificações.

Para identificação de colônias e/ou biofilmes microbianos, foram utilizados os cortes corados pelo método de Brown e Brenn.

A análise de diagnóstico foi realizada para avaliar os dados clínicos empregados para o diagnóstico da necrose pulpar.

Resultado

As dez polpas do grupo controle apresentaram-se com características de normalidade: tecido conjuntivo altamente celularizado, presença de vasos sanguíneos e filetes nervosos preservados, e ausência de calcificações (Figura 1).

Dos vinte dentes traumatizados selecionados para este estudo, três dentes (15%) não apresentaram tecido pulpar, sendo caracterizados como autólise total, e 17 tiveram suas amostras de polpas analisadas, sendo que três (15%) apresentaram necrose parcial (Figura 2) e 14 (70%) necrose total (Figura 3). Nas polpas com necrose parcial, apesar dos fenômenos necróticos e degenerativos serem evidentes em algumas áreas, filetes nervosos ainda puderam ser observados em algumas partes do tecido pulpar, bem como colágeno, núcleos celulares e vasos sanguíneos. Nas polpas com necrose total, pôde-se observar hialinização parcial ou total do colágeno, vasos sanguíneos, núcleos celulares e filetes nervosos em avançado processo degenerativo ou ausentes. A presença de calcificações foi verificada em ambos os grupos.

Das 17 amostras de polpas coradas pelo método de Brown e Brenn, em 13 (65%) pôde ser verificada a presença de microrganismos Gram positivos (Figura 4) e/ou Gram negativos (Figura 5).

Baseado nos achados microscópicos, nenhum dos critérios clínicos empregados no diagnóstico de necrose pulpar em dentes traumatizados foi patognomônico (Tabela 1). Entretanto, os testes de vitalidade pulpar ao calor (respostas negativas em 18 dentes - 90%), ao frio (respostas negativas em 17 dentes - 85%) e o teste de percussão vertical (respostas positivas em 15 dentes - 75%) mostraram-se mais confiáveis que os demais.

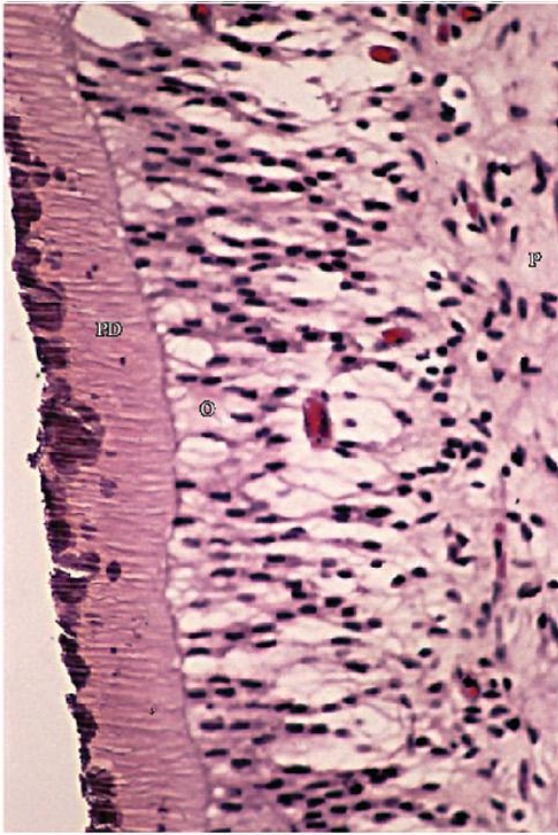


Figura 1. Polpa com características de normalidade (PD: pré-dentina, O: odontoblastos e P: polpa dentária), tecido conjuntivo altamente celularizado, presença de vasos sanguíneos e filetes nervosos preservados e ausência de calcificações (H.E., aumento original: 200x).

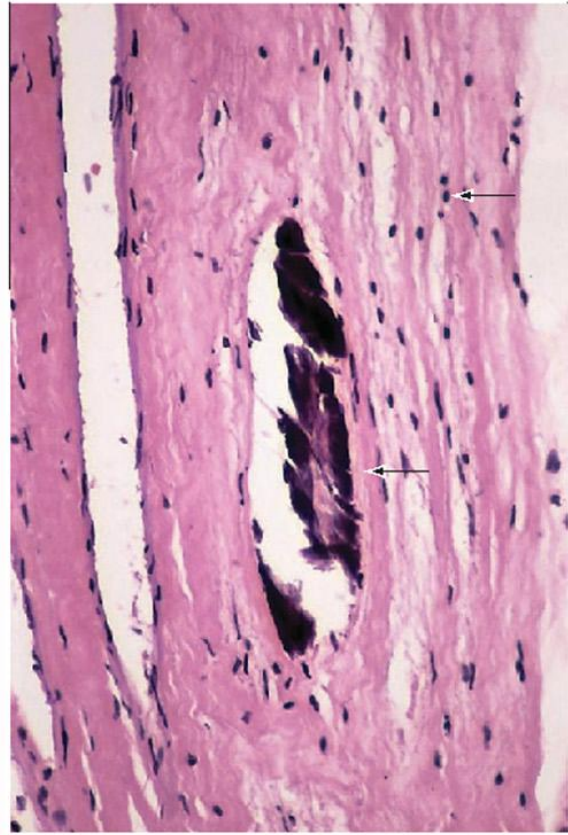


Figura 2. Polpa com necrose parcial, áreas com núcleos celulares preservados (seta superior) e calcificação (seta inferior) (H.E., aumento original: 200x).

Discussão

Para o presente estudo, foram selecionados pacientes com dentes permanentes que sofreram traumatismo com acometimento dos tecidos periodontais (subluxação, luxação extrusiva, luxação lateral e avulsão), com coroa intacta e diagnóstico clínico de necrose pulpar. Não foram formados grupos com número idêntico de amostras porque este estudo não tem como objetivo correlacionar o tipo de traumatismo dentário com o desenvolvimento de necrose pulpar, mas sim verificar se os critérios clínicos e radiográficos disponíveis para tal diagnóstico em dentes traumatizados são condizentes com suas características microscópicas.

A amostra constituiu-se de dentes com ausência de cárie, de restauração, de fratura e comprometimento periodontal, pois essas condições poderiam prover possíveis

fontes de invasão microbiana ao tecido pulpar^{1,21}. Dentes com presença de lesão periapical ou reabsorções também foram excluídos, visto que já foi comprovada, nesses casos, a presença de microrganismos livres no canal radicular, aderidos às suas paredes e/ou penetrando nos túbulos dentinários¹⁹.

Os resultados mostraram que 85% das polpas analisadas à microscopia óptica, mostraram-se necróticas, sendo 15% com necrose parcial sem potencial de reparo e 70% com necrose total. Os três dentes restantes (15%) apresentaram-se com autólise total, encerrando uma amostra final de 100% de dentes não vitais. Resultados estes que se mostraram discordantes dos de Arwill et al.⁹, que encontraram, numa amostra de 25 polpas extirpadas de dentes com diagnóstico clínico de necrose pulpar após traumatismo, apenas 56% das polpas realmente necróticas ao exame microscópico. Cipriano e

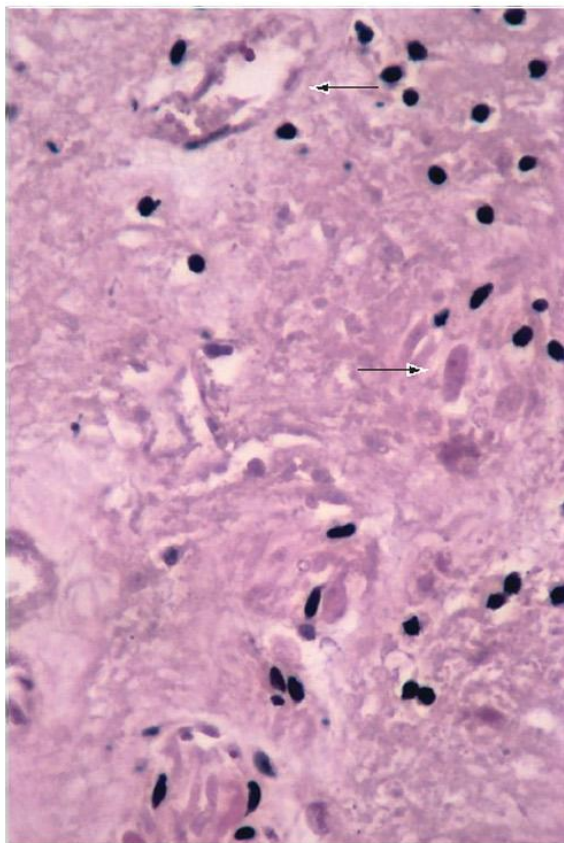


Figura 3. Polpa com necrose total, vasos sanguíneos (seta superior) e núcleos celulares (seta inferior) em degeneração (H.E., aumento original: 400x).

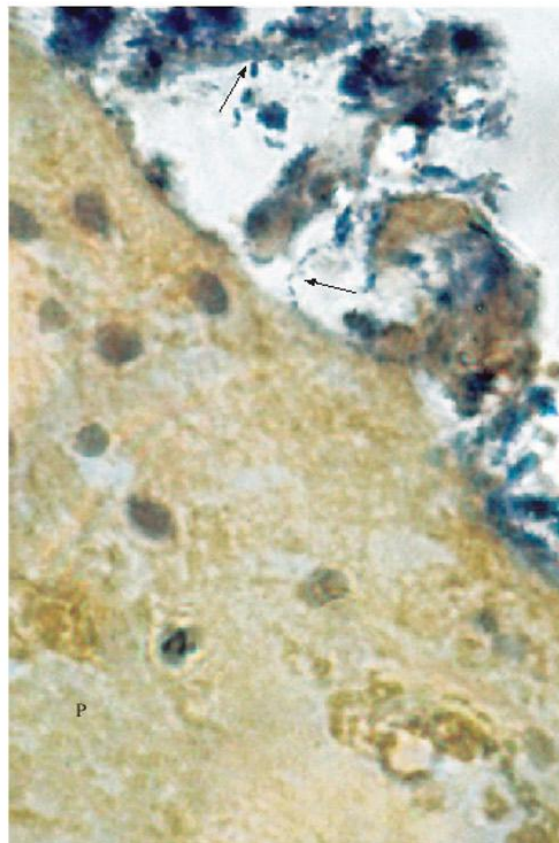


Figura 4. Polpa necrótica (P), colônias de bactérias Gram positivas (seta superior) e cocos Gram positivos (seta inferior) (B.B., aumento original: 1.000x).

Tabela 1. Análise dos critérios clínicos empregados para o diagnóstico clínico de necrose pulpar

| | Critérios clínicos | | | | | | | |
|--|----------------------------|--------------|---------------|------------------|---------|---------|----------------|----------------------|
| | Coroa com alteração de cor | TVP frio (-) | TVP calor (-) | TVP elétrico (-) | TPV (+) | TPH (+) | Dor à palpação | Mobilidade aumentada |
| Dentes com diagnóstico de necrose pulpar | 6 | 17 | 18 | 10 | 15 | 11 | 4 | 10 |

(-): resposta negativa; (+): resposta positiva; TVP: teste de vitalidade pulpar; TPV: teste de percussão vertical; e TPH: teste de percussão horizontal.

Walton¹¹ não conseguiram confirmar microscopicamente o diagnóstico clínico de necrose pulpar após traumatismo em 88% dos dentes analisados. Pode-se ainda contrastar os resultados obtidos neste estudo com os de Andreasen², que verificou, microscopicamente, em uma amostra de 66 dentes com diagnóstico clínico de necrose pulpar, que entre 9 e 14% das polpas extirpadas apresentavam potencial de reparo e não deveriam ter sido removidas.

Essa diferença entre os resultados do presente estudo e os relatados na literatura^{2,9,11} pode ser atribuída, em primeiro lugar, ao ano em que foram realizados os trabalhos, considerando-se a limitação dos métodos de diagnóstico disponíveis na época para determinação da necrose pulpar pós-traumatismo; e, em segundo lugar, nos trabalhos mais atuais, à utilização de critérios clínicos isolados para realizar o diagnóstico de necrose pulpar em dentes traumatizados.

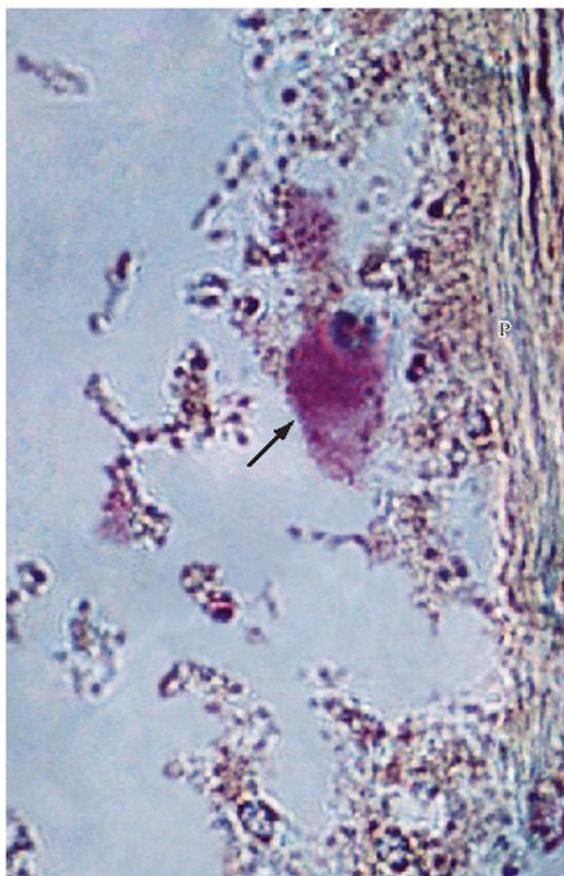


Figura 5. Polpa necrótica (P), colônias de bactérias Gram negativas (seta) (B.B., aumento original: 400x).

Em 65% das amostras de polpas foi verificada a presença de microrganismos pelo método de Brown e Brenn. Essa verificação se faz necessária, uma vez que os microrganismos são capazes de comprometer definitivamente os processos de revascularização e regeneração da polpa isquêmica após lesões por luxação¹³. Estudos prévios demonstraram que em dentes traumatizados com câmara pulpar intacta, a necrose pulpar pode mostrar-se infectada ou permanecer com ausência de microrganismos por longo período de tempo, o que acarreta questionamentos quanto à necessidade ou não de intervenção endodôntica^{9,10,17,23}. Todavia, apesar de um número expressivo de amostras¹³ apresentar microrganismos, esse método se mostrou limitado, pois não foi possível realizá-lo nos três dentes com autólise total. Esses resultados vêm salientar a necessidade da associação do método de Brown e Brenn e com cultura microbiana.

No presente estudo, os critérios utilizados para o diagnóstico clínico da necrose pulpar consistiram em: alteração de coloração da coroa, resposta negativa aos testes de vitalidade pulpar térmicos

e elétrico, resposta positiva aos testes de percussão vertical e horizontal, dor à palpação e mobilidade aumentada^{5,6,16}. O diagnóstico clínico da necrose pulpar do dente traumatizado só foi realizado mediante a associação de no mínimo três desses critérios clínicos, conforme estudos prévios^{5,12}.

Nenhum dos critérios empregados foi patognomônico para o diagnóstico de necrose pulpar nos 20 dentes traumatizados. Todavia, os testes de vitalidade pulpar ao calor (90%), ao frio (85%) e o teste de percussão vertical (75%) foram mais confiáveis que os demais, inclusive quando comparados ao teste elétrico (50%). Novoa²⁰ e Peterson et al.²² também atestaram a superioridade dos testes de vitalidade pulpar térmicos (87,5%) em relação ao teste elétrico (62,5%) no diagnóstico de necrose pulpar. Esse último, ainda tem sido associado a respostas falso-negativas em dentes traumatizados, visto que estimula as fibras nervosas da polpa a produzirem resposta, mas não provê informação sobre o suprimento vascular pulpar. Como após um traumatismo dentário, o suprimento sanguíneo pulpar se restabelece mais rapidamente do que a inervação, o dente pode ter vitalidade, mas estar insensível^{12,16}. Todavia, ainda constitui em um critério clínico importante e não subjetivo, uma vez que fornece um valor que pode ser monitorado.

O teste de percussão vertical tem se mostrado um critério clínico de simples execução e de grande valia. Em estudos anteriores, dentes com polpas necróticas infectadas apresentaram maior sensibilidade à percussão quando comparados a dentes com polpas necróticas não infectadas, indicando que uma resposta positiva ao teste de percussão vertical estaria associada a uma necrose pulpar com presença de microrganismos^{3,5}.

A alteração de coloração da coroa, resposta positiva ao teste de percussão horizontal e mobilidade aumentada após traumatismo dentário também não devem ser esperadas como sinais decisivos de necrose pulpar, mas devem ser associadas aos demais critérios clínicos para realização do diagnóstico^{5,12}. Já a presença de dor à palpação foi o critério clínico de menor confiabilidade para o diagnóstico de necrose pulpar em dentes traumatizados.

Em suma, nenhum dos critérios clínicos utilizados com seus respectivos padrões de respostas foi totalmente confiável para o diagnóstico de necrose pulpar em dentes traumatizados; todavia, um acompanhamento completo e criterioso pela associação de no mínimo três desses critérios permite uma maior precisão diagnóstica.

Conclusão

Considerando as limitações do estudo, as seguintes conclusões podem ser destacadas:

- mediante os achados microscópicos, 100% das amostras de polpas apresentaram necrose pulpar e 65% delas com presença de microrganismos; e

- os testes de vitalidade pulpar ao calor, ao frio e teste de percussão vertical foram os mais confiáveis para o diagnóstico clínico de necrose pulpar nos dentes traumatizados.

Referências

1. Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J*. 1998;31:39-47.
2. Andreasen FM. Transient apical breakdown and its relation to color and sensibility changes after luxation injuries to teeth. *Endod Dent Traumatol*. 1986;2:9-19.
3. Andreasen FM. Histological and bacteriological study of pulps extirpated after luxation injuries. *Endod Dent Traumatol*. 1988;4:170-81.
4. Andreasen FM. Pulpal healing after luxation injuries and root fractures in the permanent dentition. *Endod Dent Traumatol*. 1989;5:111-31.
5. Andreasen FM. Transient root resorption after dental trauma: the clinician's dilemma. *J Esthet Restor Dent*. 2003;15:80-92.
6. Andreasen FM, Vestergaard-Pedersen B. Prognosis of luxated permanent teeth: the development of pulp necrosis. *Endod Dent Traumatol*. 1985;1:207-20.
7. Andreasen JO. Challenges in clinical dental traumatology. *Endod Dent Traumatol*. 1985;1:45-55.
8. Andreasen JO, Andreasen FM. Texto e atlas colorido de traumatismo dental. Porto Alegre: Artmed; 2001.
9. Arwill T, Henschen B, Sundwall-Hagland I. The pulpal reaction in traumatized permanent incisors in children aged 9-18. *Odont Tidskrift*. 1967;1:130-47.
10. Bergenholtz G. Microorganisms from necrotic pulp of traumatized teeth. *Odont Revy*. 1974;25:347-58.
11. Cipriano TJ, Walton RE. The ischemic infarct pulp of traumatized teeth: a light and electron microscopy study. *Endod Dent Traumatol*. 1986;2:196-204.
12. Cohenca N, Karni S, Rotstein I. Transient apical breakdown following tooth luxation. *Dent Traumatol*. 2003;19:289-91.
13. Côrtes MIS, Bastos JV. Lesões traumáticas na dentição permanente. In: Estrela C. *Ciência endodôntica*. São Paulo: Artes Médicas; 2004. p. 799-918.
14. Dumsha T, Hovland EJ. Pulpal prognosis following extrusive luxation injuries in permanent teeth with closed apexis. *J Endod*. 1982;8: 410-2.
15. Hahn C, Falkler Jr WA, Siegel MA. A study of T and B cells in pulp pathosis. *J Endod*. 1989;15:20-5.
16. Jacobsen I. Criteria for diagnosis of pulp necrosis in traumatized permanent incisors. *Scand J Dent Res*. 1980;88:306-12.
17. Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbial Immunol*. 1997;12:318-22.
18. Mangkornkarn C, Steiner JC, Bohman R, Lindemann RA. Flow cytometric analysis of human dental pulp tissue. *J Endod*. 1991;17:49-53.
19. Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod*. 1987;13:29-39.
20. Novoa MMH. Análise comparativa da sintomatologia clínica do dente e a histopatologia do tecido pulpar [dissertação mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.
21. Paul BF, Hutter JW. The endodontic-periodontal continuum revisited: new insights into etiology, diagnosis and treatment. *J Am Dent Assoc*. 1997;128:1541-8.
22. Petersson K, Soderstrom C, Kiani-Anaraki M, Lévy G. Evaluation of the ability of thermal and electrical tests to register pulp vitality. *Endod Dent Traumatol*. 1999;15:127-31.
23. Taklan S. A bacteriological study of pulp of intact non-vital teeth. *J Br Endod Soc*. 1974;1:75-7.

Autor para correspondência

Kely Firmino Bruno
drkelybruno@bol.com.br

Recebido: 15/07/08

Aceito: 22/02/09