AMANDA SILVA BERTASSO

**QUANTIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS
M1 E M2, EM CISTOS RADICULARES DE DENTES DECÍDUOS
E PERMANENTES**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho

Coorientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche León

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bertasso, Amanda Silva.

Quantificação imunofenotípica da polarização de macrófagos M1 e M2, em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes
83p. :30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Nelson-Filho, Paulo
Coorientador: Leon Jorge E.

1. Dentes Decíduos;
2. Lesão Periapical;
3. Imunologia;
4. Imunohistoquímica;
5. Inflamação;
6. Macrófagos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bertasso AS. **Quantificação Imunofenotípica da Polarização de Macrófagos M1 e M2, em Cistos Radiculares de Dentes Decíduos e Permanentes.** 2018. 83f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Aprovado em: ____/____/ 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AMANDA SILVA BERTASSO

DADOS CURRICULARES

Nascimento	03 de março de 1991 – Mococa - SP
Filiação	Antônio Germano Bertasso Fernanda F. Silva Bertasso
2011-2016	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
2013-2014	Iniciação Científica (bolsa CNPq). Orientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche Léon Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
2015-2016	Iniciação Científica (bolsa CNPq). Orientadora: Prof. Dra. Léa Assed B. da Silva Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
2017-2018	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível Mestrado (bolsa CAPES) Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
2015-2017	Curso Aperfeiçoamento em Pacientes Especiais Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

DEDICATÓRIA

A Deus,

Por ter me dado sabedoria, discernimento, saúde, paciência e bênçãos para completar este trabalho.

"[...] Amor e Sabedoria

Aqueles que a possuem terão a vida como herança, e Deus abençoará todo lugar onde entrar [...]"

Eclesiástico. Capítulo 4, Versículo 14.

Ao meu Anjo da Guarda,

"Tenho cuidado de você todo esse tempo; você está sob o meu abraço e minha proteção. Tenho visto você errar e crescer, amar e voar, você sabe onde pousar. Ao acordar, já terei partido. Ficarei de longe, escondido, mas sempre perto, decerto, como se eu fosse humano, vivo. Vivendo pra te cuidar, te proteger, sem você me ver, sem saber quem sou..."

Leonardo Reis

Aos meus Pais,

Antônio e Fernanda, pelo apoio incondicional em todas as fases da minha vida. Apesar da distância física, sempre estivemos juntos em todos os momentos. Agradeço imensamente a Deus por ter pais tão maravilhosos, que me educaram da melhor maneira possível, me encorajando a ir à luta pelos meus sonhos, além de serem as pessoas que mais acreditavam em mim. Mesmo quando eu duvidava, eles diziam: "Você pode ser tudo o que quiser ser".

Aos meus Avós,

Vó Minda e Vô Orlando, Vó Leza e Vô Luiz (*in Memoriam*) que, para mim, são exemplos de caráter, honestidade, família e amor. Agradeço por terem contribuído na formação do meu caráter mostrando, sempre com muito carinho, as melhores escolhas para mim.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho,

Querido e Amado Professor a minha admiração e respeito. O senhor é um exemplo, tanto no aspecto profissional quanto pessoal. Pessoa com caráter ímpar, cuja honestidade e paciência são suas maiores qualidades. Profissionalmente, é um exemplo de Mestre com aulas maravilhosas, um ótimo Cirurgião-Dentista clínico, um excelente Professor/Pesquisador e, claro, um Orientador maravilhoso. Sou eternamente grata a Deus por ter me dado mais que um orientador, um Mestre, que me ensinou muito, me educou e, quando tinha que me corrigir, por mais difícil que fosse, o fez. Além disso, o senhor me mostrou a ter profundo respeito e amor à Odontologia à ciência e aos pacientes, durante este período de mestrado. A minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, nas pessoas do atual Reitor **Prof. Dr. Vahan Agopyan**, e do Vice-Diretor **Prof. Dr. Antônio Carlos Hernández**.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Diretora, **Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, e do Vice-Diretor **Prof. Arthur Belém Novaes Júnior**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora, **Prof. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, e da Vice-Coordenadora, **Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**.

Ao meu Co-Orientador, **Prof. Dr. Jorge Esquiche Léon**,
Grande Professor e Pesquisador, exemplo de determinação e paciência. Acredito que nada é por acaso, e agradeço a Deus a oportunidade de estarmos juntos novamente no meu Mestrado. Me sinto honrada de tê-lo como Co-Orientador, sempre disposto a ajudar, fazendo muito além do papel de Professor. Se esforçou ao máximo para que tudo saísse como planejado, sempre me apoiando em todos os momentos e me aconselhando quando necessário. Este trabalho foi finalizado com sucesso com a sua ajuda. A minha eterna gratidão.

À **Prof. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**,

Meu profundo respeito e admiração, pelo seu trabalho como Pesquisadora e Professora. Ainda como aluna de graduação tive a honra de poder trabalhar com a senhora e, desde aquele momento até hoje, minha admiração só aumenta. Obrigada por ter me acolhido tão bem no Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da FORP/USP.

À **Prof. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**,

Por seus ensinamentos e conselhos, sempre me mostrando a maneira correta de solucionar as intercorrências profissionais e da vida.

Aos **Professores do Departamento de Clínica Infantil da FORP-USP,**

Prof. Dr. Alberto Consolaro, Prof. Dra. Lêa Assed Bezerra da Silva, Prof. Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva, Prof. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, Prof. Dra. Aldevina Campos de Freitas, Prof. Dra. Andiana De Rossi Daldegan, Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho, Prof. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano, Prof. Dra. Maria Cristina Borsatto, Prof. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Prof. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuaní, Prof. Dra. Miriam Aiko Nakane Matsumoto.

Aos **Funcionários do Departamento de Clínica Infantil,**

Filomena Leli Placciti, Matheus Morelli Zaneta, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Nilza Letícia Magalhães, Dra. Carolina Torres Montavani, Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, Dra. Marília Pacífico Lucisano, Carmo Euripedes Terra Barreto (*in Memoriam*), Marco Antônio dos Santos, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Fátima Aparecida Rizoli e Rosemary Alves, por todo o apoio oferecido no dia-a-dia e por sempre me tratarem com tanto amor, carinho e paciência.

Aos **Funcionários da FORP-USP,**

José Aparecido Neves do nascimento, Vera do Nascimento Scandelay, Karina Dadalt Quaglio, Gledson Antunes da Silva, Kleber Augusto Loureiro, Adriana de Mattos Gonçalves da Silva e Hermano Teixeira Machado, por todo o carinho e suporte durante todos estes anos. Muito Obrigada.

Às **amigas de Doutorado** do Programa de Pós-graduação em Odontopediatria,

Carolina Maschietto Pucinelli e Priscilla Coutinho Romualdo, que foram parte fundamental neste trabalho, principalmente na etapa final, sempre me apoiando em tudo e me impulsionando para que tudo saísse perfeito. Obrigada!

À **minha Profa. de inglês, Cintia Moraes,**

Por todo o auxílio durante todo o período de Mestrado. Obrigada!

À **minha Amiga Maria Cecília Gorita dos Santos,**

Pelo privilégio da sua convivência, que me instrui e me incentiva. Pela bondade, simplicidade e por ter compartilhado comigo momentos de angústia e de alegria. Pela cumplicidade e atenção e por ser grande exemplo de responsabilidade e, acima de tudo, de competência e profissionalismo. Meus sinceros agradecimentos.

À minha Amiga, **Adriana Rogério Caram**,

Por seu apoio incondicional nas horas mais difíceis. Apesar da distância, esteve sempre presente em todos os momentos, desde o início da minha vida acadêmica.

Ao meu amigo **Lucas**,

Esteve presente nos momentos mais difíceis. Agradeço por todo o seu apoio e ajuda. Assim como você me ajudou, espero contribuir de alguma forma em tudo o que precisar. Obrigada.

Às **minhas amigas de Mestrado e Doutorado** do Programa de Pós-graduação em Odontopediatria, Em especial à Bruna Maria Moreira, Fernanda Liévana, Giovanna Martins, Ana Beatriz Chicalé Ferreira, Marjorie Omori, Daniela Barroso, Andréa Arantes com quem tive o prazer de compartilhar conhecimentos e afinidades.

À **CAPES**, pela bolsa concedida.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

A gratidão é a memória do coração!

Antístenes de Atenas

A Parte experimental desta Dissertação foi desenvolvida nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células, do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.
- Laboratório de Histopatologia do Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

RESUMO

Bertasso AS. **Quantificação imunofenotípica da polarização de macrófagos M1 e M2, em lesões periapicais de dentes decíduos e permanentes.** 2018. 83f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As lesões periapicais ocasionam destruição dos tecidos apicais e periapicais, por meio da exacerbação da resposta inflamatória e imune. O sistema imunológico é ativado e células são recrutadas para o local da lesão, incluindo os macrófagos, que podem ser polarizados em macrófagos M1 e M2. O presente estudo teve como objetivo quantificar macrófagos M1 e M2 em cistos periapicais de dentes decíduos e permanentes. Foram selecionados 15 casos de cistos periapicais de dentes decíduos e 10 cistos periapicais de dentes permanentes. Em todos os casos foi realizada análise histopatológica em HE, classificando o tipo e o grau do infiltrado inflamatório, por meio de escores. Além disso, foi realizada a quantificação dos marcadores CD68 (M1+, M2+) e CD163 (M1-, M2+) por meio da análise imunohistoquímica. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Mann Whitney, com nível de significância de 5%. Embora tenham sido detectados macrófagos M1 e M2 tanto nas lesões dos dentes decíduos quanto dos permanentes, houve maior prevalência de macrófagos M2 ($p < 0,05$). A comparação entre dentes decíduos e permanentes evidenciou maior quantificação de macrófagos M1 nas lesões dos dentes permanentes ($p = 0,002$). Pôde-se concluir que os macrófagos M1 e M2 estão presentes nos cistos periapicais de dentes decíduos e permanentes, com maior quantidade de células M2. Além disso, os cistos periapicais dos dentes permanentes apresentaram maior quantidade de macrófagos M1, em comparação aos cistos dos dentes decíduos.

Palavras Chaves: Dentes Decíduos; Lesão Periapical; Imunologia; Imunohistoquímica; Inflamação; Macrófagos.

ABSTRACT

Bertasso AS. **Immunophenotypic quantification of M1 and M2 macrophages polarization in deciduous and permanent teeth radicular cysts.** 2018. 83f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The radicular lesion leads to the apical and periapical tissues destruction throughout an inflammatory and immune response. The immune system is activated and cells are recruited to the lesion site, which includes macrophages that can be polarized into M1 and M2 macrophages. The objective of this study was to quantify M1 and M2 macrophages in radicular cysts in permanent and deciduous teeth. In total, 15 radicular cysts cases in deciduous teeth and 10 in permanent teeth were selected. A histopathologic analysis in HE was performed, allowing the type and inflammatory infiltrates level classification in scores. In addition, the CD68 (M1+, M2+) and CD163 (M1-, M2+) markers were quantified through an immunohistochemistry analysis. The data acquired were submitted to a Mann Whitney test, with a 5% significance level. A higher prevalence of M2 macrophages ($p < 0.05$) was observed, despite both M1 and M2 macrophages have been detected in the permanent and deciduous teeth lesions. The comparison between permanent and deciduous teeth presented a higher M1 macrophages quantity in permanent teeth lesions ($p = 0.002$). In summary, the M1 and M2 macrophages are present in deciduous and permanent teeth radicular cysts, with a higher quantity of M2 cells. Moreover, the radicular cysts in permanent teeth have shown a higher M1 macrophages quantity when compared to cysts in deciduous teeth.

Keywords: Deciduous teeth; Periapical lesion; Immunology; Immunohistochemistry; Inflammation; Macrophages.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. PROPOSIÇÃO.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4. RESULTADOS.....	47
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	73
ANEXO	81

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Academia Americana de Endodontia (AAE, 2013; 2015), a lesão periapical é representada pela inflamação e destruição do periodonto apical, com origem pulpar. Pode ser observada radiograficamente como uma área radiolúcida na região apical e periapical, com ausência de sintomatologia. Muitas vezes, a lesão periapical é desencadeada pela infecção microbiana do sistema de canais radiculares, o que resulta em uma resposta imune e inflamatória local (Nair e Schmid Meier, 1986; Márton e Kiss, 2000; Nan Ma et al., 2017). Em 1997, Nair definiu a lesão periapical como a “intersecção dinâmica entre a infecção do canal radicular e a resposta do hospedeiro”.

Histologicamente, a lesão periapical de dentes decíduos e permanentes pode ser classificada em cistos radiculares e granulomas periapicais, sendo ambos provenientes de uma infecção via sistema de canais radiculares (Myers et al., 1987; Mass et al., 1995; Benn et al., 1996; Hofling et al., 2006). Os granulomas periapicais são constituídos, basicamente, por um infiltrado inflamatório crônico, associado a elementos de reparação. Já os cistos radiculares são originados de um granuloma que se tornou epitelizado (aglomerações de células epiteliais) (Neto et al., 2004; Hofling et al., 2006). O cisto radicular representa o mais comum dos cistos odontogênicos (Araújo, 1994; Regezi e Sciubba, 2000; Neto et al., 2004).

No início da formação da lesão periapical, quando a região periapical é invadida pelos micro-organismos ou por seus produtos/subprodutos, o sistema imunológico do indivíduo é ativado e há recrutamento celular, com migração de polimorfonucleares, macrófagos, leucócitos, linfócitos e osteoclastos, dentre outras células, para o local da lesão (Silva et al., 2007). O sistema imunológico, portanto, funciona como uma rede em que muitos tipos celulares trabalham em conjunto para defender e proteger o organismo de invasores, como vírus e bactérias (AAAAI, 2018).

O sistema imunológico é composto por células da imunidade inata e por células da imunidade adaptativa. A imunidade inata fornece a primeira linha de defesa contra os micro-organismos, com migração de células preparadas para responder rapidamente às infecções (Abbas, 2015).

Dentre as células da imunidade inata destacam-se os macrófagos teciduais, os quais atuam como sentinelas no organismo (Mills et al., 2000). Os macrófagos são células cuja função primária é ingerir e destruir os micro-organismos, ou seja, são células fagocíticas. Além disso, são células apresentadoras de antígeno (APCs) aos linfócitos T, ingerem células mortas do hospedeiro, liberam inúmeros mediadores químicos com recrutamento de células para o local da lesão e promovem o reparo de tecidos lesionados, angiogênese e síntese da matriz extra-celular (Miller, 1968; Mills et al., 2000; Abbas, 2015; Mills, 2015).

A fagocitose realizada pelos macrófagos inicia-se com o englobamento do agente agressor e a liberação enzimática de oxidases de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato (NADPH) (Gammoh e Rink, 2017), que são tóxicas. Após a morte do agente agressor, os macrófagos realizam a digestão proteolítica (Jenkins et al., 2013; Gammoh e Rink, 2017; Weber et al., 2018).

Os macrófagos, além de serem caracterizados como células da resposta inata, fazem parte de um grupo de células denominadas APCs. As APCs fazem a intersecção da resposta imune inata e adaptativa, pois apresentam o antígeno aos linfócitos nos linfonodos (Miller, 1968). A produção dos Linfócitos T ocorre no timo e a sua maturação e expansão clonal ocorre nos linfonodos, onde entram em contato com os antígenos, por meio das APCs, sofrendo diferenciação em células T CD4 efectoras, células T CD4 de memória, células T CD8 efectoras e células T CD8 de memória. As células TCD4 efectoras podem se diferenciar em subtipos Th1, Th2, Th17 e TREGS (células T regulatórias), dependendo do estímulo (Mosmann, 1986; Steinman e Cohn, 2007; Hanh e Liewebr, 2007; Conti, 2014).

Além disso, os macrófagos liberam mediadores químicos, como as citocinas IL-1, TNF-alfa, IL-12, IL-18, TGF-beta, IL-10 e IL-6, as quais atuam estimulando ou inibindo a resposta inflamatória (Hahn e Liewebr, 2007).

De acordo com Mills (2015), os macrófagos possuem uma "plasticidade" única, que lhe confere a capacidade de reparar ou matar. Assim, essas células exibem funções de polaridade oposta, ou seja, podem ser polarizadas em macrófagos M1 e M2, de acordo com sua morfologia, expressão de marcadores e função. Essa heterogeneidade é resultado da especialização dos monócitos circulantes, a qual é dependente do microambiente ao qual estão expostos durante sua diferenciação (Takahashi et al., 1996; Ito et al., 2014). Esse microambiente

fornece sinais que influenciam os macrófagos na definição do seu fenótipo em "classicamente ativado" (macrófago M1) ou "alternativamente ativado" (macrófago M2) (Vanden et al., 2005).

Os macrófagos possuem a capacidade única de metabolizar a L-arginina em NO (que favorece a destruição do agente agressor) ou em Ornitina (que favorece a imunoregulação) (Mills, 2001). A polarização macrofágica do tipo M1 está relacionada ao processo de combate aos patógenos, ou seja, macrófagos do tipo M1, utilizando a enzima iNOS, produzem grande quantidade de NO (óxido nítrico), uma molécula capaz de induzir morte celular de patógenos. Portanto, os macrófagos M1 produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α , IL-12 e IL-18; promovem um ambiente altamente microbicida e têm um papel na mediação e destruição de patógenos e de células tumorais (Arango e Descoteaux, 2015; Chávez Galán et al., 2015). A polarização em macrófagos M1 ocorre quando a célula recebe estímulos, incluindo Interferon gama secretado principalmente por células (Th1, células T citotóxicas e células NK), LPS bacteriano e Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) (Guha e Mackman, 2001; Fleetwood et al., 2007; Billiau e Matthys, 2009; Chávez-Galán et al., 2015).

Por outro lado, a polarização macrofágica do tipo M2 está relacionada ao processo de proliferação celular e reparação tecidual, ou seja, macrófagos do tipo M2 produzem a enzima Arginase-1, que metaboliza a L-arginina em Ornitina (um precursor de poliaminas e colágeno), que auxilia na cicatrização e induz o reparo (Albina et al., 1989). Os macrófagos M2 desempenham um papel central nas respostas aos parasitas, remodelação tecidual, angiogênese e nas doenças alérgicas (Martinez et al., 2008; Jenkins et al., 2013; Chávez Galán et al., 2015).

O CD68 e o CD163 são imunomarcadores de macrófagos. O CD68 é uma proteína transmembrana tipo I fortemente glicosilada, que pertence ao lisossomo/endossomo, associado a proteínas de membrana (Holness et al., 1993; Fin et al., 2012; Iqbal et al., 2014). O CD163 é uma proteína de membrana do tipo I, também conhecida como antígeno M130, sendo uma proteína específica de macrófagos e a expressão positiva deste receptor é uma das principais alterações na mudança de macrófagos para fenótipos ativados (M2). O fenótipo esperado para macrófagos M1 é CD68⁺/CD163⁻ e para macrófagos M2 é CD68⁺/CD163⁺

(Kawamura et al., 2009; Lu et al., 2010; Cao et al., 2011; Hasan et al., 2012; Weber et al., 2018).

Alguns estudos foram publicados na área da Odontologia, particularmente nas áreas de Patologia (Sica et al., 2015; Shi et al., 2018) e Periodontia/Implantodontia (Xuan et al., 2016; Yang et al., 2017; Parisi et al., 2018), investigando a polarização de macrófagos M1 e M2. Segundo Yang et al. (2017), há maiores quantidades de macrófagos M1 e M2 em pacientes com periodontite crônica, em comparação a pacientes com gengivite. No entanto, como salientado por Dokic et al. (2013), os mecanismos imunorregulatórios que ocorrem durante a gênese e o desenvolvimento das lesões periapicais são, ainda, pouco explorados.

Em 2018, Weber et al. publicaram o primeiro estudo na área da Endodontia, avaliando a polarização de macrófagos M1 e M2 em granulomas, cistos radiculares e cistos dentígeros, em dentes permanentes. Neste estudo, os autores concluíram que há uma maior polarização de macrófagos M1 em cistos periapicais, em comparação a granulomas periapicais e cistos dentígeros.

Particularmente com relação aos dentes decíduos, a literatura referente à caracterização dos tipos celulares presentes em lesões periapicais é escassa. Em 2008, Bolan et al. publicaram um estudo imunohistoquímico avaliando a presença de linfócitos T e B e macrófagos, em lesões periapicais crônicas de dentes decíduos. Concluíram que a resposta imune humoral e mediada por células é importante nas lesões periapicais de dentes decíduos. No entanto, deve ser ressaltado que, até o momento, não há trabalhos publicados na literatura específica avaliando a polarização de macrófagos em lesões periapicais crônicas em dentes decíduos.

Sabe-se que a resposta imunológica do adulto é diferente da criança (Carneiro-Sampaio e Grumach, 1992; Bolan et al., 2008). Devido à ausência de estudos avaliando e quantificando os tipos celulares da resposta inflamatória e imune em dentes decíduos com necrose pulpar e lesão periapical, e considerando os potenciais efeitos sistêmicos da infecção e das reações desencadeadas em crianças, torna-se relevante a realização de estudos nesse sentido. Além disso, esse conhecimento pode propiciar uma melhor compreensão da patologia pulpar e periapical em dentes decíduos, favorecendo a instituição de técnicas de tratamento mais direcionadas.

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi quantificar, por meio da análise morfológica e imunohistoquímica, macrófagos M1 e M2 em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes de humanos.

Objetivos Específicos

- Análise de lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina, obtidas a partir de amostras de cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes, considerando a intensidade do infiltrado inflamatório.
- Análise morfológica e imunohistoquímica (CD68 e CD163) para quantificação de macrófagos M1 e M2 em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes, considerando a expressão e a quantidade de células imunomarcadas.
- Comparar a prevalência de macrófagos M1 e M2 em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes.

A hipótese nula a ser testada é que não há diferença na quantidade de macrófagos M1 e M2, em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes de humanos.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi previamente submetido à apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) (Protocolo 80253417.6.0000.5419) (Anexo A).

Seleção da amostra - Dentes decíduos (Grupo Experimental)

Foram selecionados para participação na pesquisa pacientes que compareceram à Clínica de Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP, para tratamento odontológico, de ambos os sexos, com faixa etária de 5 a 8 anos de idade, com boa saúde geral e que não foram submetidos à antibioticoterapia há pelo menos três meses. Os responsáveis pelos pacientes foram informados a respeito do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando a participação na pesquisa.

O tamanho da amostra foi calculado com base em trabalho previamente publicado (Bolan et al., 2008), considerando o alfa de 0,05 e o poder do teste de 80%. O cálculo amostral resultou na necessidade de, no mínimo, 12 lesões em dentes decíduos.

Assim, foram selecionados inicialmente 26 dentes decíduos com indicação de exodontia (primeiros e segundos molares decíduos, superiores e inferiores) com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente, sem tratamento prévio, com extensa destruição coronária em função de lesões de cárie impossibilitando o tratamento restaurador, com ausência de dor e presença/ausência de fístula. Para seleção dos dentes, foi realizada a anamnese, o exame clínico e o exame radiográfico, tendo como base a ficha da disciplina de Odontopediatria da FORP/USP. Os dentes selecionados deveriam apresentar, também, lesões periapicais com extensão de tecido que possibilitasse a realização da técnica de imunohistoquímica.

O exame radiográfico foi realizado utilizando a técnica digital com placa de fósforo (Soredex - Finndent, Orion Corporation, Helsinque, Finlândia), tamanho 0 ou 2, com 70 kV e 0,3 segundos de exposição e digitalização pelo sistema VitaScan (Dürr Dental do Brasil, Porto Alegre, RS, Brasil), com auxílio do software DBSWIN.

Etapas cirúrgicas

Os dentes decíduos foram extraídos na Clínica de Odontopediatria, por um único Cirurgião-Dentista. Após a antisepsia da cavidade bucal com digluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard Colgate/ Palmolive Indústria Brasileira - São Paulo – SP), sob forma de bochecho ou embrocação por 1 minuto, foi realizada a anestesia local com mepivacaína a 2% (DFL Ind. Comércio Ltda – Rio de Janeiro). A seguir, foi efetuada a sindesmotomia, a luxação e a extração com elevadores ou fórceps. Após a extração, foi realizada a irrigação do alvéolo com soro fisiológico. Nos casos onde a lesão não foi removida juntamente com as raízes, foi efetuada a sua preensão com pinça hemostática, divulsão com cureta e corte com bisturi lâmina 15. Em seguida, quando necessário, foi realizada a sutura da área.

O tecido removido foi colocado em um Coletor Universal de 80mL, com formol tamponado a 10%, e enviado para o laboratório de Histopatologia da FORP/USP, juntamente com a radiografia e com a ficha de exame anatomopatológico da clínica de Odontopediatria preenchida, contendo informações referentes às características e localização da lesão.

Processamento histotécnico

A lesão removida foi fixada por, no máximo, 24 horas, sendo a seguir lavada por 24 horas, desidratada em álcool, diafanizada em xilol e incluída em parafina. A partir dos blocos de parafina, foram realizados 10 cortes seriados de 3 micrometros cada, montados em lâminas (Figura 1). Um dos cortes foi corado com Hematoxilina e Eosina (HE), para o diagnóstico histopatológico das lesões. Os demais cortes sequenciais foram montados em lâminas silanizadas, para realização da técnica de imunohistoquímica pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (Andrade et al., 2012; Bezerra da Silva et al., 2014; Hidalgo et al., 2016).

Figura 1 - Processamento histotécnico: Inclusão do tecido em parafina (A-D); Obtenção dos cortes em micrótomo (E); e Montagem dos cortes na lâmina (F-G)

De acordo com o laudo emitido por um patologista experiente, após análise dos cortes corados com HE, dos 26 dentes decíduos extraídos, 15 (57,6%) eram cistos, 6 (23,2%) eram cistos que sofreram agudização (com presença também de infiltrado inflamatório agudo) e 5 (19,2%) eram granulomas. Para o presente estudo, a fim de padronizar a amostra, foram utilizados apenas os dentes com diagnóstico histopatológico de cisto radiculares (15 dentes).

Seleção da Amostra - Dentes permanentes

Foram utilizados 10 dentes permanentes (superiores e inferiores; primeiros e segundos molares) com lesões periapicais crônicas, incluídos em parafina, obtidos do Arquivo do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal da FORP/USP que, após processamento histológico de rotina (corte e coloração com HE), tiveram diagnóstico histopatológico de cistos radiculares, emitido pelo mesmo patologista experiente que analisou os cortes obtidos dos dentes decíduos.

Visando minimizar possíveis fatores de confusão que poderiam influenciar os resultados, a amostra selecionada (a partir de 101 casos do arquivo) foi a mais homogênea possível, excluindo-se dentes com tratamento endodôntico, dentes anteriores, casos sem a radiografia no sistema Romeu (Sistema de informatização das clínicas) ou na pasta física e dentes de pacientes com problemas sistêmicos.

A partir dos blocos de parafina dos dentes permanentes, foram também realizados 10 cortes seriados de 3 micrometros, os quais foram montados em lâminas. Um dos cortes foi corado pelo HE, para o diagnóstico histopatológico das lesões, sendo os demais cortes sequenciais montados em lâminas silanizadas, para realização da técnica de imunohistoquímica pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (Andrade et al., 2012; Bezerra da Silva et al., 2014; Hidalgo et al., 2016).

Imagens radiográficas representativas dos casos selecionados para o presente estudo estão apresentadas na Figura 2.

Figura 2 - Imagens radiográficas representativas das lesões coletadas de dentes decíduos (A) e permanentes (B)

A Figura 3 apresenta o fluxograma da distribuição dos dentes decíduos e permanentes utilizados no estudo.

Figura 3- Fluxograma evidenciando a distribuição das amostras

Análise histopatológica dos cortes corados com HE

As lâminas coradas com HE foram analisadas em microscópio Axio Imager M1 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Gottingen, Alemanha), por um Patologista experiente ($\kappa > 0,9$). Os espécimes foram avaliados em aumentos de 10 e 400x, a fim de verificar a presença/ausência de células inflamatórias e caracterizar o grau do infiltrado inflamatório crônico, em 3 campos de cada espécime, selecionados aleatoriamente. A análise foi realizada avaliando-se desde a área da região subepitelial dos cistos até sua periferia.

O grau de infiltrado inflamatório crônico foi avaliado por meio da atribuição dos seguintes escores (Tsai et al., 2002; Silva et al., 2017):

- Escore 0: ausência de células inflamatórias crônicas;
- Escore 1: número médio de células inflamatórias menor que 10 células (infiltrado suave);
- Escore 2: número médio de células inflamatórias entre 10 e 50 células (infiltrado moderado); e
- Escore 3: número médio de células inflamatórias maior que 50 células (infiltrado severo).

Processamento e análise imunohistoquímica

Os cortes foram desparafinados e permaneceram submersos em xilol por 20 minutos, sendo efetuada uma troca após 10 minutos. Em seguida, foram hidratados em concentrações decrescentes de álcool (2 imersões em álcool 100% e uma imersão em álcool 90%, 70% e 50%) e lavados em água corrente. A recuperação antigênica foi realizada em uma panela de pressão elétrica, durante 15 minutos, utilizando a solução S2367 (Dako Target Retrieval Solution, pH 9, código S2367 – Santa Clara - USA), diluída em 1:10 em água destilada. Quando os cortes estavam em temperatura ambiente, foram enxaguados em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com 18mL de peróxido de hidrogênio a 35% (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 18mL de água destilada, durante 20 minutos, sendo efetuada uma troca após 10 minutos. Em seguida, foram realizadas 5 imersões em solução salina tamponada fosfatada (PBS) a 10mmol L⁻¹ (pH 7,4). O anticorpo primário para cada tipo celular a ser avaliado (Tabela 2) foi depositado sobre os cortes e as lâminas foram mantidas durante 18 horas a 4°C, em câmara úmida.

Em seguida, as lâminas foram lavadas com o tampão Dako (S3006) (Dako Wash Buffer, código S3006, Carpinteria, CA, EUA), diluído a 1:10 em água destilada e incubadas com o anticorpo secundário biotinilado (LSAB Dako), durante 30 minutos cada, a 37°C. Após 3 lavagens em PBS, foi colocado o anticorpo terciário (estreptavidina-biotina-peroxidase) (LSAB Dako - Universal Dako LSAB + kit peroxidase, system HRP, código K0679, Carpinteria, CA, EUA), durante 30 minutos, a 37°C, seguida de 3 lavagens em PBS.

As amostras foram, então, submetidas à aplicação de diaminobenzidina (DAB) como cromógeno (Dako chromogen System, código k3468, Carpinteria, CA, EUA) durante 10 minutos, e enxaguadas abundantemente em água destilada. Após a revelação, foi realizada a contra-coloração das lâminas com Hematoxilina de Carrazzi, durante 2 minutos, e a diferenciação da hematoxilina por meio da lavagem com água destilada (20 vezes), seguida da desidratação em álcool absoluto (3 trocas), diafanização em xilol e montagem em Entellan (Figura 4).

Figura 4 - Processamento para análise imunohistoquímica: Desparafinação dos cortes (A); Recuperação antigênica (B); Disposição dos anticorpos primário (C), secundário e terciário (D) sobre os cortes (E); DAB como Cromógeno (F); contra-coloração com Hematoxilina de Carrazzi, diferenciação (G).

Como controle negativo foi efetuada a omissão do anticorpo primário, e como controle positivo foram utilizadas amostras de tonsila palatina.

Para a quantificação de macrófagos M1 e M2, cortes consecutivos obtidos dos dentes decíduos e permanentes foram imunomarcados com os marcadores CD68 e CD 163, como anticorpos primários.

A tabela 1 apresenta os tipos celulares avaliados, com as respectivas imunomarcações (fenótipo).

Tabela 1 - Tipos celulares avaliados e respectivas imunomarcações

Células	Imunomarcação
Macrófagos M1	CD68+/CD163-
Macrófagos M2	CD68+/CD163+

A tabela 2 apresenta as especificações dos anticorpos primários utilizados, para identificação dos macrófagos M1 e M2.

Tabela 2- Especificações dos anticorpos primários utilizados

Biomarcador	Clone	Descrição	Isotipo	Diluição	Marca	Célula	Controle Positivo
CD68	KP1	Monoclonal - rato	IgG1	1:100	Dako Cytomation	Macrófago	Tonsilas palatinas
CD163	10D6	Monoclonal - rato	IgG1	1:100	Leica Biosystems	Macrófago	Tonsilas palatinas

As lâminas foram analisadas em microscópio Axio Imager. M1 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Gottingen, Alemanha) com câmera acoplada, por um examinador previamente calibrado ($Kappa > 0,9$), em aumentos de 10, 20 e 400x, conforme preconizado por Gonçalves et al. (2012). No aumento de 10x foram escolhidas as áreas que apresentavam maior quantidade de células imunomarcadas. No aumento de 400x, foram fotografados 10 campos representativos de cada espécime. Após a captura das imagens foi utilizado o software Image J 1.28 (National Same patterns of Health, Bethesda, EUA) para registro da imunomarcção (presença/ausência) e posterior quantificação do número de células imunomarcadas (macrófagos M1 e M2).

Análise Estatística

Inicialmente, a distribuição dos dados obtidos foi verificada por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Tendo em vista a distribuição não paramétrica dos dados, para a comparação dos resultados obtidos foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para todas as análises, foi utilizado o programa Graph Pad Prism 4.0 (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, EUA). O nível de significância adotado foi de 5%.

4. Resultados

4. RESULTADOS

Caracterização da amostra

Dos 15 casos de cistos radiculares de dentes decíduos analisados, 40% eram de indivíduos do sexo feminino e 60% de indivíduos do sexo masculino, com idade média de 5,9 anos. Além disso, 60% dos cistos radiculares de dentes decíduos estavam localizados na mandíbula e 30% na maxila.

Dos 10 casos de cistos de dentes permanentes, 60% eram de indivíduos do sexo feminino e 40% eram de indivíduos do sexo masculino, com idade média de 34,1 anos. Um total de 60% dos cistos radiculares de dentes permanentes encontravam-se na mandíbula e 40% na maxila.

A Tabela 3 apresenta a caracterização da amostra utilizada no presente estudo.

Tabela 3 - Caracterização da amostra

Dentes	Total	Gênero		Localização		Idade
		Feminino	Masculino	Mandíbula	Maxila	Média (Anos)
Decíduos	15	6	9	10	5	5,9
Permanentes	10	6	4	6	4	34,1

Análise Histopatológica

Com relação ao tipo de infiltrado inflamatório, a análise das lâminas coradas com HE evidenciou que todos os casos foram classificados como cistos radiculares, tanto nos dentes decíduos (15 casos), quanto nos dentes permanentes (10 casos).

Com relação à intensidade do infiltrado inflamatório crônico, em HE, não foi possível encontrar diferença estatisticamente significativa ($p > 0,99$) na comparação realizada entre os cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes.

A Figura 5 ilustra a porcentagem de ocorrência dos escores obtidos após a avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório nos cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes.

Figura 5 - Porcentagem de ocorrência dos escores obtidos após a avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório nos dentes decíduos e permanentes. Escore 0: ausência de células inflamatórias crônicas; Escore 1: número médio de células inflamatórias menor que 10 células (infiltrado suave); Escore 2: número médio de células inflamatórias entre 10 e 50 células (infiltrado moderado); e Escore 3: número médio de células inflamatórias maior que 50 células (infiltrado severo).

A Figura 6 apresenta imagens representativas dos parâmetros avaliados.

Figura 6 - Fotomicrografias representativas dos grupos avaliados, evidenciando os eventos microscópicos observados na avaliação histopatológica do infiltrado inflamatório dos cistos radiculares de dentes deciduos e permanentes, em microscopia de luz convencional (coloração de Hematoxilina e Eosina - HE). **(A)** Cisto radicular de dente permanente (Zeiss, 5X). **(B)** Maior aumento de A (Zeiss, 40 X). **(C)** Cisto radicular dente decíduo (Zeiss, 5X). **(D)** Maior aumento de C (Zeiss, 40 X)

Análise Imunohistoquímica

Após a avaliação imunohistoquímica, foi observada imunomarcagem para CD68 e para CD163 em 100% dos casos de dentes decíduos e permanentes. Houve um maior número de células imunomarcadas para CD68, em relação ao marcador CD163, tanto nos cistos de dentes decíduos quanto nos cistos de dentes permanentes. A Figura 7 apresenta a distribuição média das células imunomarcadas para CD68 e CD163.

Figura 7 - Distribuição média das células imunomarcadas para CD68 e CD163, após a avaliação imunohistoquímica, em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes

As Figuras 8 e 9 apresentam fotomicrografias representativas, evidenciando a imunomarcagem para CD68 e CD163, nos cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes, respectivamente.

Figura 8 - Fotomicrografias representativas dos grupos avaliados, evidenciando a imunomarcção para CD68 e CD163 nos cistos radiculares de dentes decíduos. (A) Imunomarcção para CD68 (Zeiss, 5X). (B) Maior aumento de A (Zeiss, 40 X). (C) Imunomarcção para CD163 (Zeiss, 5X). (D) Maior aumento de C (Zeiss, 40 X)

Figura 9 - Fotomicrografias representativas dos grupos avaliados, evidenciando a imunomarcção para CD68 e CD163 nos cistos radiculares de permanentes. (A) Imunomarcção para CD68 (Zeiss, 5X). (B) Maior aumento de A (Zeiss, 40 X). (C) Imunomarcção para CD163 (Zeiss, 5X). (D) Maior aumento de C (Zeiss, 40 X)

Com base nos resultados descritos acima, foi calculada a polarização de macrófagos em M1 ($CD68^+/CD163^-$) ou M2 ($CD68^+/CD163^+$), nos cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes.

As lesões dos dentes decíduos apresentaram mediana de macrófagos M1 de 12,1 (Q1=6,5; Q3=21,5) e de macrófagos M2 de 70,9 (Q1=62,8; Q3=80,7). Nos dentes permanentes a mediana de macrófagos M1 foi de 34,3 (Q1=24,9; Q3=62,1) e de macrófagos M2 foi de 84,5 (Q1=51,7; Q3=121,6). Portanto, a mediana de macrófagos M2 foi maior do que de macrófagos M1, tanto nos dentes decíduos ($p<0,0001$) quanto nos permanentes ($p=0,002$).

Ao comparar o número de macrófagos M1 entre dentes decíduos e permanentes, houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,002$), com maior mediana de macrófagos M1 nos dentes permanentes. Por outro lado, não foi possível encontrar diferença estatisticamente significativa ($p=0,53$) entre dentes decíduos e permanentes na quantificação de macrófagos M2.

A Figura 10 apresenta os resultados obtidos após a quantificação de macrófagos M1 e M2, em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes.

Figura 10 - Quantificação (mediana, Q1 e Q3) de macrófagos M1 e M2 e comparação dos dados obtidos, após a avaliação imunohistoquímica, em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$)

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

Embora a origem infecciosa das patologias periapicais seja bem estabelecida (Stashenko et al., 1998), a contribuição do sistema imunológico na patogênese dessas alterações ainda não foi totalmente esclarecida. Sabe-se que fatores imunológicos estão envolvidos na patogênese das lesões periapicais e que a polarização dos macrófagos em M1 ou M2 é um dos principais reguladores da homeostase e da diferenciação tecidual (Weber et al., 2018).

Com relação à gênese e à progressão das lesões periapicais, vários estudos já demonstraram a similaridade entre dentes decíduos e permanentes quanto à predominância de micro-organismos anaeróbios (Rúviere et al., 2007; Ito et al., 2011), localização dos micro-organismos, que se encontram disseminados por todo o sistema de canais radiculares (Rocha et al., 2008; Cohenca et al., 2013), presença do biofilme apical (Rocha et al., 2008; Leonardo, 2004; Silva et al., 2010) e de LPS bacteriano (Queiroz et al., 2016). No entanto, não há estudos publicados na literatura específica avaliando a polarização de macrófagos M1 e M2 em lesões periapicais de dentes decíduos, apesar da importância do infiltrado inflamatório nas lesões periapicais.

Recentemente, um único estudo avaliou a polarização de macrófagos em M1 e M2 em granulomas, cistos radiculares e cistos dentígeros de dentes permanentes (Weber et al., 2018), porém, com algumas diferenças metodológicas. Em comparação ao presente estudo, os autores não mencionaram, por exemplo, se o paciente já havia realizado tratamento endodôntico, previamente à seleção dos cistos e granulomas periapicais. Tendo em vista que os dentes com insucesso do tratamento endodôntico são diferentes de dentes com lesões periapicais não tratadas (Henriques et al., 2016), no presente estudo foram selecionados apenas dentes decíduos e permanentes com necrose pulpar e lesão periapical que não foram submetidos a tratamento endodôntico previamente à extração. Dessa forma, a radiográfica periapical previamente à seleção dos casos foi de fundamental importância para avaliar se houve manipulação dos canais radiculares. Além disso, no presente estudo o diagnóstico das lesões periapicais foi confirmado com base na combinação de características clínicas, radiográficas e histopatológicas (Silva et al.,

2017; Consolaro, 2018). Portanto, os casos que não continham radiografia periapical foram removidos do presente estudo. Adicionalmente, a história médica do paciente também foi levada em consideração no presente estudo, sendo selecionados apenas pacientes sem história de acometimento por doenças sistêmicas, uma vez que o objetivo principal foi a análise de uma célula específica da resposta imunológica do hospedeiro e indivíduos com problemas sistêmicos apresentam uma resposta imunológica alterada, em comparação a indivíduos com boa saúde geral (Segura-Egea et al., 2015).

Ainda com relação à seleção da amostra do presente estudo, as lesões periapicais selecionadas foram diagnosticadas por meio de análise histopatológica, em coloração de HE, por um patologista experiente e calibrado. Uma análise inicial diferenciou granulomas de cistos radiculares, sendo que os cistos foram mais prevalentes na amostra e, portanto, foram os selecionados para a avaliação do presente estudo. Além disso, foi realizada uma avaliação com relação ao tipo de células inflamatórias presentes nos cistos radiculares, demonstrando a presença de lesões crônicas ou reagudizadas. Entretanto, uma vez que as lesões periapicais reagudizadas apresentam maior fator de virulência e patogenicidade dos micro-organismos, além do recrutamento de mais mediadores inflamatórios (Consolaro, 2018), os cistos radiculares reagudizados foram removidos do presente estudo.

Assim, após a seleção da amostra visando o controle de alguns fatores de confusão, os cistos radiculares foram submetidos à análise da polarização de macrófagos em M1 e M2, por meio de avaliação imunohistoquímica dos marcadores CD68 e CD163.

A imunohistoquímica é uma técnica bem estabelecida e bastante utilizada em trabalhos avaliando marcadores de macrófagos em lesões periapicais de dentes permanentes (Marton et al., 1999; Rodini et al., 2001; Lin et al., 2010; Fan et al., 2011; Wei et al., 2013; Weber et al., 2018). Particularmente em dentes decíduos, um estudo prévio realizado por Bolan et al., em 2008, empregou um marcador geral de macrófagos (CD68), afirmando que essas células encontravam-se bem distribuídas de maneira uniforme nas lesões periapicais de dentes decíduos e que a seleção de 10 campos para a avaliação dos macrófagos é suficiente e representa a

lesão. Portanto, no presente estudo foi empregada a mesma metodologia utilizada por Bolan et al. (2008).

Os anticorpos primários utilizados no presente estudo foram o CD68 e o CD163, que possibilitam a avaliação da polarização dos macrófagos em M1 ou M2. O CD68 é o marcador genérico de macrófagos mais comumente utilizado e estudos prévios avaliaram este marcador na lesão periapical de dentes permanentes (Marton et al., 1999; Rodini et al., 2001; Fan et al., 2011; Wei et al., 2013; Weber 2018). O CD68 detecta tanto macrófagos do tipo M1 quanto do tipo M2. Por outro lado, o CD163 é um marcador específico e a expressão positiva deste marcador indica apenas macrófagos do tipo M2 (Weber et al., 2018).

Na área da Endodontia, um único estudo utilizou o CD163 para a avaliação da polarização de macrófagos na lesão periapical de dentes permanentes (Weber et al., 2018). Neste estudo, os autores também avaliaram os macrófagos M1 e M2 por meio da marcação de CD68 e CD163, além de outros marcadores, tais como o CD11c e o MRC1. Tendo em vista que, segundo o fabricante do CD11c (Leica. Biosystems), este não é um marcador específico de macrófagos M1, no presente estudo foi utilizada a diferença entre o número de células imunomarcadas pelo CD68 e o número de células imunomarcadas pelo CD163, para a obtenção da quantidade de macrófagos M1.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo observou-se que os cistos radiculares dos dentes decíduos e permanentes apresentaram grandes quantidades de macrófagos M1 e M2. A presença de macrófagos na lesão periapical crônica é fundamental, pois estas células estão envolvidas na resposta imunológica protetora, assim como no desenvolvimento da lesão periapical e no recrutamento de células inflamatórias (Marton et al., 2000).

Sabe-se que os cistos radiculares são caracterizados por elevada expressão de IFN-gama e TNF-alfa (Teixeira-Salum et al., 2010), que são citocinas pró-inflamatórias estimuladas pelos macrófagos M1 (Mantovani et al., 2013), enquanto os macrófagos M2 representam um estado imunomodulatório, na tentativa de reparo tecidual. Os macrófagos M2 estão relacionados a uma resposta Th2 (Motran et al., 2018), que é mediada por células T (linfócitos) e está diretamente relacionada com a liberação de IL-4, atuando contra a reabsorção óssea. A resposta Th2 é fundamental

na modulação da inflamação e do reparo tecidual (Kopitar et al., 2006). Entretanto, o papel protetor dos macrófagos M2 é relativo. No contexto da biologia do câncer, por exemplo, os macrófagos M1 contribuem para a defesa do tumor, enquanto os M2 estão associados à progressão tumoral e a um prognóstico desfavorável (Weber et al., 2018).

O presente estudo demonstrou uma maior quantidade de macrófagos M2 nos cistos radiculares dos dentes decíduos e permanentes. Portanto, a hipótese nula foi rejeitada. Este resultado discorda dos resultados apresentados por Weber et al. (2018), que observaram maior polarização de macrófagos M1 em cistos periapicais de dentes permanentes. Entretanto, o estudo conduzido por Weber et al. (2018) não menciona, na análise histopatológica pela coloração de HE, se foram excluídos os casos de lesões periapicais crônicas que apresentavam infiltrado inflamatório agudo, ou seja, lesões crônicas que reagudizaram. No presente estudo, as lesões classificadas como reagudizadas foram excluídas e foram analisados os cistos com infiltrado inflamatório crônico. Além disso, a hipótese desses autores foi que a diferenciação da lesão periapical em granulomas apicais ou em cistos radiculares seria determinada pela polarização dos macrófagos. Assim, no trabalho de Weber et al., (2018), as análises foram feitas com o objetivo de comparar cistos radiculares com cistos dentígeros e granulomas periapicais. Portanto, não houve a menção isolada da quantificação de macrófagos M1 e M2 nos cistos radiculares, o que impossibilita uma comparação direta com os resultados obtidos no presente estudo.

Adicionalmente, sabe-se que o LPS bacteriano é um importante estímulo para a polarização de macrófagos M1 (Mantovani et al., 2007). Portanto, na gênese e no desenvolvimento de patologias periapicais, a invasão bacteriana inicial associada à grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias e de LPS poderia contribuir para uma maior expressão de macrófagos M1 na fase inicial da lesão. Como já demonstrado por Mills (2015), nos primeiros dias de exposição ao patógeno, há uma prevalência maior de óxido nítrico, que é expresso por macrófagos M1. Com o passar do tempo, há um aumento na quantidade de ornitina, que é expressa por macrófagos M2, ou seja, podemos hipotetizar que em lesões crônicas seria esperada uma maior quantidade de macrófagos M2. Portanto, a maior expressão de M2 nos cistos periapicais observada no presente estudo pode ser justificada como uma

defesa do organismo, tendo em vista que as lesões periapicais são definidas como uma resposta imunológica de defesa do hospedeiro para prevenir a disseminação da infecção bacteriana do sistema de canais radiculares para os tecidos circundantes (Teixeira-Salum et al., 2010).

Deve ser salientado que o presente estudo foi o primeiro a avaliar a polarização de macrófagos M1 e M2 em cistos radiculares de dentes decíduos. Bolan et al. (2008) investigaram a presença de macrófagos em lesões periapicais de dentes decíduos por meio de imunomarcagem para CD68, além da presença de células T e B. Estes autores mostraram que os macrófagos e as células T e B compreenderam a maioria do infiltrado inflamatório nas lesões, concluindo que o sistema imune desempenha um papel importante nos processos inflamatórios perirradiculares dos dentes decíduos. A falta de estudos investigando a polarização dos macrófagos em M1 ou M2, em lesões periapicais de dentes decíduos, impossibilita a comparação direta dos nossos resultados com achados prévios.

Além disso, o presente estudo demonstrou maior polarização de macrófagos M1 nos cistos radiculares de dentes permanentes, em comparação aos cistos dos dentes decíduos.

Sabe-se que o equilíbrio nos fenótipos M1 e M2 está associado a moléculas pró e anti-inflamatórias, respectivamente (Singh et al., 2014). Portanto, a investigação da presença simultânea dessas células pode fornecer evidências sobre o papel dos macrófagos nos diferentes tipos de lesões periapicais. Como já salientado, o presente estudo foi o primeiro a mostrar que os macrófagos M1 e M2 estão presentes nos cistos radiculares de dentes decíduos, com maior prevalência de M2. Esse conhecimento é importante, pois pode permitir futuramente o direcionamento de materiais utilizados durante o tratamento endodôntico (soluções irrigadoras, curativos de demora e materiais obturadores) para uma maior polarização desses macrófagos. Sabe-se que o MTA, por exemplo, leva ao acúmulo de células que expressam moléculas associadas a macrófagos M2 (Takei et al., 2014). Entretanto, o papel específico desempenhado pelos macrófagos M1 e M2 nas lesões periapicais, incluindo nos cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes, requer maior investigação. Assim, estudos adicionais são necessários.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos no presente estudo, pôde-se concluir: com relação ao infiltrado inflamatório crônico, em HE, não foi possível encontrar diferenças, entre cistos periapicais de dentes decíduos e permanentes. Em relação a análise morfológica e Imunohistoquímica, os macrófagos M1 e M2 estão presentes nos cistos periapicais de dentes decíduos e permanentes, com maior quantidade de células M2. Além disso, os cistos periapicais dos dentes permanentes apresentaram maior quantidade de macrófagos M1, em comparação aos cistos dos dentes decíduos. Portanto, a hipótese nula estabelecida foi rejeitada.

Referências

REFERÊNCIAS

- Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.
- Albina JE, Mills CD, Henry WL Jr, Caldwell MD. Regulation of macrophage physiology by L-arginine: role of the oxidative L-arginine deiminase pathway. *J Immunol*. 1989 Dec 1; 143(11):3641-6.
- American Academy of Allergy Asthma & Immunology Terms. *Immune System*. 2018.
- American association of endodontics. *Glossary of endodontic terms*. 9 Ed. Chicago. 2012; 2015; 60611-2691.
- Andrade BAB, Leon JE, Carlos R, Azañero WD, Taylor AM, Almeida OP. Immunohistochemical Expression of p16, p21, p27 and Cyclin D1 in Oral Nevi and Melanoma. *Head Neck Pathology*. 2012; 6(3):297-304.
- Arango Duque G, Descoteaux A. Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means. *Curr Opin Microbiol*. 2015 Aug; 26:32-40.
- Araújo NS de; Araújo VC de. *Patologia Bucal*. 1.ed. São Paulo: Artes médicas. 1994; p.99-106.
- Benn A, Altini M. Dentigerous cysts of inflammatory origin. A clinicopathologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996 Feb; 81(2):203-9.
- Bezerra da Silva RA, Nelson-Filho P, Lucisano MP, De Rossi A, de Queiroz AM, Bezerra da Silva LA. MyD88 Knockout mice develop initial periodical lesions with increased numbers of neutrophils. *Journal Endodontic*. 2014; 47(7):675-86.
- Billiau A, Matthys P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Apr; 20(2):97-113.
- Bolan M, Lima DA, Figueiredo CP, Di Giunta G, Rocha MJ. Immunohistochemical study of presence of T cells, B cells, and macrophages in periradicular lesions of primary teeth. *Journal of Pediatric Dentistry*. 2008; 32(4).
- Cao X, Shen D, Patel MM, Tuo J, Johnson TM, Olsen TW, Chan CC. Macrophage polarization in the maculae of age-related macular degeneration: a pilot study. *Pathology International*. 2011; 61(9):528-535.
- Carneiro Sampaio MMS, Grumach AS. *Imunologia e alergia pediátrica*. 1. Ed. São Paulo: Sarvier; 1992.
- Chávez-Galán L, Olleros ML, Vesin D, Garcia I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Front Immunol*. 2015 May 26; 6:263.
- Cohenca N, Silva LA, Silva RA, Nelson-Filho P, Heilborn C, Watanabe E, Saraiva MC. Microbiological evaluation of different irrigation protocols on root canal disinfection in teeth with apical periodontitis: an in vivo study. *Braz Dent J*. 2013 Sep-Oct; 24(5):467-73.
- Consolaro 2018. *Biologia e Patologia da Polpa e Periápice*. 1 Ed. Paraná: Dental Press; 2018.

Conti BJ, Santiago KB, Sforcin JM. Células dendríticas: mini-revisão Dendritic cells: a short review. *Biosaúde, Londrina*, v. 16, n. 1, 2014.

de Queiroz AM, Arid J, Nelson-Filho P, Lucisano MP, Silva RA, Sorgi CA, Faccioli LH, Silva LA. Correlation Between Bacterial Endotoxin Levels in Root Canals of Primary Teeth and the Periapical Lesion Area. *J Dent Child (Chic)*. 2016; 83(1):9-15.

Dokic K, Tomic S, Markovic M, Milosavljevic P, Colic M. Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte – derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2013; 43(7):1862-72.

Fan R, Sun B, Zhang CF, Lü YL, Xuan W, Wang QQ, Yin XZ. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: possible association with inflammatory cells. *Chin Med J (Engl)*. 2011 Jul; 124(14):2162-6.

Finn AV, Saeed O, Virmani R. Macrophage subsets in human atherosclerosis. *Circulation Research*. 2012; 10-59(2):166-77.

Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol*. 2007 Apr 15; 178(8):5245-52.

Gammoh NZ, Rink L. Infection and Inflammation. *Nutrients*. 2017; 17-9(6).

Gonçalves CK, Fregnani ER, Leon JE, Silva-Sousa YT, Perez DE. Immunohistochemical expression of p63, epidermal growth factor receptor (EGFR) and notch-1 in radicular cysts, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. *Braz Dent J*. 2012; 23(4):337-43.

Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 2001 Feb; 13(2):85-94.

Hahn C, Liewehr FR. Update on the Adaptive Immune of the dental pulp. *Joe*. 2007; 33(7).

Hasan D, Chalouhi N, Jabbour P, Hashimoto T. Macrophage imbalance (M1 vs. M2) and upregulation of mast cells in wall of ruptured human cerebral aneurysms: preliminary results. *Journal of Neuroinflammation*. 2012; 9:222.

Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL, Teles RP, Vieira LQ, Teles FR, Sobrinho AP. Microbial Ecosystem Analysis in Root Canal Infections Refractory to Endodontic Treatment. *J Endod*. 2016 Aug; 42(8):1239-45.

Hidalgo LR, Da Silva LA, Nelson-Filho P, Da Silva RA, de Carvalho FK, Lucisano MP, Novaes AB Jr. Comparison between one-session root canal treatment with aPDT and two-session treatment with calcium hydroxide-based antibacterial dressing, in dog's teeth with apical periodontitis. *Laser Med Sci*. 2016; 31(7):1481-91.

Hofling JF, Gonçalves RB e colaboradores. *Imunologia para Odontologia*. Porto Alegre: Artmed, 2006.

Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*. 1993 Mar 15; 81(6):1607-13.

- Iqbal A, McNeill E, Kapellos TS, Komito DR, Norman S, Burd S, Smart N, Machemer DEW, Stylianou E, McShane H, Channon KM, Chawla A, Greave DR. Human CD68 promoter GFP transgenic mice allow analysis of monocyte to macrophage differentiation in vivo. *Blood*. 2014; 9-124(15):e33-44.
- Ito IY, Junior FM, Paula-Silva FW, Da Silva LA, Leonardo MR, Nelson-Filho P. Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre- and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. *Int J Paediatr Dent*. 2011 Sep; 21(5):353-60.
- Ito T, Kaneko T, Yamanaka Y, Shigetani Y, Yoshiba K, Okiji T. M2 macrophages participate in the biological tissue healing reaction to mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2014 Mar;40(3):379-83.
- Jenkins SJ, Ruckerl D, Thomas GD, Hewitson JP, Duncan S, Brombacher F, Maizels RM, Hume DA, Allen JE. IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *The Journal of Experimental Medicine*. 2013; 210(11):2477-91.
- Kawamura K, Komohara Y, Takaishi K, Katabuchi H, Takeya M. Detection of M2 macrophages and colony-stimulation factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathology International*. 2009; 59(5):300-5.
- Kopitar AN, Ihan Hren N, Ihan A. Commensal oral bacteria antigens prime human dendritic cells to induce Th1, Th2 or Treg differentiation. *Oral Microbiol Immunol*. 2006 Feb;21(1):1-5.
- Lin HP, Chen HM, Yu CH, Kuo RC, Kuo YS, Wang YP. Clinicopathological study of 252 jaw bone periapical lesions from a private pathology laboratory. *J Formos Med Assoc*. 2010 Nov; 109(11):810-8.
- Leonardo MR, Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci*. 2004 ;12(2):93-8.
- Lu CF, Huang CS, Tiji JW, Chiang CP. Infiltrating macrophage count: a significant predictor for progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *Head Neck*. 2010; 32(1):18-25.
- Ma N, Yang D, Okamura H, Teramachi J, Hasegawa T, Qiu L, Haneji T. Involvement of interleukin-23 induced by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide in osteoclastogenesis. *Mol Med Rep*. 2017 Feb; 15(2):559-566.
- Mantovani A, Garlanda C. Platelet-macrophage partnership in innate immunity and inflammation. *Nat Immunol*. 2013 Aug; 14(8):768-70.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience*. 2008; 1(13):453-6.
- Márton I, Radics T, Szakáll S, Kiss C. [Analysis of activated cells in apical granuloma]. *Fogorv Sz*. 1999 Dec;92(12):379-85.

Márton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2000 Jun; 15(3):139-50.

Mass E, Kaplan I, Hirshberg A. A clinical and histopathological study of radicular cysts associated with primary molars. *J Oral Pathol Med*. 1995 Nov; 24(10):458-61.

Miller JF, Mitchell GF. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med*. 1968 Oct 1; 128(4):801-20.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000 Jun 15; 164(12):6166-73.

Mills CD. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. *Crit Rev Immunol*. 2001; 21(5):399-425.

Mills CD. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Front Immunol*. 2015 May 5; 6:212.

Mosmann TR, Bond MW, Coffman RL, Ohara J, Paul WE. T-cell and mast cell lines respond to B-cell stimulatory factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Aug; 83(15):5654-8.

Motran CC, Silvano L, Chiapello LS, Theumer MG, Ambrosio LF, Volpini X, Celas DP, Cervi L. Helminth Infections: Recognition and Modulation of the Immune Response by Innate Immune Cells. *Front Immunol*. 2018 Apr 4; 9:664.

Myers DR, Battenhouse MR, Barenie JT, McKinney RV, Singh B. Histopathology of furcation lesions associated with pulp degeneration in primary molars. *Pediatr Dent*. 1987 Dec; 9(4):279-82.

Nair PN, Schmid-Meier E. An apical granuloma with epithelial integument. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1986 Dec; 62(6):698-703.

Nair PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Journal of Periodontology*. 1997; 13:121-48.

Neto MN, Danesi CC, Daniele TU. Contribution to the study of radicular cyst. Literature review. *Saúde*, Vol. 30 (1-2): 90-99, 2004.

Parisi L, Gini E, Baci D, Tremolati M, Fanuli M, Bassani B, Farronato G, Bruno A, Mortara L. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J Immunol Res*. 2018 Jan 14;2018:8917804.

radicular cysts associated with primary molars. *J Oral Pathol Med*. 1995

Regezi JJ, Sciubba RJ. *Oral Pathology*, 7th Edition. London: Elsevier; 2000.

Rocha CT, Rossi MA, Leonardo MR, Rocha LB, Nelson-Filho P, Silva LA. Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulps with or without radiographically evident apical pathosis. *Int Endod J*. 2008 Aug; 41(8):664-9.

Rodini CO, Lara VS. Study of the expression of CD68+ macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Aug; 92(2):221-7.

- Ruvière DB, Leonardo MR, da Silva LA, Ito IY, Nelson-Filho P. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Dent Child (Chic)*. 2007 May-Aug; 74(2):118-23.
- Segura-Egea JJ, Martín-González J, Castellanos-Cosano L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J*. 2015 Oct;48(10):933-51.
- Shi X, Shiao SL. The role of macrophage phenotype in regulating the response to radiation therapy. *Transl Res*. 2018 Jan;191:6480.
- Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Nov; 72(21):4111-26.
- Silva LA, Leonardo MR, Oliveira DS, Silva RA, Queiroz AM, Hernández PG, Nelson-Filho P. Histopathological evaluation of root canal filling materials for primary teeth. *Braz Dent J*. 2010 Jan; 21(1):38-45.
- Silva LABD, Sá MAR, Melo RA, Pereira JDS, Silveira ÉJDD, Miguel MDCD. Analysis of CD57+ natural killer cells and CD8+ T lymphocytes in periapical granulomas and radicular cysts. *Braz Oral Res*. 2017 Dec 18; 31:e106.
- Silva TA, Garlet GP, Fudaka SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in Oral Inflammatory Diseases: Apical Periodontitis and Periodontal Disease. *J Dent Res*. 2007; 86(4):306-319.
- Singh A, Talekar M, Raikar A, Amiji M. Macrophage-targeted delivery systems for nucleic acid therapy of inflammatory diseases. *J Control Release*. 2014 Sep 28; 190:515-30.
- Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998; 9(4):498-521.
- Steinman RM, Cohn ZA. Pillars Article: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med*. 1973. 137: 1142-1162. *J Immunol*. 2007 Jan 1; 178(1):5-25.
- Takahashi K, Naito M, Takeya M. Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. *Pathol Int*. 1996 Jul; 46(7):473-85.
- Takei E, Shigetani Y, Yoshida K, Hinata G, Yoshida N, Okiji T. Initial transient accumulation of M2 macrophage-associated molecule-expressing cells after pulpotomy with mineral trioxide aggregate in rat molars. *J Endod*. 2014 Dec; 40(12):1983-8.
- Teixeira-Salum TB, Rodrigues DB, Gervásio AM, Souza CJ, Rodrigues V Jr, Loyola AM. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med*. 2010 Mar; 39(3):250-6.
- Tommasi AF. Diagnóstico em Patologia Bucal. 3.ed. São Paulo: Pancast, 2002. p.285-91.
23. Tsai CH et al. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-2 in radicular cysts. *Int Endod Journal*, v.35, n.10, p. 854-8, oct. 2002.
- Tsai CH, Huang FM, Yang LC, Chou MY, Chang YC. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-2 in radicular cysts. *Int Endod J*. 2002 Oct; 35(10):854-8.

Vanden Bogaerde L, Rangert B, Wendelhag I. Immediate/early function of Brånemark System TiUnite implants in fresh extraction sockets in maxillae and posterior mandibles: an 18-month prospective clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2005; 7 Suppl 1:S121-30.

Weber M, Schlittenbauer T, Moebius P, Büttner-Herold M, Ries J, Preidl R, Geppert CI, Neukam FW, Wehrhan F. Macrophage polarization differs between apical granulomas, radicular cysts, and dentigerous cysts. *Clin Oral Investig*. 2018. Jan; 22(1):385-394.

Wei S, Kawashima N, Suzuki N, Xu J, Takahashi S, Zhou M, Koizumi Y, Suda H. Kinetics of Th17-related cytokine expression in experimentally induced rat periapical lesions. *Aust Endod J*. 2013 Dec; 39(3):164-70.

Xuan D, Han Q, Tu Q, Zhang L, Yu L, Murry D, Tu T, Tang Y, Lian JB, Stein GS, Valverde P, Zhang J, Chen J. Epigenetic Modulation in Periodontitis: Interaction of Adiponectin and JMJD3-IRF4 Axis in Macrophages. *J Cell Physiol*. 2016 May; 231(5):1090-6.

Zhang J, Chen J. Epigenetic Modulation in Periodontitis: Interaction of Adiponectin and JMJD3-IRF4 Axis in Macrophages. *J CellPhysiol*. 2016 May; 231(5):1090-6.

Yang J, Zhu Y, Duan D, Wang P, Xin Y, Bai L, Liu Y, Xu Y. Enhanced activity of macrophage M1/M2 phenotypes in periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2017 Mar 11.

Anexo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comitê de Ética em Pesquisa

Atest.CEP 002/2018

ATESTADO

Atestamos, de acordo com os registros desta Secretaria, que o Protocolo CAAE nº 80253417.6.0000.5419 sobre a pesquisa intitulada **"Caracterização e Quantificação dos Tipos Celulares da Resposta Inflamatória e Imune em Lesões Periapicais de Dentes Decíduos e Permanentes: Estudo em Humanos"**, sob a responsabilidade de Amanda Silva Bertasso, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, em 27/11/2017.

We hereby certify, in accordance with the existing settlements of this Office, that the Protocolo CAAE nº 80253417.6.0000.5419 about the research entitled **"Characterization and Quantification of Cell Types of Inflammatory and Immune Response in Periapical Lesions of Deciduous and Permanent Teeth: Study in Humans"**, under responsibility of Amanda Silva Bertasso, was approved by the Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, in 27/11/2017.

Ribeirão Preto, 02 de maio de 2018.

Carlos Feitosa dos Santos
Secretário do Comitê de Ética em Pesquisa
FORP/USP