



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL



AMANDA SILVA BERTASSO

**QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DA RESPOSTA IMUNE E INFLAMATÓRIA E
DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO (BETA-DEFENSINA-3), EM CISTOS
RADICULARES DE DENTES DECÍDUOS E PERMANENTES**

**RIBEIRÃO PRETO
2022**

AMANDA SILVA BERTASSO

**QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DA RESPOSTA IMUNE E INFLAMATÓRIA E
DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO (BETA-DEFENSINA-3), EM CISTOS
RADICULARES DE DENTES DECÍDUOS E PERMANENTES**

VERSÃO ORIGINAL

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa: Pós-Graduação em Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho

RIBEIRÃO PRETO

2022

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 de células da resposta imune e inflamatória e de peptídeo antimicrobiano (Beta-defensina-3), em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes. Ribeirão Preto, 2022.

101p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Programa: Pós-Graduação em Odontopediatria. Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientador: Nelson-Filho, Paulo.

Versão Original

1. Imunohistoquímica; 2. Dentes Permanentes; 3. Dentes Decíduos; 4. Cistos Radiculares; 5. Resposta Imune; 6. Inflamação; 7. Beta-defensinas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bertasso AS. **Quantificação de células da resposta imune e inflamatória e de peptídeo antimicrobiano (Beta-defensina-3), em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes.** 2022. 101p. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa: Pós-Graduação em Odontopediatria.
Área de Concentração: Odontopediatria.

Aprovado em: ____ / ____ / 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Paulo Nelson Filho – Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

AMANDA SILVA BERTASSO

- 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 - PIBIC).
Orientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche León
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
- 2015-2017** Curso Aperfeiçoamento em Pacientes Especiais
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
- 2018-2022** Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria - nível Doutorado (bolsa CAPES)
Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

DEDICATÓRIA

A Deus,

Ao Senhor, que sempre me concedeu bem mais do que eu pedi e/ou mereci, sobe hoje, em forma de oração, o meu muito obrigado.

Aos meus Pais,

Antônio e Fernanda, meu profundo agradecimento por tudo que fizeram por mim em toda a minha vida. O amor que recebi foi incondicional e infinito e assim também é o meu amor por vocês. Hoje só tenho gratidão a Deus por ter me abençoado com uma família tão maravilhosa, amorosa e perfeita.

Mãe, obrigada por confiar em mim em todos os momentos da minha vida.

Pai, obrigada por ser meu porto seguro, quando tudo parecia desabar.

Para mim e para vocês (Pais) estes 4 anos de doutorado foram de muita luta, perseverança e fé, por isto este título é uma vitória nossa! Obrigada por tudo, Amo vocês.

Ao meu amor,

Guilherme, você chegou no meio da minha trajetória da Pós-graduação e veio para "ressignificar" minha vida. Você me deu forças para não desistir do meu sonho: Ser Doutora pela Universidade de São Paulo. Hoje este sonho se realiza e para você minha eterna gratidão. O Amor verdadeiro constrói, impulsiona e não deixa o outro olhar para atrás. Te amo.

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.

Aos meus Padrinhos,

Romeu e Renata, obrigada por serem tão presentes na minha vida, sempre me impulsionando para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu Orientador Prof. Dr. Paulo Nelson Filho,

Professor, agradeço por ter me aberto portas para que eu pudesse dar continuidade aos meus estudos e concebesse a minha Tese de Doutorado. Agradeço, pois você sempre teve o perfeito equilíbrio e discernimento para saber ouvir e falar na hora certa. Além disso, muitas vezes se colocou na delicada posição de compreender mais do que ser compreendido. Apesar das minhas limitações, sempre acreditou que eu era capaz de superar minhas próprias dificuldades. Obrigada por confiar em mim e no meu potencial. Meu profundo respeito e admiração por ser um excelente Professor, Pesquisador, Diretor e Orientador. Muitos dos seus ensinamentos vou levar para a vida toda, inclusive o capricho. O senhor fez desabrochar em mim criatividade, bom senso e equilíbrio com ética, rigores acadêmicos e científicos e, sobretudo, responsabilidade, que são exigidos para um Doutor. A minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, nas pessoas do atual Reitor **Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior**, e da Vice-Diretora **Prof. Dra. Maria Arminda do Nascimento Arruda**.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do Diretor, **Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho**, e do Vice-Diretor **Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva**.

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 **Prof. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**.

Ao **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 Doutorado. O senhor se dedicou 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 **Dra. Marília Pacífico Lucisano**,

Por todo o apoio e auxílio na fase final do meu trabalho. Obrigada por toda a paciência e dedicação. A minha eterna gratidão.

Aos meus amigos da Pós-Graduação, **Heitor Albergoni da Silveira**, **Evânio Vilela da Silva**, **Olívia Santana Jorge** e **Xiomara Polanco**. Obrigada por todo o apoio e amizade todos estes anos, minha eterna Gratidão.

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. Andriara 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 Stuani, Prof. Dra. Mirian Aiko Nakane Matsumoto, Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva e Prof. Dr. Murilo Fernando Neuppmann Feres.

Aos Funcionários do Departamento de Clínica Infantil,

Filomena Leli Placciti, Matheus Morelli Zanela, Nilza Letícia Magalhães, Dra. Carolina Torres Montavani, Mary Possani Carmessano, 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 Scandelai, 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.

À **CAPES**, pela bolsa concedida.

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

Cada dia é uma dádiva,
Uma oportunidade de transformar sonhos em realidade, e por mais este dia de vida eu Te agradeço, meu Deus.



A parte experimental da referida Tese 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 da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. PROPOSIÇÃO.....	33
2.1 OBJETIVOS	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	39
3.2 ETAPA CIRÚRGICA	40
3.3 PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO	40
3.4 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA	41
PARTE 1 - ANÁLISE DA PRESENÇA/AUSÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DOS TIPOS CELULARES DA RESPOSTA IMUNE E INFLAMATÓRIA	43
PARTE 2 - ANÁLISE DA PRESENÇA/AUSÊNCIA E LOCALIZAÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO (HBD-3) E SUA RELAÇÃO COM O TAMANHO DA LESÃO RADIOGRÁFICA.....	44
<i>ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA</i>	<i>44</i>
<i>EXAME RADIOGRÁFICO</i>	<i>44</i>
<i>MENSURAÇÃO DO TAMANHO RADIOGRÁFICO DAS LESÕES PERIAPICAIS.....</i>	<i>45</i>
<i>AValiação DA RELAÇÃO ENTRE O TAMANHO RADIOGRÁFICO DAS LESÕES PERIAPICAIS E A PORCENTAGEM DAS ÁREAS DE IMUNOMARCAÇÃO PARA HBD-3.....</i>	<i>45</i>
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4. RESULTADOS	47
PARTE 1 - ANÁLISE DA PRESENÇA/AUSÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DOS TIPOS CELULARES DA RESPOSTA IMUNE E INFLAMATÓRIA.....	49
<i>CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....</i>	<i>49</i>
<i>ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA</i>	<i>49</i>
<i>MASTÓCITOS.....</i>	<i>50</i>
<i>LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS</i>	<i>53</i>
<i>LINFÓCITOS T.....</i>	<i>55</i>
<i>LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS.....</i>	<i>55</i>
<i>LINFÓCITOS B.....</i>	<i>57</i>

PARTE 2 - ANÁLISE DA PRESENÇA/AUSÊNCIA E LOCALIZAÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO (HBD-3) E SUA RELAÇÃO COM O TAMANHO DA LESÃO RADIOGRÁFICA	58
<i>CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA</i>	59
<i>ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA – ESCORES DE INTENSIDADE DE MARCAÇÃO.....</i>	59
<i>AValiação DA RELAÇÃO ENTRE O TAMANHO RADIOGRÁFICO DAS LESÕES PERIAPICAIS E A PORCENTAGEM DAS ÁREAS DE IMUNOMARCAÇÃO PARA HBD-3.....</i>	61
5. DISCUSSÃO.....	63
DA ANÁLISE DA PRESENÇA/AUSÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DOS TIPOS CELULARES DA RESPOSTA IMUNE E INFLAMATÓRIA.....	65
DA ANÁLISE DA PRESENÇA/AUSÊNCIA E LOCALIZAÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO (HBD-3) E SUA RELAÇÃO COM O TAMANHO DA LESÃO RADIOGRÁFICA	71
6. CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	79
ANEXO	91
ANEXO A - PARECER DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	93
APÊNDICES.....	97
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	99
APÊNDICE B - TERMO DE ASSENTIMENTO	101

Bertasso, AS. **Quantificação de células da resposta imune e inflamatória e de peptídeo antimicrobiano (Betadefensina-3), em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes.** [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: FORP/USP, 2022.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi quantificar células da resposta imune e inflamatória (mastócitos, células dendríticas plasmocitóides maduras e imaturas, linfócitos T regulatórios - TREGS - maduros e imaturos, linfócitos T, linfócitos T citotóxicos e Linfócitos B), em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes. Além disso, foi avaliada a presença/ausência, a intensidade e a porcentagem de marcação para beta-defensina-3 (hBD-3). Foram selecionados 19 casos de cistos radiculares de dentes decíduos e 17 cistos radiculares de dentes permanentes, os quais foram submetidos à análise imunohistoquímica por meio de marcadores específicos. Os resultados obtidos foram submetidos aos testes de D'Agostino & Pearson, Mann Whitney, teste t, Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, com nível de significância de 5%. Verificou-se que todos os tipos celulares avaliados estavam presentes em todas os cistos radiculares. Os dentes decíduos apresentaram maior expressão de células dendríticas plasmocitóides (maduras e imaturas), Linfócitos B e Linfócitos T ($p < 0,05$), enquanto os dentes permanentes apresentaram maior expressão de linfócitos T, Dendríticas Plasmocitóides imaturas, linfócitos T citotóxicos e linfócitos B ($p < 0,05$). A hBD-3 foi expressa em 78,5% dos dentes decíduos e em 76,9% dos dentes permanentes, no epitélio e na cápsula, porém nos dentes decíduos essa expressão ocorreu de maneira semelhante na cápsula e no epitélio ($p > 0,05$), enquanto que nos dentes permanentes houve maior expressão na cápsula ($p < 0,05$). Nos dentes decíduos observou-se maior produção de hBD-3 nas lesões pequenas, em comparação às lesões grandes ($p < 0,05$). Por outro lado, nos dentes permanentes não foi observada diferença na produção de hBD-3 entre lesões pequenas e lesões grandes ($p > 0,05$). Concluiu-se que todas as células avaliadas estavam presentes em todos os casos (100%). As células com maior expressão nos dentes decíduos foram as células dendríticas plasmocitóides imaturas, enquanto que nos dentes permanentes foram os Linfócitos T. A hBD-3 foi produzida pelo epitélio/cápsula, tanto em dentes decíduos quanto em dentes permanentes. Nos dentes decíduos observou-se maior produção de hBD-3 nas lesões pequenas, em comparação às lesões grandes. Por outro lado, nos dentes permanentes não foi observada diferença na produção de hBD-3 entre lesões pequenas e lesões grandes.

PALAVRAS-CHAVES: Imunohistoquímica; Dentes Permanentes; Dentes Decíduos; Cistos Radiculares; Resposta Imune; Inflamação; Beta-Defensinas.

Bertasso, AS. **Quantification of immune and inflammatory cell responses and antimicrobial peptide (beta-defensin-3) in radicular cysts of primary and permanent teeth.** [Doctoral Thesis]. Ribeirão Preto: FORP/USP, 2022.

ABSTRACT

The aim of the present study was to quantify immune and inflammatory response cells (mast cells, mature and immature plasmacytoid dendritic cells, regulatory T lymphocytes - TREGS - mature and immature, T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes and B lymphocytes), in radicular cysts of primary and permanent teeth. In addition, presence/absence, intensity and percentage of immunostaining for beta-defensin-3 (hBD-3) were evaluated. Nineteen cases of periapical cysts of deciduous teeth and 17 periapical cysts of permanent teeth were selected, which were submitted to immunohistochemical analysis using specific markers. The results obtained were submitted to D'Agostino & Pearson, Mann Whitney, t-test, Kruskal-Wallis and Dunn's post-test, with a significance level of 5%. All cell types evaluated were present in all radicular cysts. Primary teeth showed higher expression of plasmacytoid dendritic cells (mature and immature) ($p < 0.05$), T lymphocytes ($p < 0.05$) and B lymphocytes ($p < 0.05$), while permanent teeth showed higher expression of plasmacytoid dendritic cells immature ($p < 0.05$), T lymphocytes ($p < 0.05$), B lymphocytes ($p > 0.05$) and cytotoxic T lymphocytes ($p > 0.05$). Beta-defensin-3 was expressed in 78.5% of deciduous teeth and in 76.9% of permanent teeth, in the epithelium and capsule. In primary teeth, this expression occurred in a similar way in the capsule and in the epithelium ($p > 0.05$), while in permanent teeth there was greater expression in the capsule ($p < 0.05$). In primary teeth, a higher production of hBD-3 was observed in small lesions, compared to large lesions ($p < 0.05$). On the other hand, in permanent teeth, no difference was observed in the production of hBD-3 between small and large lesions ($p > 0.05$). It was concluded that all evaluated cells were present in all cases (100%). The cells with the highest expression in primary teeth were the plasmacytoid dendritic cells, while in the permanent teeth the T lymphocytes were the cells with the highest expression. Beta-defensin-3 was produced by the epithelium/capsule in both primary and permanent teeth. In primary teeth, a higher production of hBD-3 was observed in small lesions, compared to large lesions. On the other hand, in permanent teeth, no difference was observed in the production of hBD-3 between small and large lesions.

KEYWORDS: Immunohistochemistry; Permanent Teeth; Primary Teeth; Radicular Cysts; Immune response; Inflammation; Beta-Defensins.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A lesão periapical é representada pela inflamação e destruição do periodonto apical, com origem pulpar (Academia Americana de Endodontia, 2020). Como relatado em 2021 por Tibúrcio-Machado et al., metade da população mundial adulta apresenta pelo menos um dente com lesão periapical, o que chama a atenção para a necessidade da implementação de políticas públicas para o seu controle. Trata-se de uma das lesões mais frequentemente observadas na prática clínica, em Odontologia (MacDonald, 2019) e, na maior parte das vezes, é ocasionada pela infecção microbiana do sistema de canais radiculares, que desencadeia uma resposta inflamatória e imune (Márton e Kiss, 2000; Nan Ma et al., 2017; Taira et al., 2019; Wang et al., 2022). Nesse aspecto, em 1997 Nair já havia definido a lesão periapical como sendo a “intersecção dinâmica entre a infecção do canal radicular e a resposta do hospedeiro”. Dentre as lesões periapicais, os abscessos periapicais, os cistos radiculares (de origem inflamatória) e os granulomas periapicais são as mais frequentemente observadas (Altaie et al., 2021).

Com relação à dinâmica da formação da lesão periapical, quando a região periapical é invadida pelos micro-organismos ou por seus produtos/subprodutos, o sistema imune inato é ativado, com migração de mastócitos, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, dentre outras células, para o local da lesão. A seguir, células do sistema imune adaptativo, incluindo os linfócitos T e linfócitos B, migram para o local da lesão (Silva et al., 2007; Polanco et al., 2021).

As primeiras células que combatem o agente agressor de forma inespecífica são os mastócitos (Consolaro, 2009), os quais atuam diretamente sobre os patógenos, sofrendo degranulação. Embora reconhecidos como fonte de histamina, serotonina e outras aminas vasoativas, os mastócitos desempenham um papel importante na patogênese da lesão periapical durante os estágios precoces e na fase de transição da inflamação aguda para crônica (Sheethal et al., 2018). Em 2017, Andrade et al. quantificaram mastócitos em lesões periapicais de dentes permanentes e concluíram que o número de mastócitos foi maior em granulomas periapicais, em comparação com cistos radiculares. Além disso, após avaliarem

granulomas e cistos em dentes permanentes, Bergamini et al. (2020) verificaram que a presença de mastócitos pode estar associada com a progressão da lesão.

Os neutrófilos também participam do sistema imune inato, estando mais relacionados às inflamações agudas. No entanto, desde 2013 tornou-se evidente que os neutrófilos são, na verdade, células complexas, desempenhando diversas funções, inclusive contribuindo para condições inflamatórias crônicas e respostas imunes adaptativas (Kolaczkowska e Kubes, 2013).

Os macrófagos também são células que atuam no desenvolvimento da lesão periapical, tendo como função primária ingerir e destruir os micro-organismos, ou seja, são células fagocíticas. Além disso, são células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T (APCs), ingerem células mortas do hospedeiro, liberam inúmeros mediadores químicos e, por meio destes mediadores químicos liberados, células do sistema imune adaptativo são recrutadas para o local da lesão. Paralelamente, promovem o reparo de tecidos lesionados, angiogênese e a síntese da matriz extracelular (Mills et al., 2000; Mills, 2015; Abbas 2015; Pereira et al., 2016; Veloso et al., 2020).

A fagocitose realizada pelos macrófagos inicia-se com o englobamento do agente agressor e a liberação enzimática de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio NADPH (dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato), que são tóxicas para os micro-organismos levando-os à morte. Após a morte do agente agressor, os macrófagos realizam a digestão proteolítica (Jenkins et al., 2013; Gammoh e Rink, 2017; Weber et al., 2018). Em 2018, Bănică et al. realizaram um estudo imunohistoquímico para detecção de macrófagos, plasmócitos, mastócitos e linfócitos T e B em granulomas periapicais de dentes permanentes, concluindo que os macrófagos foram as células que se apresentaram em maiores números.

Os macrófagos apresentam uma vasta dinâmica de diferenciação, podendo ser polarizados basicamente em tipo M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório) (Altaie et al., 2021). A polarização macrofágica do tipo M1 está relacionada ao processo de combate aos patógenos e destruição tecidual, por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α , IL-12 e IL-18. Além disso, 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; Yunna et al., 2020). A liberação de IL-6 e IL-23 também tem sido relatada (Veloso et al., 2020). 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; Yuna, 2020).

Por outro lado, a polarização macrofágica do tipo M2 está relacionada ao processo de proliferação celular e reparação tecidual. Os macrófagos M2 desempenham um papel central nas respostas aos parasitas, remodelação tecidual, angiogênese, doenças alérgicas (Martinez et al., 2008; Jenkins et al., 2013; Chávez Galán et al., 2015) e, recentemente, na COVID-19 (Yoo et al., 2021). Os macrófagos M2 estão envolvidos na modulação do sistema imune e processo de reparo, por meio da secreção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o TGF- β (Zhuang et al., 2019). Em 2020, Bertasso et al. relataram que os macrófagos M1 e M2 estão presentes em cistos radiculares associados a dentes decíduos e permanentes, com maiores quantidades imunofenotípicas de M2.

Além dos mastócitos e macrófagos, as células dendríticas também são células do sistema imune inato, sendo as células apresentadoras de antígenos mais eficientes, devido à sua capacidade de capturar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos T, regulando a resposta imune adaptativa (Hahn e Liewehr, 2007; Mittelbrunn et al., 2009). O sistema imune inato pode distinguir entre patógenos infecciosos e não infecciosos e promover uma resposta imune apropriada (Webster et al., 2017). As células dendríticas, portanto, englobam o antígeno, o que resulta na sua migração para os linfonodos, onde interagem com células da resposta imune adaptativa (Iwasaki e Medzhitov, 2010; Linehan et al., 2014). Embora haja dois tipos de células dendríticas (mielóides e plasmocitóides), ambas produzem grandes quantidades de TNF-alfa em resposta a patógenos e outros agentes inflamatórios (Rossi e Young, 2005; Constantino 2017).

As células da imunidade adaptativa migram para o local da lesão mais tardiamente, exercendo papel de defesa imunológica antígeno-específica (Cooper e Alder, 2006). Os linfócitos T fazem parte da imunidade adaptativa e secretam uma série de mediadores e citocinas como Interferon-gama, TGF-beta, IL-2, IL-4, IL-6,

IL-10 e IL-13. Algumas citocinas, como a IL-6 e a IL-10, tem a capacidade de recrutar macrófagos para o local da lesão (Hahn e Liewebr, 2007).

As células T regulatórias, conhecidas como TREGS (Janssen et al., 2016), têm a função de suprimir a ativação imune por meio da modulação de diversas funções celulares, como a proliferação de células T e a produção de citocinas, como o TGF-beta (Hahn e Liewebr, 2007). As TREGS são definidas pela expressão do fator de transcrição nuclear da proteína 3 (FOXP3) e da expressão de CD4 e CD25 na superfície celular (Miyara et al., 2011; Janssen et al., 2016). O FOXP3 atua como um interruptor principal que rege o desenvolvimento e a função das células T-regulatórias, cujas funções incluem a inibição da resposta imune e da inflamação.

Por outro lado, os linfócitos T citotóxicos (CD8) expressam perforinas (uma das proteínas presentes nos grânulos dessas células) e granzimas, causando dano direto aos tecidos, enquanto as células T-helpers (CD4) secretam citocinas que recrutam e ativam monócitos e macrófagos (Cruvinel et al., 2010).

Segundo Bergamini et al. (2020), o conhecimento do padrão de células envolvidas é importante para o melhor entendimento da patogênese da lesão periapical. Apesar do exposto, 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. Embora os macrófagos (Weber et al., 2018; Weber et al., 2019; Bănică et al., 2018; Veloso et al., 2020), os TREGS (Colic et al., 2009; Araújo-Pires et al., 2014; Campos et al., 2015), os linfócitos T citotóxicos (Araújo-Pires et al., 2014; Bănică et al., 2018), os mastócitos (Rodini, Batista e Lara, 2004; Shiromany et al., 2014; Mahendrakumar et al., 2015; Mahita et al., 2015) e as células dendríticas (Figueiredo et al., 2018), entre outras, já terem sido previamente avaliadas em alguns estudos envolvendo lesões periapicais de dentes permanentes, particularmente com relação à dentição decídua a literatura é escassa (Bolan et al., 2008; Bertasso et al., 2020; Polanco et al., 2021).

Sabe-se que nos primeiros anos de vida da criança há uma imaturidade do sistema imunológico, o que confere vulnerabilidade a doenças infecciosas (Carneiro-Sampaio e Grumach, 1992; Bolan et al., 2008; Simon et al., 2015). Devido à ausência de estudos caracterizando e quantificando os diferentes 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 (Simon et al., 2015), 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, comparativamente aos permanentes, favorecendo o desenvolvimento e utilização de técnicas de tratamento mais direcionadas (Braz-Silva et al., 2019; Wang et al., 2022; Teixeira et al., 2022).

Como já salientado, o combate aos agentes agressores é realizado por meio da imunidade inata e/ou adaptativa (Dale e Krisanaprakornkit, 2001; Zasloff, 2002; Martin et al., 2015). No entanto, além da imunidade inata atuar contra os microorganismos por meio de células (neutrófilos, mastócitos, macrófagos e células dendríticas), pequenos peptídeos catiônicos ou aniônicos conhecidos como *Peptídeos Antimicrobianos (AMPs)*, que também fazem parte da imunidade inata, desempenham atividade antimicrobiana, atuando contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, parasitas e alguns vírus (Allgrove et al., 2008).

Um total de 146 peptídeos de defesa do hospedeiro foram identificados em humanos, até o momento (*Antimicrobial Peptide Database*, 2022 - APD: <https://aps.unmc.edu/home>) e, de acordo com Bechinger e Gorr (2017), mais de 40 peptídeos antimicrobianos endógenos podem ser expressos na cavidade bucal. Esses peptídeos podem ser encontrados na saliva, no tecido epitelial, nos neutrófilos (Dale e Krisanaprakornkit, 2001), nos fibroblastos (Bautista-Hernández et al., 2017; Inomata et al. 2020) e no fluido crevicular (Ashby et al., 2014; Khurshid et al., 2016).

Os AMPs são classificados em classes diferentes de acordo com a composição de aminoácidos, tamanho e estruturas conformacionais (Hancock e Lehrer, 1998; Brogden, 2005; Harris et al., 2009), estando as Defensinas (mais especificamente as Beta-defensinas), as Histatinas e as Catelicidinas entre os AMPs mais comumente expressos na cavidade bucal (Khurshid et al., 2016; Mai et al., 2017). O mecanismo de ação dos AMPs mais amplamente aceito é a permeabilização, seguida pela ruptura da parede celular (Mai et al., 2017; Nireeksha Varma et al., 2021).

Além da atividade antimicrobiana, os AMPs também atuam como moléculas biológicas efetivas na ativação imunológica e no processo de reparo (Yang et al., 2014). Assim, deve-se ressaltar que outro aspecto relevante na resposta do organismo frente à presença da lesão periapical é a produção das beta-defensinas e catelicidinas, como mecanismo de defesa.

As beta-defensinas humanas (β -defensinas ou hBDs) são peptídeos antimicrobianos catiônicos endógenos, conhecidos por desempenharem um papel relevante na defesa do hospedeiro contra a infecção microbiana (Zasloff, 2002; Lee e Baek, 2012), presentes de forma abundante nos tecidos epiteliais (Li et al., 2016). Além de sua atividade antimicrobiana, as beta-defensinas estão envolvidas em vários processos celulares, como o processo de reparo (Smiley et al., 2007). Tem sido sugerido, inclusive, que as beta-defensinas são capazes de apresentar um efeito de neutralização sobre a atividade do ácido lipoteicóico (LTA), presente na parede celular de micro-organismos Gram-positivos, e da endotoxina bacteriana (LPS), presente na parede celular de micro-organismos Gram-negativos (Giacometti et al., 2002; Lee et al., 2010; Inomata et al., 2020), o que torna o estudo desses peptídeos extremamente relevante, tanto na gênese quanto no desenvolvimento e tratamento da lesão periapical de dentes decíduos e permanentes.

O papel das beta-defensinas na defesa do hospedeiro tem sido amplamente avaliado nas áreas de Cariologia (Lips et al., 2017) e Periodontia (Li et al., 2016). De acordo com estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, crianças livres de cárie apresentam maiores níveis de beta-defensinas salivares (Lips et al., 2017).

Embora as beta-defensinas já tenham sido observadas nos epitélios das vias aéreas, córnea, mucosa nasal e urogenital, células capilares endoteliais, tecido intestinal, próstata (Lee et al., 2000; Schneider et al., 2005), mucoceles (Frederic et al., 2008) e no epitélio gengival (Li et al., 2016), até o momento estudos envolvendo beta-defensinas e Endodontia são escassos, *in vitro* em sua maioria e restritos aos dentes permanentes (Song et al., 2009; Paris et al., 2009; Lee et al., 2013a; Lee et al., 2013b; Lee e Baek, 2012; Yoo et al., 2017; Ghattas Ayoub et al., 2017; Aminoshariae et al., 2017; Zhai et al., 2019), ou em modelo animal (Zhai et al., 2020; Yoo et al., 2021), não tendo sido ainda estudada em lesões periapicais de dentes decíduos e permanentes de humanos.

Deve ser ressaltado que, dentre as 6 beta-defensinas humanas conhecidas, apenas as hBD-1, -2, -3 (Dale e Krisanaprakornkit, 2001) e -4 (Paris et al., 2009) são expressas na cavidade bucal (epitélio gengival, língua, palato, mucosa bucal, glândulas salivares, polpa e saliva). Nesse sentido, sabe-se que a hBD-3 apresenta potente atividade antimicrobiana contra micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, mesmo em baixas concentrações (Harder et al., 2001) e contribui para a resposta imune inata, por meio do recrutamento e ativação quimiotática de monócitos, neutrófilos, linfócitos T e células dendríticas (Zhang e Galo 2016). Pode, também, inibir a diferenciação osteoclástica e a reabsorção óssea (Park et al., 2017).

Assim, possivelmente o uso de materiais e técnicas que estimulem a produção de hBDs endógenas, ou o uso de hBDs recombinantes, poderia favorecer a eliminação de micro-organismos presentes no microambiente local do sistema de canais radiculares, contribuindo para o sucesso do tratamento endodôntico.

Dessa forma, verifica-se que as beta-defensinas desempenham múltiplas funções no corpo humano, incluindo atividade antimicrobiana de largo espectro, influência no processo de reparo, angiogênese (Khurshid et al., 2016) e redução da produção de citocinas pró-inflamatórias estimuladas pelo LPS (Bedran et al., 2014). Assim, pode-se hipotetizar que durante o desenvolvimento da lesão periapical, lesões menores poderiam ser resultantes, dentre outros fatores, de uma produção mais efetiva desses peptídeos antimicrobianos como resposta do organismo frente à infecção microbiana dos canais radiculares, e essa resposta poderia ser diferente em dentes decíduos e em dentes permanentes.

Pelo exposto, verifica-se que estudos clínicos são necessários, avaliando a resposta imune e inflamatória, bem como os peptídeos antimicrobianos endógenos, visando maior compreensão das patologias pulpares e periapicais, particularmente em dentes decíduos.

2. PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi quantificar células da resposta imune e inflamatória e peptídeo antimicrobiano (beta-defensina-3), em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes de humanos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificação de células inflamatórias e imunes, por meio de imunohistoquímica para mastócitos, células dendríticas plasmocitóides (maduras e imaturas), linfócitos T regulatórios (TREGS) (maduros e imaturos), linfócitos T, linfócitos T citotóxicos e Linfócitos B.
- Detecção da presença/ausência e da intensidade de marcação para beta-defensina-3 (hBD-3), por meio de imunohistoquímica.
- Avaliação da relação entre o tamanho da lesão radiográfica e a quantidade/intensidade da marcação para hBD-3.

A hipótese nula a ser testada é que, em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes de humanos, não há diferença nos parâmetros a serem avaliados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi previamente submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, tendo sido aprovado (CAAE 80253417.6.0000.5419) (Anexo A).

Com relação às células inflamatórias, o cálculo amostral foi realizado com base nos resultados de Bertasso et al. (2020). O poder da amostra foi calculado levando em consideração a média e o desvio padrão dos grupos avaliados, sendo obtido o valor do erro β de 0,8 e poder do teste de 81%, que estabeleceu que no mínimo 16 lesões para cada grupo seria adequado para um resultado cientificamente válido.

O cálculo amostral para hBD-3 foi realizado tendo como base os resultados do trabalho de Frederic et al. (2008). O poder da amostra foi calculado levando em consideração a média e o desvio padrão dos grupos avaliados, sendo obtido o valor do erro β de 0,80 e poder do teste de 84%, que estabeleceu a necessidade de, no mínimo, 9 lesões para cada grupo.

3.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Para a amostra de dentes decíduos, 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. Os responsáveis pelos pacientes foram informados a respeito do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e um termo de assentimento (Apêndices A e B), autorizando a participação na pesquisa. Foram selecionados dentes decíduos (primeiros e segundos molares decíduos, superiores e inferiores) com indicação de exodontia.

Para a amostra de dentes permanentes, foram selecionados pacientes que compareceram às Clínicas da FORP/USP, para tratamento odontológico, de ambos os sexos, com faixa etária de 20 a 60 anos de idade, com boa saúde geral. Os pacientes foram informados a respeito do estudo e assinaram um termo de consentimento livre

e esclarecido (Apêndice A), autorizando sua participação na pesquisa. Foram selecionados dentes permanentes (primeiros e segundos molares e pré-molares, superiores e inferiores) com indicação de exodontia.

Os participantes da pesquisa não deveriam ter sido submetidos à antibioticoterapia há pelo menos três meses. Os dentes selecionados (decíduos e permanentes) apresentaram 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 ficha específica. Os dentes selecionados deveriam apresentar lesões periapicais com extensão de tecido que possibilitasse a realização da técnica de imunohistoquímica.

3.2 ETAPA CIRÚRGICA

Após a antissepsia 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 – RJ). A seguir, foi efetuada a sindesmotomia, luxação, extração com elevadores ou fórceps e sutura. Após extração, foi realizada a lavagem 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 bisturí lâmina 15.

O tecido removido (dente e lesão) 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 preenchida, contendo informações referentes às características e localização da lesão.

3.3 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,

os quais foram montados em lâminas diferentes. Um dos cortes foi corado pela Hematoxilina e Eosina e, no Laboratório de Histopatologia, foi realizada a análise histopatológica e emissão do laudo por um patologista experiente. Os casos com diagnóstico histopatológico de cisto radicular foram incluídos no presente estudo. Foi entregue uma cópia do referido laudo ao paciente/responsável e a outra cópia foi anexada ao prontuário.

Cortes sequenciais de cada espécime 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; Bertasso et al., 2020).

A tabela 1 apresenta o peptídeo antimicrobiano e os tipos celulares avaliados, com as respectivas imunomarcações (fenótipos).

Tabela 1 - Tipos celulares e peptídeo antimicrobiano (AMP) avaliados e as respectivas imunomarcações

Células e AMP	Imunomarcação
Mastócitos	Triptase+
Células Dendríticas Plasmocitóides Maduras	CD123+
Células Dendríticas Plasmocitóides Imaturas	CD303+
Linfócitos T regulatórios (TREGS) Imaturos	CD25+
Linfócitos T regulatórios (TREGS) Maduros	FOXP3+
Linfócitos T	CD3+
Linfócitos T citotóxicos	CD8+
Linfócitos B	CD20+
Beta-defensina-3	hBD-3+

3.4 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Os cortes foram desparafinados e submersos em xilol por 20 minutos (foi 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 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 atingiram a temperatura

ambiente, foram enxaguados com 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 (foi 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 biotilado (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 Carazzi, durante 2 minutos, e a diferenciação da hematoxilina por meio de 20 trocas de água corrente, seguida da desidratação em álcool absoluto (3 trocas), diafanização em xilol e montagem em Entellan.

Como controle negativo foi efetuada a omissão do anticorpo primário. Foram obtidos controles positivos para todos os anticorpos (Tabela 2).

A tabela 2 apresenta as especificações dos anticorpos primários que foram utilizados, para identificação dos diferentes tipos celulares, e os respectivos controles positivos.

Tabela 2 - Especificações dos anticorpos primários a serem utilizados

Biomarcador	Clone	Descrição	Isotipo	Diluição	Marca	Célula	Controle Positivo
Triptase	AA1	Monoclonal Rato	IgG1	1:5000	DakoCytomation	Mastócitos	Tonsilas
CD303	124B3.13	Monoclonal Rato	IgG1	1:500	Dendritics	Células Dendríticas	Tonsilas
CD123	BR4MS	Monoclonal Rato	IgG2b	1:200	Leica Biosystems	Células Dendríticas	Tonsilas
CD25	B1.49.9	Monoclonal Rato	IgG2a	1:400	Beckman Coulter	TREGS	Tonsilas
FOXP3	SP97	Monoclonal Coelho	IgG Coelho	1:300	Spring Bioscience	TREGS	Tonsilas
CD3	A0452	Policlonal Coelho	IGg1	1:500	DakoCytomation	Linfócitos T	Tonsilas
CD8	C8/144B	Monoclonal Rato	IGg	1:400	DakoCytomation	Linfócitos T	Tonsilas
CD20	L26	Monoclonal Rato	IgG	1:2000	DakoCytomation	Linfócitos B	Tonsilas
hBD-3	23-67/67	Policlonal Coelho	IgG	1:400	Bioss	Beta-defensina-3	Pulmão, Cólon e Tonsilas

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 e 400x, conforme preconizado por Gonçalves et al. (2012) e Bertasso et al. (2020).

PARTE 1 - ANÁLISE DA PRESENÇA/AUSÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DOS TIPOS CELULARES DA RESPOSTA IMUNE E INFLAMATÓRIA

Para essa análise foram utilizados 19 casos de cistos radiculares de dentes decíduos e 17 casos de cistos de dentes permanentes.

No aumento de 400x foram escolhidos 5 campos representativos de cada espécime, para registro da presença/ausência de imunomarcagem e posterior quantificação do número de células imunomarcadas, empregando o software Image J 1.28.

Inicialmente, cada lâmina foi avaliada com relação à presença/ausência de cada tipo celular (mastócitos, células dendríticas plasmocitóides, linfócitos T citotóxicos, TREGS, Linfócitos T e Linfócitos B) e, em seguida, foi efetuada a contagem do número de células positivas em cada campo, sendo a seguir obtida a média.

Os resultados foram expressos em números de células de cada tipo celular, por espécime.

PARTE 2 - ANÁLISE DA PRESENÇA/AUSÊNCIA E LOCALIZAÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO (HBD-3) E SUA RELAÇÃO COM O TAMANHO DA LESÃO RADIOGRÁFICA

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Dos casos iniciais, efetuou-se a análise imunohistoquímica para hBD-3 em 14 casos de dentes decíduos e 13 casos de dentes permanentes.

No aumento de 400x foram escolhidos 5 campos representativos de cada espécime, para registro da presença/ausência de imunomarcção e posterior análise semi-quantitativa, empregando o software Image J 1.28 (National Same patterns of Health, Betheseda, California, EUA).

Em cada lâmina, a análise da presença/ausência de imunomarcção para hBD-3 foi realizada separadamente em dois locais distintos: na cápsula cística e no epitélio cístico. Em seguida, foi realizada a análise semi-quantitativa da imunomarcção nesses dois locais, com base nos seguintes critérios (Gonçalves et al., 2012):

- Escore 0: ausência de expressão.
- Escore 1: expressão de intensidade suave.
- Escore 2: expressão de intensidade moderada.
- Escore 3: expressão intensa.

Adicionalmente, foi realizada análise subjetiva da porcentagem de área com imunomarcção positiva para hBD-3 em cada espécime (Folkvord et al., 2006). Os resultados foram expressos como a média das porcentagens obtidas na cápsula e no epitélio cístico, em cada espécime.

EXAME RADIOGRÁFICO

As radiografias periapicais de cada caso, realizadas pela técnica digital (Vistascan Perio Plus, Porto Alegre, Brasil), foram obtidas por meio de consulta ao Sistema Romeu (Sistema de Informatização de Clínicas da FORP/USP). As radiografias realizadas pelo método convencional foram obtidas por meio de consulta ao prontuário físico dos pacientes sendo, a seguir, digitalizadas (Flatbed scan-ner -

Scanjet 7450 c series, version 3.0.2, Hewlett- Packard, San Diego, Calif., USA), com 1.200 dpi de resolução.

MENSURAÇÃO DO TAMANHO RADIOGRÁFICO DAS LESÕES PERIAPICAIS

As imagens radiográficas foram transferidas para o programa Image J 1.28, para mensuração das áreas radiolúcidas periapicais, tanto nos dentes decíduos como nos dentes permanentes, como descrito previamente (da Silva et al., 2008; de Queiroz et al., 2016). A delimitação e a medida da área radiolúcida presente em cada raiz foi determinada em mm². As avaliações radiográficas foram realizadas por 3 examinadores calibrados (Kappa>0,8). Com o objetivo de calibrar o programa, foi realizada a medida do tamanho real de cada raiz, nas lâminas contendo os cortes histológicos.

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O TAMANHO RADIOGRÁFICO DAS LESÕES PERIAPICAIS E A PORCENTAGEM DAS ÁREAS DE IMUNOMARCAÇÃO PARA HBD-3

Após as mensurações, as lesões periapicais foram divididas em dois grupos:

- Lesões pequenas (0-30mm²); e
- Lesões grandes (>30mm²).

Em seguida, foi realizada a avaliação da relação entre o tamanho radiográfico da lesão, em mm², e a porcentagem de área com imunomarcação positiva para hBD-3 em cada espécime, nas lesões pequenas e grandes, tanto para dentes decíduos quanto para dentes permanentes.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, a distribuição dos dados obtidos foi verificada por meio do teste de normalidade D'Agostino & Pearson. Quando a distribuição dos dados foi não paramétrica, os resultados obtidos foram comparados por meio do teste de Mann-Whitney. Nos casos de distribuição paramétrica dos dados, a comparação foi realizada utilizando o teste t. Além disso, para as análises das células inflamatórias foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn.

Para todas as análises, foi utilizado o programa Graph Pad Prism 9.0 (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, EUA). O nível de significância adotado foi de 5%.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

PARTE 1 - ANÁLISE DA PRESENÇA/AUSÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DOS TIPOS CELULARES DA RESPOSTA IMUNE E INFLAMATÓRIA

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Dos 19 casos de cistos radiculares de dentes decíduos analisados, 36,8% eram de indivíduos do sexo feminino e 63,2% de indivíduos do sexo masculino, com idade média de 6,3 anos. Além disso, 63,2% dos cistos radiculares de dentes decíduos estavam localizados na mandíbula e 36,8% na maxila.

Dos 17 casos de cistos de dentes permanentes, 58,8% eram de indivíduos do sexo feminino e 41,2% eram de indivíduos do sexo masculino, com idade média de 51,4 anos. Um total de 70,6% dos cistos radiculares de dentes permanentes encontrava-se na mandíbula e 29,4% 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
Decíduos	19	36,8%	63,2%	63,2%	36,8%	6,3
Permanentes	17	58,8%	41,2%	70,6%	29,4%	51,4

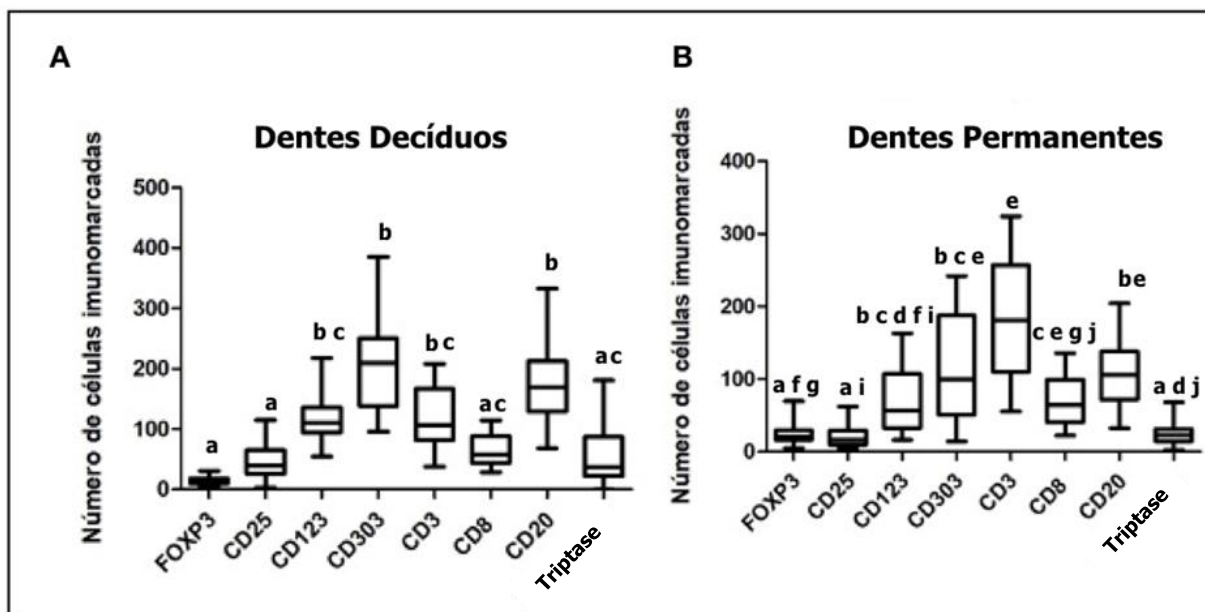
ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

A análise imunohistoquímica evidenciou imunomarcção para Triptase (Mastócitos), CD123 e CD303 (Células Dendríticas Plasmocitóides), FOXP3 e CD25 (Linfócitos - TREGS), CD3 (Linfócitos T), CD8 (Linfócitos T Citotóxicos) e CD20 (Linfócitos B) em todos os casos (100%), nos dentes decíduos e permanentes.

As células mais prevalentes nos cistos radiculares em dentes decíduos foram as células dendríticas plasmocitóides maduras (CD123+) e imaturas (CD303+), linfócitos T (CD3+) e os linfócitos B (CD20+) ($p < 0,05$). Por outro lado, nos dentes permanentes as células mais prevalentes foram os linfócitos T (CD3+), células dendríticas plasmocitóides imaturas (CD303+), linfócitos T citotóxicos (CD8+) e linfócitos B (CD20+) ($p < 0,05$).

A Figura 1 apresenta a comparação da quantidade de células, por meio do teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, para Triptase, FOXP3, CD25, CD123, CD303, CD3, CD8 e CD20.

Figura 1 – Comparação por meio do teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, da quantidade de células imunomarcadas para Triptase, FOXP3, CD25, CD123, CD303, CD3, CD8 e CD20, após avaliação imunohistoquímica, em cistos radiculares de dentes decíduos (A) e permanentes (B). Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0,05$)



MASTÓCITOS

Ao comparar o número de células imunomarcadas para Mastócitos (Triptase) em dentes decíduos e permanentes, observou-se que os dentes decíduos apresentaram mediana de 34,15 células (Q1=18,14; Q3=73,89), enquanto que os dentes permanentes apresentaram mediana de 22,65 células (Q1=14,63; Q3=31,15). Apesar da diferença numérica entre os grupos, não foi possível encontrar diferença estatisticamente significante entre a quantidade de Mastócitos em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes ($p=0,119$) (Figuras 2 e 3).

Figura 2 - Comparação da quantidade de Mastócitos (células imunomarcadas para Triptase), após avaliação imunohistoquímica, em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

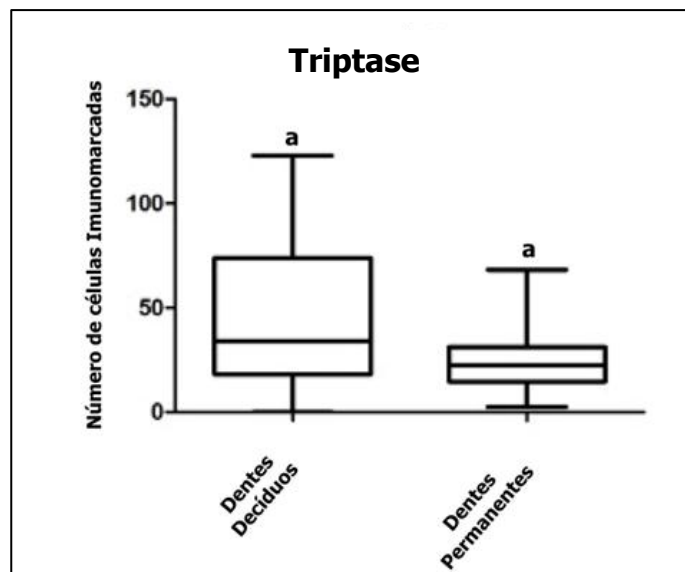
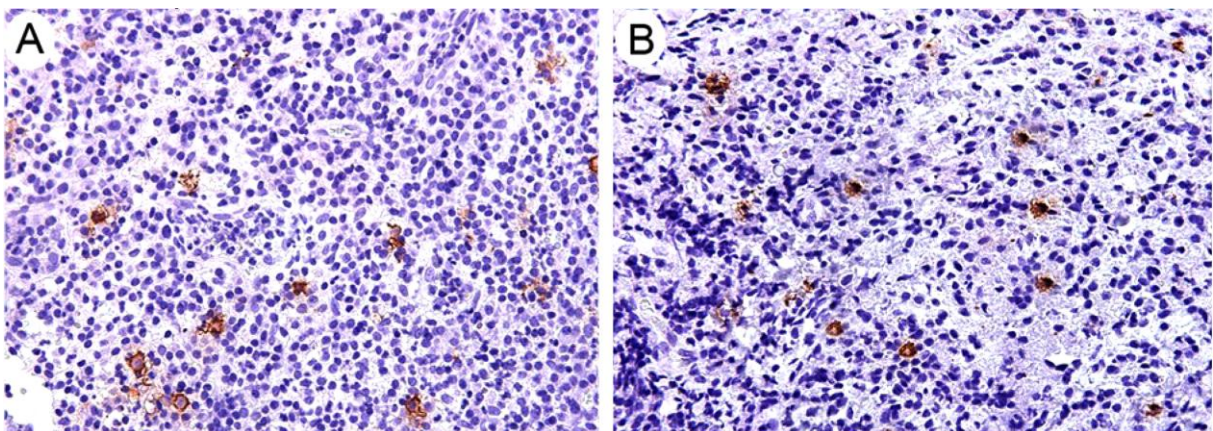


Figura 3 - Fotomicrografias representativas dos grupos avaliados, evidenciando a imunomarcção para Mastócitos (células imunomarcadas para Triptase) nos cistos radiculares de dentes decíduos (A) e permanentes (B) (Zeiss, 40X)



CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMOCITÓIDES

Com relação ao número de células dendríticas plasmocitóides, evidenciadas por meio do marcador CD123, verificou-se que os dentes decíduos apresentaram mediana de células imunomarcadas de 110,8 (Q1=94,0; Q3=135,8), enquanto que esse valor foi de 57,0 (Q1=32,38; Q3=107,2) nos dentes permanentes. A diferença entre esses 2 grupos foi estatisticamente significativa ($p=0,008$), ou seja, os cistos radiculares de dentes decíduos apresentaram números significativamente maiores de Células Dendríticas Plasmocitóides, em comparação aos dentes permanentes.

O número de células dendríticas plasmocitóides também foi avaliado por meio da análise do marcador CD303 (células dendríticas imaturas). Os cistos dos dentes decíduos apresentaram média de células imunomarcadas de 208,6 (dp = 84,63), enquanto os cistos dos dentes permanentes apresentaram média de células imunomarcadas de 115,4 (dp = 72,12). Assim, observou-se que as médias de células dendríticas plasmocitóides em dentes decíduos também foram significativamente maiores, quando comparadas às médias obtidas para os dentes permanentes ($p=0,001$) (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Comparação da quantidade de células dendríticas plasmocitóides imunomarcadas para CD123 (A) e para CD303 (B), após avaliação imunohistoquímica em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$)

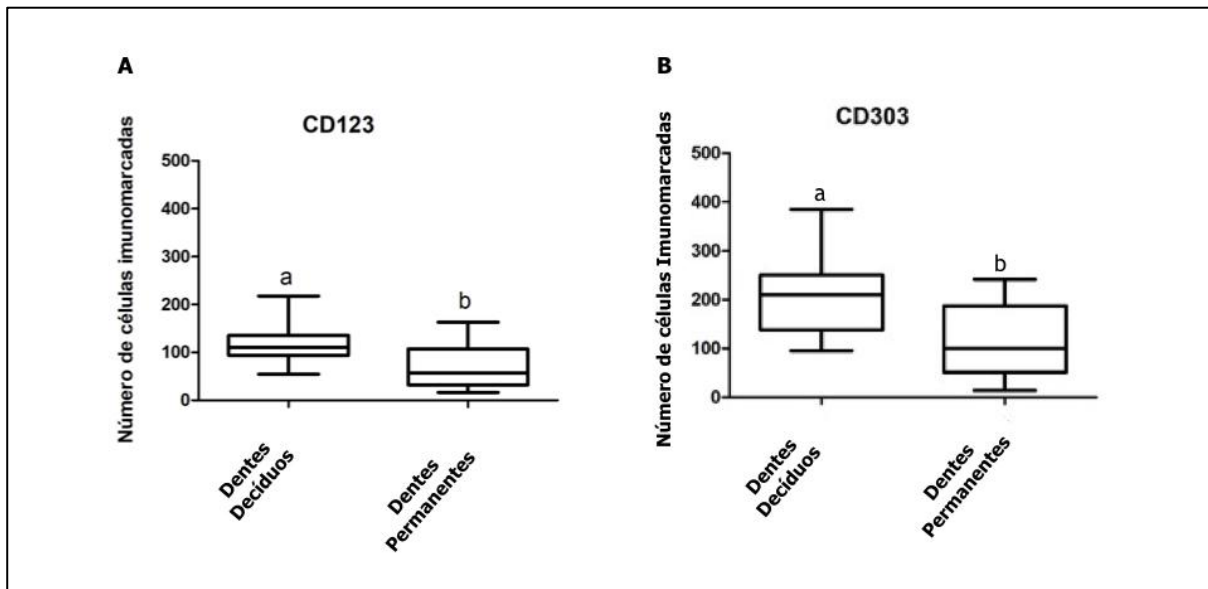
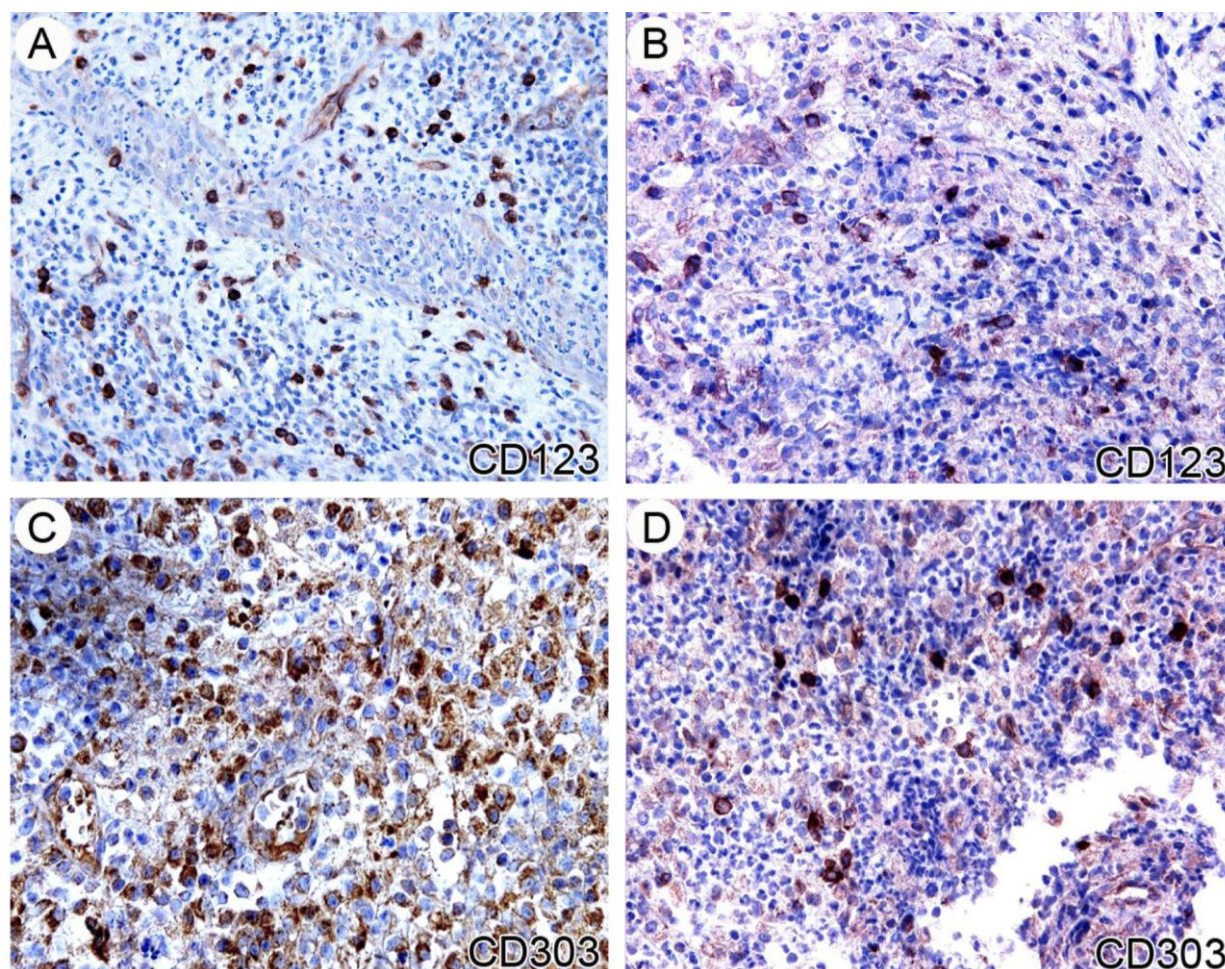


Figura 5 - Células Dendríticas Plasmocitóides: Fotomicrografias representativas dos grupos avaliados, evidenciando a imunomarcção para CD123 (A e B) e para CD303 (C e D) nos cistos radiculares de dentes decíduos (A e C) e permanentes (B e D) (Zeiss, 40X)



LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS

Ao avaliar o número de Linfócitos T regulatórios por meio do marcador FOXP3 (TREGS – maduros), verificou-se que os dentes decíduos apresentaram média de células imunomarcadas de 14,88 (dp = 6,58), enquanto que os dentes permanentes apresentaram média de 20,56 (dp = 9,12). A análise estatística desses dados evidenciou que a quantidade de Linfócitos T regulatórios maduros (FOXP3) em dentes permanentes foi significativamente maior, em comparação aos dentes decíduos ($p=0,04$) (Figuras 6 e 7).

Por outro lado, ao comparar o número de Linfócitos T regulatórios (CD25) (TREGS imaturos), evidenciou-se um valor médio de 45,54 (dp = 27,27) nos dentes decíduos e de 22,26 (dp = 17,75) nos dentes permanentes. A média de Linfócitos T regulatórios (CD25) em dentes decíduos foi estatisticamente maior, em comparação ao valor obtido para os dentes permanentes ($p=0,011$) (Figuras 6 e 7).

Figura 6 - Comparação da quantidade de Linfócitos T regulatórios imunomarcados para FOXP3 (A) e CD25 (B), após avaliação imunohistoquímica, em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

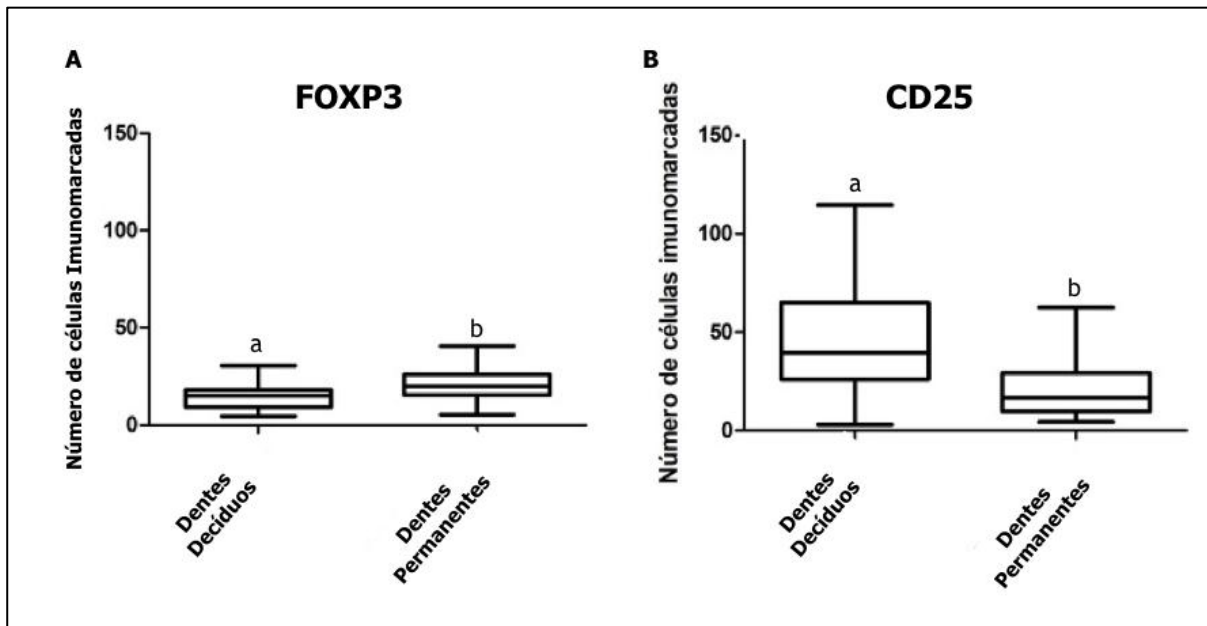
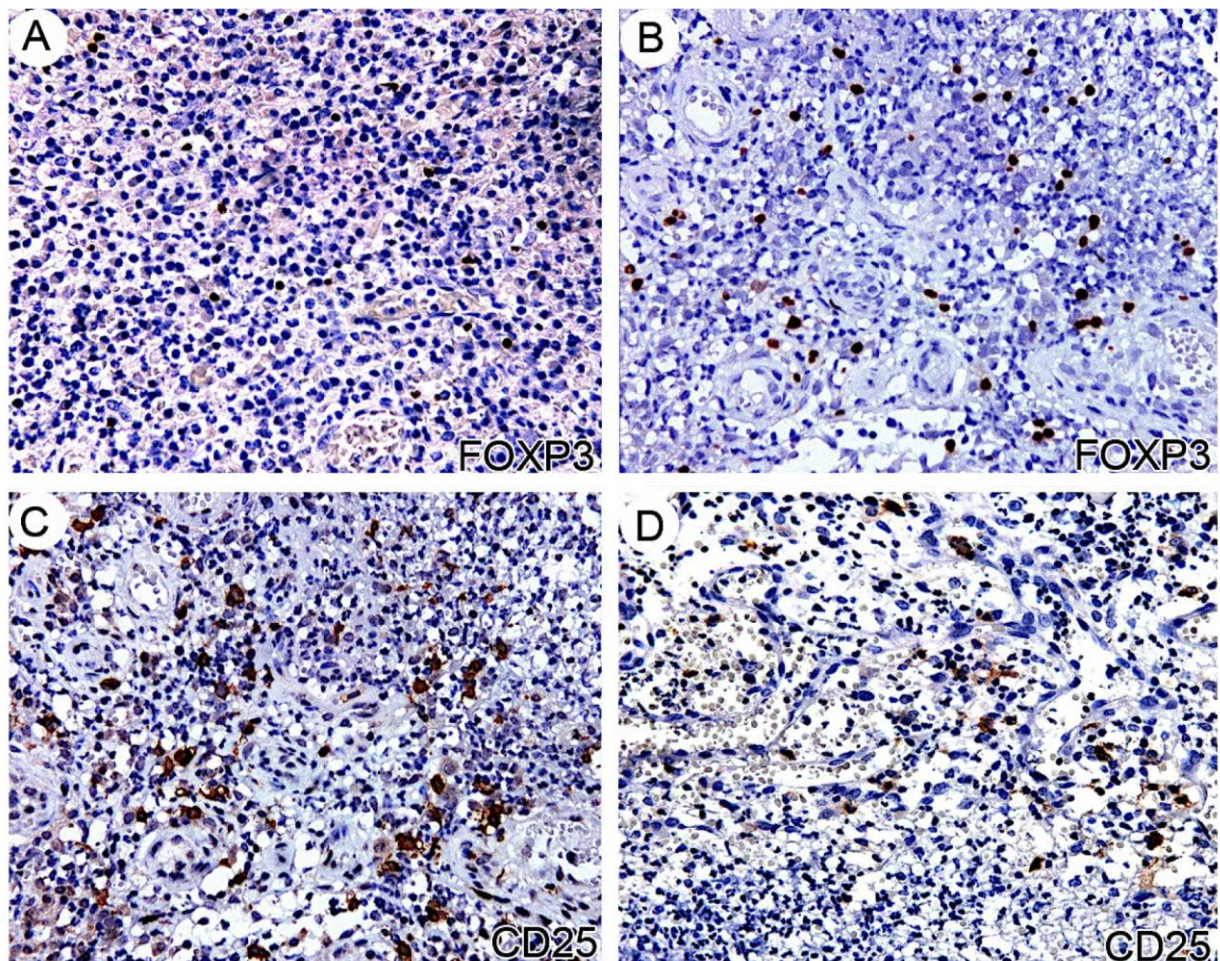


Figura 7 - Linfócitos T regulatórios: Fotomicrografias representativas dos grupos avaliados, evidenciando a imunomarcção para FOXP3 (A e B) e para CD25 (C e D) nos cistos radiculares de dentes decíduos (A e C) e permanentes (B e D) (Zeiss, 40X)



LINFÓCITOS T

A avaliação do número de Linfócitos T (CD3) evidenciou que os cistos radiculares dentes decíduos apresentaram mediana de células imunomarcadas de 114,0 (Q1=86,0; Q3=172,8), enquanto nos dentes permanentes esse valor foi de 181,3 (Q1=110,0; Q3=256,8), com diferença significativa ($p=0044$). Portanto, a mediana de Linfócitos T em dentes permanentes foi significativamente maior que em dentes decíduos (Figuras 8 e 9).

LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS

Ao comparar o número de Linfócitos T citotóxicos (CD8), observou-se um valor médio de células imunomarcadas de 61,82 (dp = 24,47) para os dentes decíduos e de 70,29 (dp = 36,08) para os dentes permanentes. Não foi possível

evidenciar diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de Linfócitos T citotóxicos em cistos de dentes decíduos e permanentes ($p=0,411$) (Figuras 8 e 9).

Figura 8 - Linfócitos T e Linfócitos T citotóxicos: Comparação da quantidade de células imunomarcadas para CD3 (A) e para CD8 (B), após avaliação imunohistoquímica, em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$)

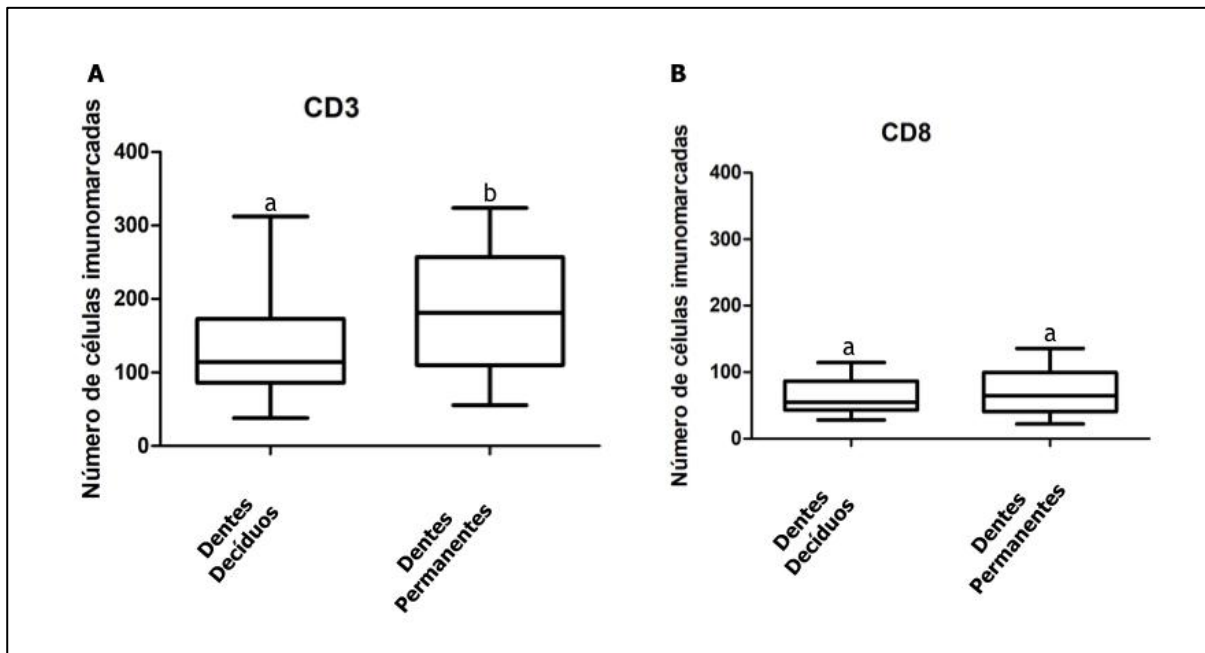
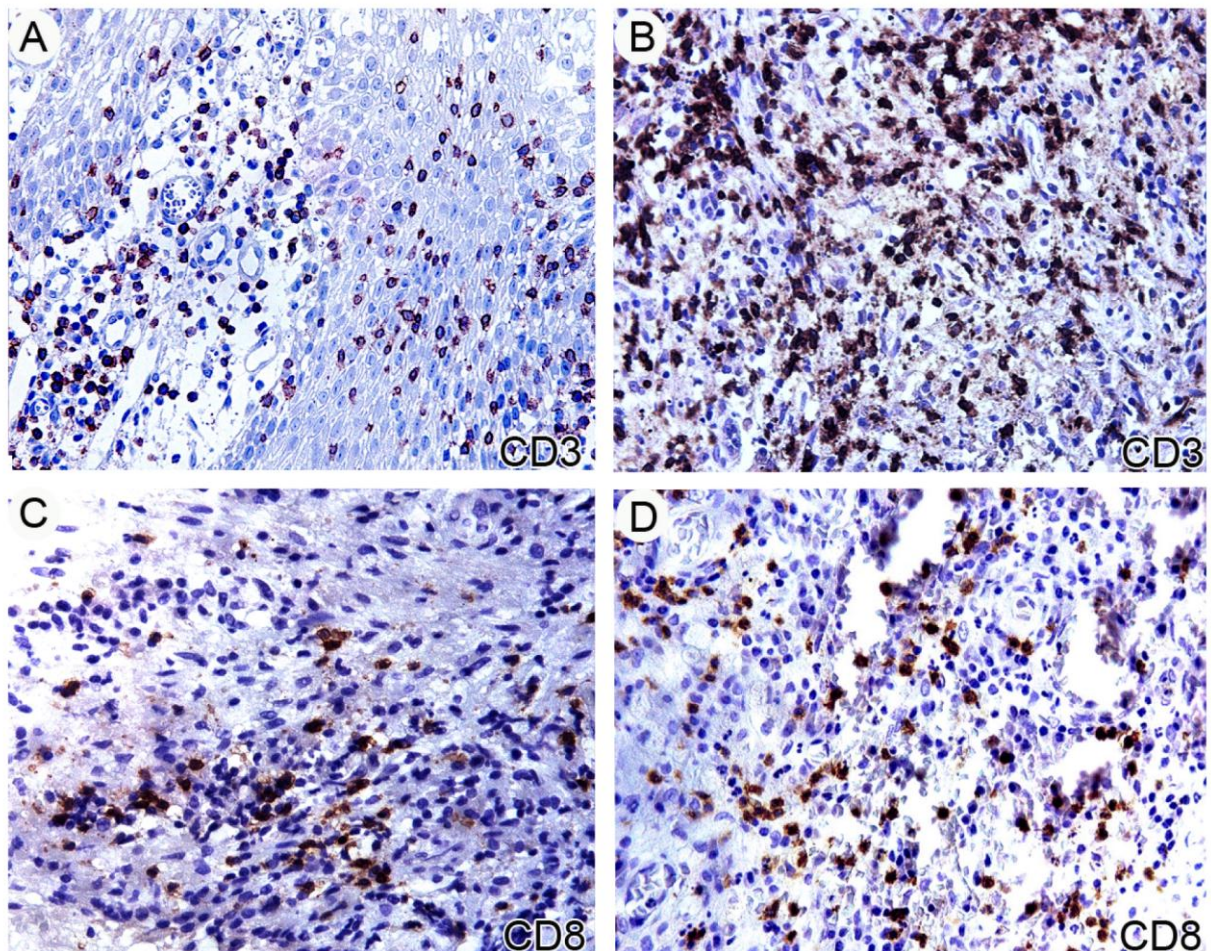


Figura 9 - Linfócitos T e Linfócitos T citotóxicos: Fotomicrografias representativas dos grupos avaliados, evidenciando a imunomarcção para CD3 (A e B) e para CD8 (C e D) nos cistos radiculares de dentes decíduos (A e C) e permanentes (B e D) (Zeiss, 40X)



LINFÓCITOS B

Com relação ao número de Linfócitos B (CD20), evidenciou-se média de células imunomarcadas de 172,0 (dp = 75,68) para os dentes decíduos e de 106,3 (dp = 44,34) para os dentes permanentes. A análise estatística desses dados evidenciou que o número de Linfócitos B, em cistos de dentes decíduos, foi significativamente maior, em comparação aos dentes permanentes ($p=0,0024$) (Figuras 10 e 11).

Figura 10 - Comparação da quantidade de Linfócitos B (CD20), após avaliação imunohistoquímica, em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

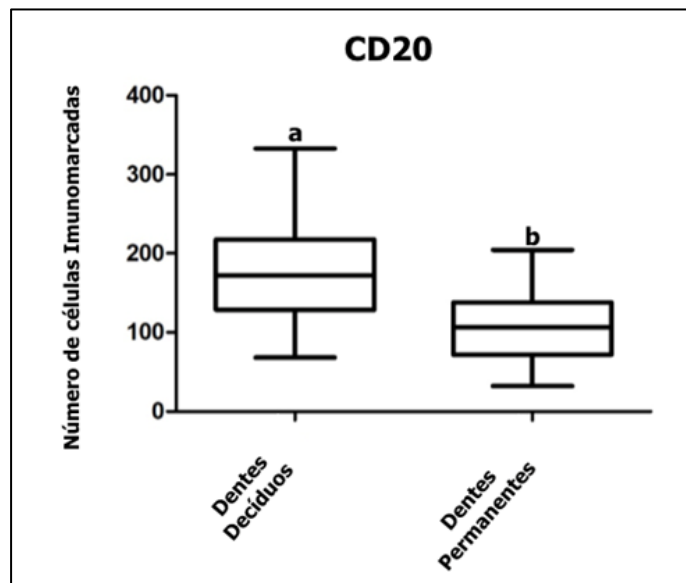
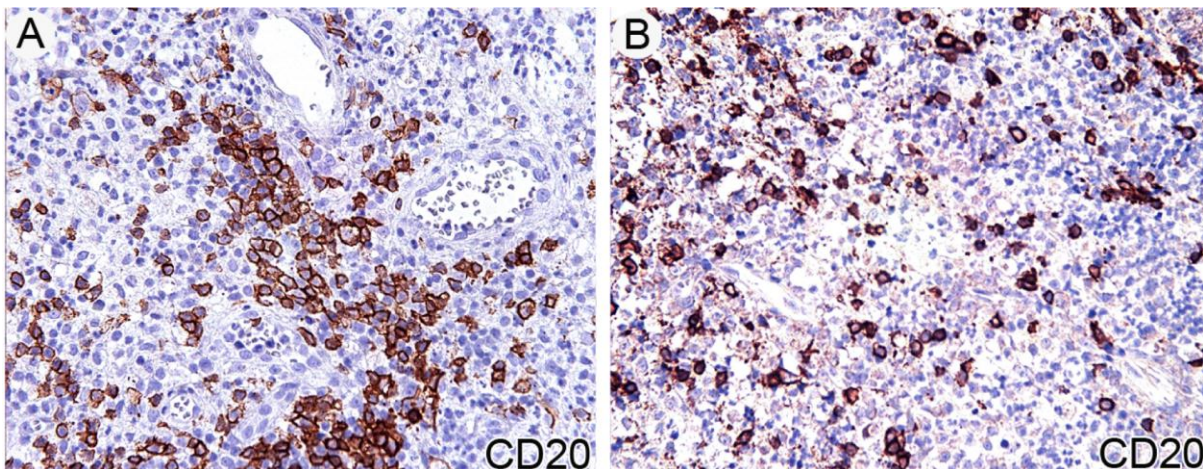


Figura 11 - Linfócitos B: Fotomicrografias representativas dos grupos avaliados, evidenciando a imunomarcação para CD20 nos cistos radiculares de dentes decíduos (A) e permanentes (B) (Zeiss, 40X)



PARTE 2 - ANÁLISE DA PRESENÇA/AUSÊNCIA E LOCALIZAÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO (HBD-3) E SUA RELAÇÃO COM O TAMANHO DA LESÃO RADIOGRÁFICA

Nos 14 casos de dentes decíduos analisados, observou-se marcação positiva para hBD3 em 11 (78,5%). De forma semelhante, nos 13 dentes permanentes observou-se marcação positiva em 10 (76,9%).

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Dos 11 casos de cistos radiculares de dentes decíduos com marcação positiva para hBD3, 36,4% eram de indivíduos do sexo feminino e 63,6% de indivíduos do sexo masculino, com idade média de 6,1 anos. Além disso, 72,7% dos cistos radiculares de dentes decíduos estavam localizados na mandíbula e 27,3% na maxila.

Dos 10 casos de cistos de dentes permanentes com marcação positiva para hBD3, 60% eram de indivíduos do sexo feminino e 40% eram de indivíduos do sexo masculino, com idade média de 38,6 anos. Um total de 60% dos cistos radiculares de dentes permanentes encontrava-se na mandíbula e 40% na maxila.

A Tabela 4 apresenta a caracterização da amostra utilizada no presente estudo.

Tabela 4 - Caracterização da amostra

Dentes	Total	Gênero		Localização		Idade
		Feminino	Masculino	Mandíbula	Maxila	Média
Decíduos	11	36,4%	63,6%	72,7%	27,3%	6,1
Permanentes	10	60%	40%	60%	40%	38,6

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA – ESCORES DE INTENSIDADE DE MARCAÇÃO

No epitélio cístico dos dentes decíduos foi encontrada a seguinte distribuição da intensidade de marcação para hBD3: 1 caso apresentou escore 0; 4 escore 1; 5 escore 2; e 1 escore 3.

Na cápsula cística dos dentes decíduos, a distribuição ocorreu da seguinte forma: 2 casos apresentaram escore 0; 2 escore 1; 6 escore 2; e 1 escore 3.

No epitélio cístico dos dentes permanentes foi encontrada a seguinte distribuição de intensidade de marcação para hBD3: 2 casos apresentaram escore 0; 6 escore 1; e 2 escore 2.

Na cápsula cística dos dentes permanentes, a distribuição ocorreu da seguinte forma: 2 casos apresentaram escore 0; 2 escore 1; e 8 escore 2.

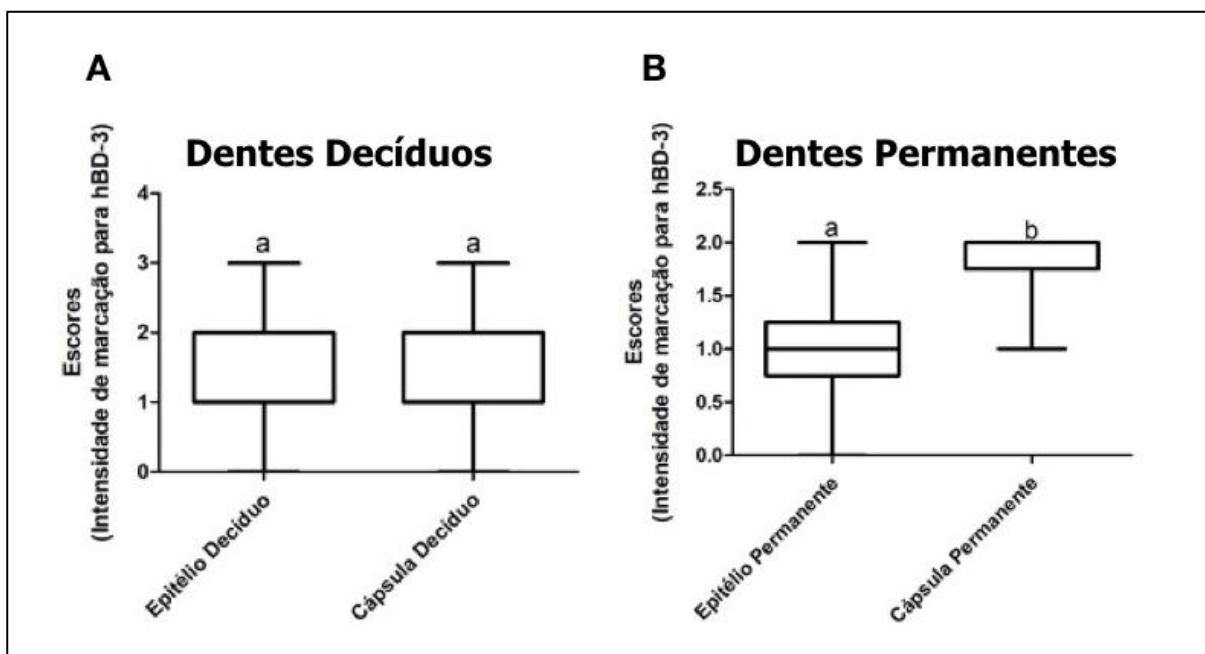
A Tabela 5 apresenta a distribuição dos escores (intensidade de marcação) para hBD-3 na cápsula e no epitélio cístico de dentes decíduos e permanentes.

Tabela 5 - Distribuição dos escores (intensidade de marcação) para hBD-3 na cápsula e no epitélio de cistos de dentes decíduos e permanentes

Escore	Total	0		1		2		3	
		Cápsula	Epitélio	Cápsula	Epitélio	Cápsula	Epitélio	Cápsula	Epitélio
Dentes Decíduos	11	2	1	2	4	6	5	1	1
Dentes Permanentes	10	0	2	2	6	8	2	0	0

A intensidade (escores) de marcação para hBD3 no epitélio e na cápsula cística nos dentes decíduos foi comparada e evidenciou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,91$).

Por outro lado, nos dentes permanentes, a comparação da intensidade (escores) de marcação para hBD-3 no epitélio e na cápsula cística evidenciou que houve maior imunomarcação na cápsula ($p=0,008$) (Figura 12).

Figura 12 - Intensidade (escores) de marcação para hBD-3 no epitélio e na cápsula, após a avaliação imunohistoquímica, em cistos radiculares de dentes decíduos (A) e permanentes (B). Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$)

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O TAMANHO RADIOGRÁFICO DAS LESÕES PERIAPICAIS E A PORCENTAGEM DAS ÁREAS DE IMUNOMARCAÇÃO PARA hBD-3

Os dados obtidos nos dentes decíduos e permanentes foram expressos radiograficamente em área (mm²) e pela imunohistoquímica em porcentagem de áreas de imunomarcação para hBD-3 (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribui o das áreas da lesão periapical (mm²) e das porcentagens de áreas de imunomarca o para hBD-3, após a avalia o radiográfica e imunohistoquímica dos cistos radiculares de dentes decíduos (A) e permanentes (B)

Casos Dentes Dec�duos	�rea (mm²)	Porcentagem da �rea de imunomarca�o para hBD-3	Casos Dentes Permanentes	�rea (mm²)	Porcentagem da �rea de imunomarca�o para hBD-3
1	7,9	85%	1	18,2	80%
2	9,4	70%	2	19,2	80%
3	12,7	90%	3	8,9	35%
4	22,9	90%	4	27,8	20%
5	29,1	80%	5	27,8	65%
6	33,4	80%	6	48	100%
7	42,1	15%	7	80	55%
8	45,5	65%	8	150,3	15%
9	58,4	25%	9	160	20%
10	65,5	55%	10	358,6	58%
11	184,8	5%			

Como já relatado, para fins estatísticos os casos de cistos radiculares de dentes decíduos e de dentes permanentes foram divididos radiograficamente em dois grupos: lesões pequenas (0-30mm²) e lesões grandes (>30mm²).

Nos dentes decíduos, foi possível concluir que as lesões pequenas apresentaram mediana de células imunomarcadas de 82,50 (Q1=77,50; Q3=90,00), enquanto esse valor foi de 25,00 (Q1=10,00; Q3=60,00) nas lesões grandes, sendo estatisticamente significativa (p=0,0078).

Nos dentes permanentes, foi possível observar que as lesões pequenas apresentaram mediana de células imunomarcadas de 65,00 (Q1=27,50; Q3=80,00), enquanto esse valor foi de 55,00 (Q1=17,50; Q3=78,75) nas lesões grandes, não apresentando diferença estatisticamente significativa (p=0,599) (Figuras 13 e 14).

Figura 13 - Porcentagem da área de imunomarcção para hBD-3 nas lesões pequenas ($0-30\text{mm}^2$) e nas lesões grandes ($>30\text{mm}^2$), após a avaliação imunohistoquímica e radiográfica, em cistos radiculares de dentes decíduos (A) e permanentes (B). Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

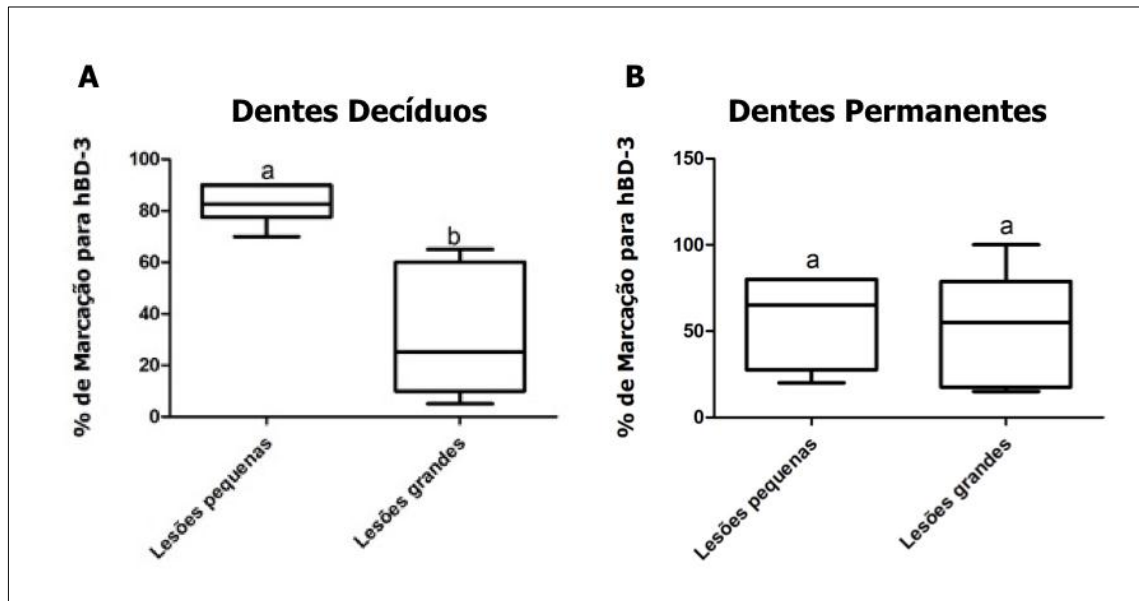
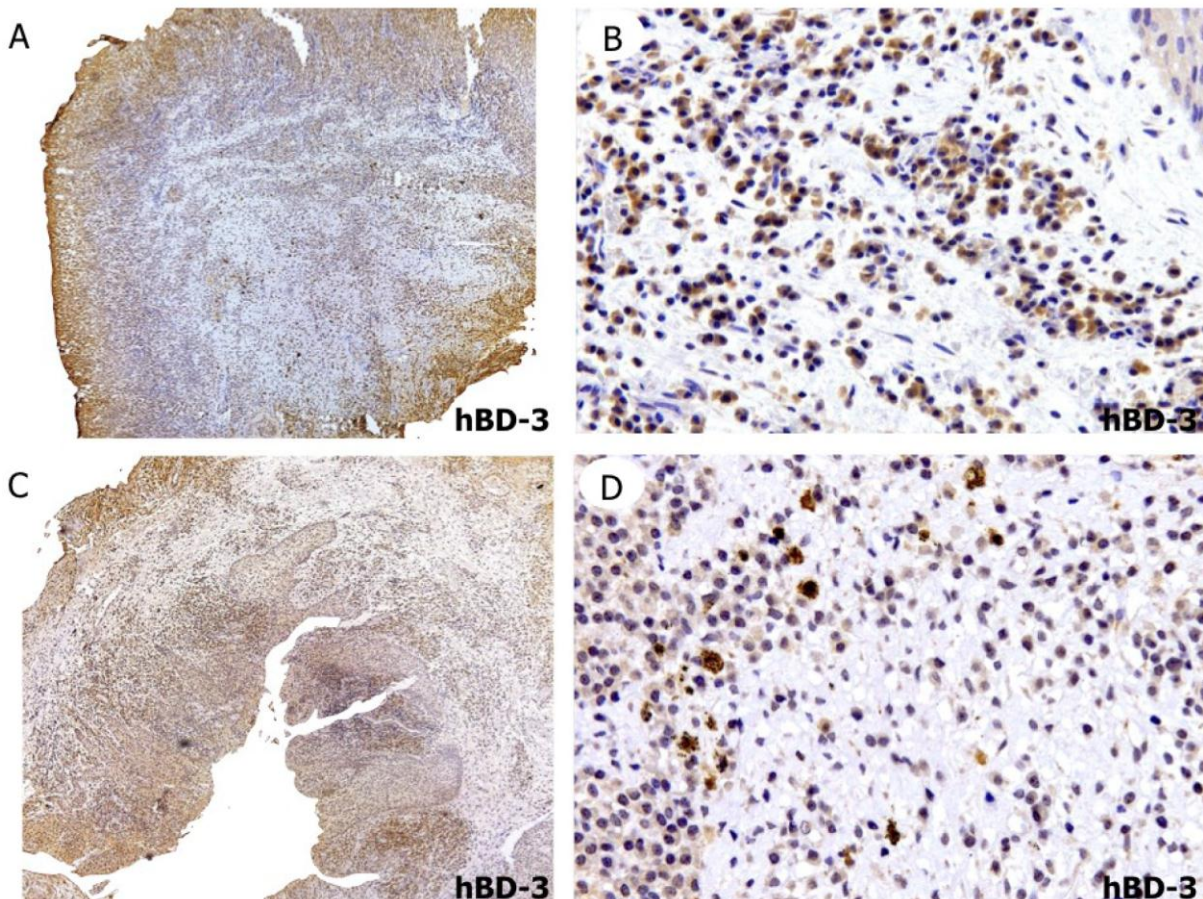


Figura 14 - Fotomicrografias representativas dos grupos avaliados, evidenciando a imunomarcção para hBD-3 (A, B, C e D) nos cistos radiculares de dentes decíduos (A e B) e permanentes (C e D) (Zeiss, 40X)



5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

DA ANÁLISE DA PRESENÇA/AUSÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DOS TIPOS CELULARES DA RESPOSTA IMUNE E INFLAMATÓRIA

A lesão periapical se inicia quando os micro-organismos, seus produtos/subprodutos e os mediadores inflamatórios ultrapassam o forame apical, atingindo os tecidos circundantes (Altaie et al., 2021). Assim, inicia-se um processo infeccioso, inflamatório, imunológico e osteolítico na região apical e periapical, no qual as respostas imunes e inflamatórias são ativadas (Cavalla et al., 2021), com reabsorção dos tecidos mineralizados (Wang et al., 2022). Nesse processo, a resposta imune inata e adaptativa desempenha um papel importante, recrutando células imunes e inflamatórias para o local da infecção (Lee et al., 2021). Paralelamente, os altos níveis de endotoxina bacteriana encontrados em lesões periapicais de dentes decíduos (Leonardo et al., 2004; de Queiroz et al., 2016) e permanentes (Silva et al., 2002; Nelson-Filho et al., 2002) podem induzir um efeito proliferativo nas células epiteliais, originando cistos radiculares (Meghji et al., 1996).

Para a realização do presente estudo foram selecionados cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes, pela facilidade de obtenção das amostras. Couto et al. (2021) avaliaram histopatologicamente 10.381 lesões periapicais crônicas, em dentes permanentes, observando que os cistos radiculares foram as lesões mais comuns (59,9% dos casos). Além disso, de acordo com Mass et al. (1995) e Yang et al. (2018), os cistos radiculares também são lesões frequentes em dentes decíduos.

Sabe-se que a formação, o desenvolvimento e a perpetuação das lesões periapicais crônicas ocorre devido à ação de vários tipos celulares e mediadores químicos, que resulta no possível equilíbrio entre os processos de proteção e destruição dos tecidos. Devido ao fluxo contínuo de micro-organismos e seus produtos do canal radicular infectado, a lesão geralmente não é autolimitante, apesar dos potentes mecanismos de defesa do hospedeiro (Bystrom et al., 1987; Orstavik et al., 1996; Márton e Kiss, 2000).

No presente estudo, os diferentes tipos celulares (mastócitos, células dendríticas plasmocitóides, linfócitos T regulatórios, Linfócitos T, Linfócitos T citotóxicos e linfócitos B) foram avaliados em diferentes cortes histológicos

sequenciais (seriados) de cada espécime. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que todos os tipos celulares avaliados foram identificados em 100% dos cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes, atuando de forma conjunta para combater o agente agressor. Como salientado por Teixeira et al., em 2022, essas células produzem um ambiente complexo, inclusive com produção de citocinas, envolvidas na etiologia das lesões periapicais.

Segundo a Sociedade Brasileira de Pediatria (2021), o sistema imunológico está em constante desenvolvimento, desde a concepção até a idade adulta, sendo um processo contínuo. Nos primeiros anos de vida, a resposta imediata, ou seja, aquela realizada pelas células da imunidade inata, é essencial para manutenção da saúde geral da criança, visto que a imunidade adaptativa ainda se encontra em desenvolvimento. Os resultados do presente estudo corroboram essa afirmativa, uma vez que as células mais prevalentes nos cistos radiculares de dentes decíduos, numericamente, foram as células dendríticas plasmocitóides imaturas (células da resposta imune inata), enquanto que para os dentes permanentes foram os linfócitos T (células da resposta imune adaptativa).

Dentre as células do sistema imune inato, as células dendríticas se destacam, uma vez que apresentam importantes funções nas reações imunes mediadas por células, bem como na patogênese das lesões periapicais (Santos et al., 2007; Bergamini et al., 2020). Estas células são responsáveis pela apresentação de antígenos às células T e são extremamente importantes na liberação de mediadores inflamatórios, que ativam as células Th1, Th2, Th17 ou TREGS (Bergamini et al., 2020). Além disso, a presença de células dendríticas em lesões periapicais crônicas de dentes permanentes pode ser um indicativo da gravidade da lesão, com presença constante dos antígenos na região periapical (Figueiredo et al., 2018). Adicionalmente, essas células podem atuar como potenciais determinantes da mudança de resposta do hospedeiro uma vez que, na presença de altos níveis de RANKL, podem adquirir um fenótipo tolerogênico. O estado de tolerância, sistemicamente e localmente, suprime o desenvolvimento de respostas exacerbadas e contribui para a estabilidade das lesões (Cavalla et al., 2021).

As células dendríticas plasmocitóides são subtipos de células dendríticas formados na medula óssea e são responsáveis pela intersecção das respostas imunes

inata e adaptativa (Figueiredo et al., 2018), sendo detectadas pela expressão das moléculas de CD123 e CD303 (Rodini et al., 2001). O CD123 expressa células dendríticas plasmocitóides de cadeia alfa de receptor IL-3, enquanto que o CD303 expressa células dendríticas plasmocitóides sanguíneas (imaturas).

No presente estudo foi possível identificar as células dendríticas plasmocitóides em 100% dos casos de cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes. As células dendríticas plasmocitóides imaturas foram as mais prevalentes na dentição decídua e o segundo tipo celular mais prevalente na dentição permanente.

Em um estudo realizado por Weber et al., em 2019, as células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos) e linfócitos T foram avaliadas, em cistos radiculares de dentes permanentes. Concluíram que essas células são relevantes para a fisiopatologia da lesão periapical. No entanto, o estudo do Weber et al. (2019) difere do presente estudo, pois avaliou células dendríticas mielóides maduras, por meio do marcador CD83.

No presente estudo, a presença abundante de células dendríticas plasmocitóides, observada tanto nos cistos radiculares de dentes decíduos quanto nos permanentes, pode ser explicada pelo fato de as lesões estarem na fase crônica não expansiva (Kaneco et al., 2008).

Deve ser ressaltado que, na literatura específica, ainda não existem estudos publicados avaliando células dendríticas plasmocitóides em lesões periapicais dentes decíduos, impossibilitando a comparação com os resultados do presente estudo.

Adicionalmente, no presente estudo obteve-se um resultado inédito, ou seja, a detecção da presença de células dendríticas plasmocitóides (maduras e imaturas) imunomarcadas em cistos radiculares de dentes decíduos, inclusive em maiores números, em comparação com dentes permanentes ($p < 0,05$).

Outro tipo celular por nós avaliado foram os mastócitos, os quais, assim como as células dendríticas, também fazem parte do sistema imune inato, sendo consideradas como células protetoras (Rodini et al., 2004; Choudhary et al., 2021). Em comparação às células dendríticas, no presente estudo os mastócitos apresentaram-se em menores números, apesar de estarem presentes em 100% dos

casos de dentes decíduos e permanentes, sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$).

Apesar de não haver estudos publicados na literatura específica avaliando mastócitos em lesões periapicais de dentes decíduos, alguns autores avaliaram essas células em granulomas e cistos radiculares de dentes permanentes (Shiromany et al., 2014; Mahendrakumar et al., 2015; Lima et al., 2011; Choudhary et al., 2021).

Em um estudo realizado por Mahendrakumar et al. (2015) foi avaliada a expressão imunohistoquímica e localização da triptase de mastócitos em granulomas e cistos radiculares, concluindo que os mastócitos estavam presentes em áreas inflamatórias ativas, bem como em regiões periféricas de ambas as lesões periapicais. Em adição, em um estudo realizado por Shiromany et al. (2014), nos cistos os mastócitos estavam localizados no tecido conjuntivo, logo abaixo do epitélio, o que também foi observado no presente estudo, tanto em cistos radiculares de dentes decíduos como de permanentes.

Segundo Choudhary et al. (2021), os mastócitos estiveram presentes em todos os cistos e granulomas periapicais, porém foram predominantemente observados nos cistos radiculares, sugerindo um papel significativo dos mastócitos na iniciação, desenvolvimento e progressão das lesões periapicais.

De acordo com os resultados do presente estudo, a média de mastócitos encontrada foi de 22 para os dentes permanentes, corroborando com os resultados de Lima et al. (2011), no qual foi encontrada uma média de 10 mastócitos.

Ainda com relação aos mastócitos, deve ser ressaltado que o presente estudo apresenta um resultado inédito, uma vez que foi possível detectar que o número de células imunomarcadas para mastócitos em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes foram estatisticamente semelhantes, apesar de haver uma tendência a uma maior quantidade de mastócitos em dentes decíduos.

Outro tipo celular da imunidade adaptativa avaliado no presente estudo foram os linfócitos T, os quais estavam presentes em 100% dos casos de cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes, porém com maior expressão na dentição permanente ($p < 0,05$). Esse fato permite inferir que a resposta tardia mediada por linfócitos T ocorre mais efetivamente em adultos (Sociedade Brasileira de Pediatria, 2021).

Adicionalmente, no presente estudo foram avaliados também os Linfócitos T regulatórios (TREGS) e os Linfócitos T citotóxicos.

As TREGS desempenham um importante papel no controle do microambiente inflamatório dos cistos radiculares (Bergamini et al., 2020) e, em lesões periapicais, expressam IL-10 e TGF- β (Colic et al., 2009), em dentes permanentes. No presente estudo, as TREGS (maduras e imaturas) foram identificadas por meio dos imunomarcadores das proteínas FOXP3 e CD25 (Melo e Carvalho, 2009), em 100% dos casos de cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes.

Em um estudo realizado por Bergamini et al. (2020), no qual foi utilizado o FOXP3 para análise imunohistoquímica de TREGS, obteve-se como resultado uma média de 5,9 células imunomarcadas nos cistos radiculares de dentes permanentes. No presente estudo foi encontrada uma média de 20 células imunomarcadas nesses dentes. A diferença entre os achados de Bergamini et al. (2020) e o presente estudo é sutil e pode ser devido ao estágio em que as lesões se encontravam.

Além disso, no presente estudo, foi possível verificar maior expressão de linfócitos TREGS maduros em cistos radiculares de dentes permanentes e maior expressão de TREGS imaturos em cistos radiculares de dentes decíduos. Assim, pode-se hipotetizar que, nos cistos radiculares de dentes decíduos, ou seja, em crianças, a maturação de células TREGS não ocorre de forma tão efetiva como em adultos.

Mais uma vez deve ser ressaltado que as células TREGS já foram estudadas em lesões periapicais de dentes permanentes, porém na dentição decídua ainda não há estudos publicados, o que impede a comparação direta com os resultados obtidos no presente estudo.

De acordo com Zhang et al. (2021), na lesão periapical as TREGs contribuem para manter a homeostase da resposta imune do hospedeiro e para minimizar os danos teciduais. Assim, o estudo dessas células pode favorecer a implementação, futuramente, da imunoterapia para o tratamento dessas lesões.

Os linfócitos T citotóxicos foram outro tipo celular avaliado no presente estudo. Essas células, segundo Rodini e Lara (2001) e Stashenko e Yu (1989), estão relacionadas à fase crônica da lesão. No presente estudo apresentamos um outro resultado inédito na literatura específica, uma vez que demonstramos que os

linfócitos T citotóxicos estão presentes em cistos radiculares de dentes decíduos, sem diferença significativa ($p > 0,05$) em comparação aos dentes permanentes, apesar de haver uma tendência de maior concentração de linfócitos T CD8+ nos cistos radiculares de dentes permanentes.

Com relação aos cistos radiculares de dentes permanentes de humanos, nossos resultados são concordantes com os relatados por Philippi et al. (2003), que observaram a presença de linfócitos T, pela técnica de imunohistoquímica.

O último tipo celular avaliado no presente estudo foi os linfócitos B, os quais produzem anticorpos (imunidade humoral) (Abbas, 2015). Em 2021, Polanco et al. caracterizaram as imunoglobulinas (cadeia leve e pesada) presentes em granulomas e cistos, observando diferença significativa entre cistos e granulomas periapicais de dentes decíduos e permanentes, com maior expressão de IgG em cistos radiculares de dentes decíduos.

No presente estudo, diferentemente do que ocorreu com os linfócitos T, os linfócitos B foram encontrados em maior número em cistos radiculares de dentes decíduos, quando comparados com a dentição permanente ($p < 0,05$), o que pode ser explicado pelo fato de que os linfócitos B, embora sejam classificados como células da imunidade adaptativa, exercem tanto funções de células da imunidade inata quanto da resposta adaptativa. Por pertencerem aos dois tipos de resposta, provavelmente essas células representam uma forma primitiva e conservada da imunidade (Mesquita Júnior et al., 2010).

Sumarizando, após consulta às bases de dados, observa-se que estudos imunohistoquímicos avaliando lesões periapicais em dentes decíduos de humanos são escassos. Em 2008, Bolan et al. publicaram um estudo imunohistoquímico avaliando a presença de linfócitos T e B e macrófagos, em lesões periapicais de dentes decíduos, de maneira geral (granulomas, granulomas epiteliados, abscessos agudos e abscessos crônicos). Concluíram que a resposta imune humoral é mediada por células é importante nas lesões periapicais de dentes decíduos.

Em um estudo do nosso grupo de pesquisa recentemente publicado (Bertasso et al., 2020), foi avaliada a polarização de macrófagos M1 e M2 em cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes de humanos, por meio de

imunohistoquímica. Não foi observada diferença significativa entre os cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes, com relação a essas células.

No entanto, a comparação dos resultados obtidos no presente estudo, em dentes decíduos, torna-se impossibilitada, em função da ausência de trabalhos semelhantes publicados na literatura específica, até o momento.

DA ANÁLISE DA PRESENÇA/AUSÊNCIA E LOCALIZAÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO (HBD-3) E SUA RELAÇÃO COM O TAMANHO DA LESÃO RADIOGRÁFICA

Na área da Endodontia, um número reduzido de estudos avaliou a hBD-3 (Lee e Baek, 2012; Song et al., 2009; Paris et al., 2009; Lee et al., 2013; Lee et al., 2013; Yoo et al., 2017; Ghattas Ayoub et al., 2017; Yoo et al., 2019; Yoo et al., 2021). Esses estudos foram realizados apenas em dentes permanentes *in vitro* em sua maioria e/ou em modelo animal. Verificou-se que a hBD-3 apresenta efeito antimicrobiano *in vitro*, em cultura microbiana, contra *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis*, sendo essa ação maior que a da clorexidina e da solução de hidróxido de cálcio (Lee et al., 2013a); ocasiona inibição do crescimento de *E. faecalis* em blocos de dentina infectados (Lee et al., 2013b); e apresenta ação antifúngica contra *Candida albicans*, em blocos de dentina radicular humana (Yoo et al., 2017).

Yoo et al. (2019) realizaram um estudo *in vitro* utilizando a hBD-3-C15 humana sintética. Observaram que tanto o hidróxido de cálcio (padrão ouro) como a hBD-3-C15 inibiram a resposta inflamatória em células da polpa dental humana, além de apresentarem efeito antimicrobiano. Em adição, em um estudo realizado em modelo animal (cão), Yoo et al. (2021) observaram que a hBD-3-C15 apresentou resultados antimicrobianos e radiográficos semelhantes aos do hidróxido de cálcio na desinfecção. No entanto, histologicamente o hidróxido de cálcio ocasionou processo de reparo superior.

Deve ser ressaltado que, em 2012, Lee e Baek demonstraram *in vitro* a neutralização do LTA de *Enterococcus faecalis*, após exposição à hBD-3. Em 2007, Funderburg et al. demonstraram que a hBD-3 é capaz de inibir o LPS (endotoxina bacteriana), modulando a resposta do hospedeiro. A hBD-3 também pode inibir a diferenciação de osteoclastos e a reabsorção óssea (Park et al., 2017). Além disso, a

rHBD3 (beta-defensina humana recombinante) elimina *in vitro* até 98% das bactérias patogênicas prevalentes nos canais radiculares (Song et al. 2009).

Segundo Harder (2001), a hBD-3 pode ter um importante papel na defesa contra os micro-organismos, principalmente no epitélio. Embora a presença de hBD-3 já tenha sido previamente evidenciada no epitélio da mucosa bucal, no epitélio das vias aéreas, epitélio da córnea, epitélio das mucosas nasal e urogenital, epitélio das células capilares endoteliais, epitélio dos tecidos intestinais, epitélio da próstata (Lee et al., 2000; Schneider et al., 2005), epitélio de mucoceles (Frederic et al., 2008) e epitélio gengival (Li et al., 2016), o presente estudo foi o primeiro a demonstrar a expressão de hBD-3 no epitélio e na cápsula de cistos radiculares de dentes decíduos (em 78,5% dos espécimes) e permanentes (em 76,9% dos espécimes).

Embora no presente estudo a porcentagem de casos que expressaram a hBD-3 tenha sido semelhante nos cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes, nos dentes decíduos essa expressão ocorreu de maneira semelhante na cápsula e no epitélio, enquanto que nos dentes permanentes houve maior expressão na cápsula, relacionada a células do sistema imune como macrófagos, linfócitos e plasmócitos.

Yu et al. (2018) avaliaram o papel da hBD-3 na modulação e ativação de macrófagos, em animais, durante a resposta inflamatória aguda estimulada por LPS. Concluíram que a hBD-3 modula macrófagos para o fenótipo M2, contribuindo para sua propriedade anti-inflamatória. Com relação aos linfócitos, a hBD-3 pode fornecer sinais para que as células T e as células dendríticas sejam recrutadas para o local da infecção (Rohrl et al., 2010). Outra célula envolvida na liberação de hBD-3 são os plasmócitos que, estimulados pela presença da infecção, expressam hBD-3 (Rahman et al., 2007).

No presente estudo, um dado importante foi a maior produção de hBD-3 nas lesões pequenas (menores que 30mm²), em comparação às lesões grandes (maiores que 30mm²). Esse fato pode significar que a produção de hBD-3 no epitélio/cápsula dos cistos radiculares de dentes decíduos pode atuar como um mecanismo de proteção do organismo, auxiliando na circunscrição do processo e na

limitação da expansão da lesão. Esses resultados evidenciam o importante papel protetor da hBD-3 endógena, em lesões periapicais de dentes decíduos.

Por outro lado, nos dentes permanentes não foi observada diferença na produção de hBD-3 entre lesões pequenas e lesões grandes. Possivelmente, nesses dentes, outros fatores podem ter influenciado, incluindo a produção de outros Peptídeos Antimicrobianos (AMPs), incluindo outras defensinas, histatinas e catelicidinas, evidenciando a necessidade de estudos adicionais.

Pelo exposto, verifica-se que a hipótese nula do presente estudo foi parcialmente aceita, uma vez que as células mais prevalentes nos cistos radiculares em dentes decíduos foram as células dendríticas plasmocitóides maduras e imaturas, linfócitos T e os linfócitos B. Por outro lado, nos dentes permanentes as células mais prevalentes foram os linfócitos T, células dendríticas plasmocitóides imaturas, linfócitos T citotóxicos e linfócitos B. Além disso, a hBD-3 foi expressa no epitélio e na cápsula de forma diferente nos dentes decíduos e permanentes, com maior produção nas lesões pequenas apenas nos dentes decíduos.

Estudos adicionais são necessários, avaliando outros tipos celulares da resposta inflamatória e imune, além de outras defensinas.

Finalizando, o conhecimento de que os cistos radiculares de dentes decíduos apresentam uma população celular complexa, com maior expressão células dendríticas plasmocitóides maduras e imaturas, linfócitos T e linfócitos B, sendo extremamente relevante, considerando a imaturidade do sistema imunológico da criança e os potenciais efeitos locais e sistêmicos da infecção e das reações desencadeadas (Simon et al., 2015).

Outro resultado relevante obtido no presente estudo foi a evidenciação da produção de hBD-3 pelo epitélio e pela cápsula de cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes, inclusive com maior produção em lesões pequenas de dentes decíduos, evidenciando seu papel protetor. Esses resultados podem abrir perspectivas futuras como o desenvolvimento e a produção de materiais que estimulem a produção de hBDs endógenas, ou que empreguem hBDs recombinantes, contribuindo para o sucesso do tratamento endodôntico.

Deve ser ressaltado que esses conhecimentos podem propiciar uma melhor compreensão da patologia pulpar e periapical em dentes decíduos,

comparativamente aos permanentes, favorecendo a instituição de técnicas de tratamento mais direcionadas e o desenvolvimento de materiais de uso endodôntico imunologicamente ativos e com propriedades imunomoduladoras, como salientado por Weber et al. (2019), Braz-Silva et al. (2019), Zhang et al. (2021), Wang et al. (2022) e Teixeira et al. (2022).

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Com base nas metodologias empregadas e nos resultados obtidos no presente estudo, pôde-se concluir que, nos cistos radiculares de dentes decíduos e permanentes:

- A análise imunohistoquímica evidenciou presença de mastócitos, células dendríticas plasmocitóides (maduras e imaturas), linfócitos T regulatórios (TREGs) maduros e imaturos, linfócitos T, linfócitos T citotóxicos e linfócitos B em todos os casos (100%), tanto em dentes decíduos quanto em dentes permanentes.
- As células com maior expressão nos dentes decíduos foram as células dendríticas plasmocitóides, enquanto que nos dentes permanentes foram os Linfócitos T.
- As células mais prevalentes nos cistos radiculares em dentes decíduos foram as células dendríticas plasmocitóides maduras e imaturas, linfócitos T e os linfócitos B. Por outro lado, nos dentes permanentes as células mais prevalentes foram os linfócitos T, células dendríticas plasmocitóides imaturas, linfócitos T citotóxicos e linfócitos B.
- A beta-defensina-3 (hBD-3) foi produzida pelo epitélio/cápsula, tanto em dentes decíduos quanto em dentes permanentes. No entanto, nos dentes decíduos essa expressão ocorreu de maneira semelhante na cápsula e no epitélio, enquanto que nos dentes permanentes houve maior expressão na cápsula.
- Nos dentes decíduos observou-se maior produção de hBD-3 nas lesões pequenas, em comparação às lesões grandes. Por outro lado, nos dentes permanentes não foi observada diferença na produção de hBD-3 entre lesões pequenas e lesões grandes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.
- Allgrove JE, Gomes E, Hough J, Gleeson M. Effects of exercise intensity on salivary antimicrobial proteins and markers of stress in active men. *J Sports Sci*. 2008 Apr;26(6):653-61.
- Altaie AM, Venkatachalam T, Samaranyake LP, Soliman SSM, Hamoudi R. Comparative metabolomics reveals the microenvironment of common T-Helper cells and differential immune cells linked to unique periapical lesions. *Front Immunol*. 2021 Sep 3; 12:707267.
- American Association of Endodontics. *Glossary of endodontic terms*. 10 Ed. Chicago. 2020. 48p.
- Aminoshariae, Anita, et al. "Associations between HBD3 and Pro-Inflammatory Cytokines in Asymptomatic Irreversible Pulpitis." *Dent Res Mang* 2. 2017; 14-19.
- Andrade AL, Santos EM, Carmo AF, Freitas RA, Galvão HC. Analysis of tryptase-positive mast cells and immunoexpression of MMP-9 and MMP-13 in periapical lesions. *Int Endod J*. 2017 May;50(5):446-454.
- Andrade Wde C, Silva LF, Coelho MC, Tannuri AC, Alves VA, Tannuri U. Effects of the administration of pentoxifylline and prednisolone on the evolution of portal fibrogenesis secondary to biliary obstruction in growing animals: immunohistochemical analysis of the expression of TGF- β and VEGF. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012 Dec;67(12):1455-61.
- Antimicrobial Peptide Database. University of Nebraska Medical Center [Internet]. Acesso em 13/05/2022. APD: Disponível em: <https://aps.unmc.edu/home>
- 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-Pires AC, Francisconi CF, Bigueti CC, Cavalla F, Aranha AM, Letra A, Trombone AP, Faveri M, Silva RM, Garlet GP. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci*. 2014 Jul-Aug;22(4):336-46.
- Ashby M, Petkova A, Hilpert K. Cationic antimicrobial peptides as potential new therapeutic agents in neonates and children: a review. *Curr Opin Infect Dis*. 2014 Jun;27(3):258-67.
- Bănică AC, Popescu SM, Mercuț V, Busuioc CJ, Gheorghe AG, Trașcă DM, Brăila AD, Moraru AI. Histological and immunohistochemical study on the apical granuloma. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(3):811-817.
- Bautista-Hernández LA, Gómez-Olivares JL, Buentello-Volante B, Bautista-de Lucio VM. Fibroblasts: The Unknown Sentinels Eliciting Immune Responses Against Microorganisms. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2017 Aug 19;7(3):151-157.

Bechinger B, Gorr SU. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *J Dent Res.* 2017 Mar;96(3):254-260.

Bedran TB, Mayer MP, Spolidorio DP, Grenier D. Synergistic anti-inflammatory activity of the antimicrobial peptides human beta-defensin-3 (hBD-3) and cathelicidin (LL-37) in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts. *PLoS One.* 2014 Sep 4;9(9):e106766.

Bergamini ML, Mardegan AP, DE Rosa CS, Palmieri M, Sarmiento DJS, Hiraki KRN, Costa ALF, HassÉus B, Jonasson P, Braz-Silva PH. Presence of langerhans cells, regulatory T cells (Treg) and mast cells in asymptomatic apical periodontitis. *Braz Oral Res.* 2020;34:e108.

Bertasso AS, Léon JE, Silva RAB, Silva LAB, de Queiroz AM, Pucinelli CM, Romualdo PC, Nelson-Filho P. Immunophenotypic quantification of M1 and M2 macrophage polarization in radicular cysts of primary and permanent teeth. *Int Endod J.* 2020 May;53(5):627-635.

Bezerra da Silva RA, Nelson-Filho P, Lucisano MP, De Rossi A, de Queiroz AM, Bezerra da Silva LA. MyD88 knockout mice develop initial enlarged periapical lesions with increased numbers of neutrophils. *Int Endod J.* 2014 Jul;47(7):675-86.

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. *J Clin Pediatr Dent.* 2008 Summer;32(4):287-93.

Braz-Silva PH, Bergamini ML, Mardegan AP, De Rosa CS, Haseus B, Jonasson P. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. *Acta Odontol Scand.* 2019 Apr;77(3):173-180.

Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005 Mar;3(3):238-50.

Bystrom A, Happonen RP, Sjogren U, Sundqvist G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endod Dent Traumatol.* 1987 Apr;3(2):58-63.

Campos K, Francisconi CF, Okechie V, de Souza LC, Trombone AP, Letra A, Garlet GP, Gomez RS, Silva RM. FOXP3 DNA methylation levels as a potential biomarker in the development of periapical lesions. *Journal Endodontic.* 2015; 41(2):212-8.

Carneiro Sampaio MMS, Grumach AS. *Imunologia e alergia pediátrica.* 1. Ed. São Paulo: Sarvier; 1992.

Cavalla F, Letra A, Silva RM, Garlet GP. Determinants of Periodontal/Periapical Lesion Stability and Progression. *J Dent Res.* 2021 Jan;100(1):29-36.

Chávez-Galán Leslie, Olleros Maria L, Vesin Dominique, Garcia Irene. Much More than M1 and M2 Macrophages, there are also CD169+ and TCR+ Macrophages. *Frontiers in Immunology.* 6; 2015.

Choudhary A, Kesarwani P, Koppula S, Verma S, Saumya S, Srivastava P. Quantification and distribution of mast cells in oral periapical inflammatory lesions. *J Conserv Dent.* 2021 Nov-Dec;24(6):580-584.

Colić M, Gazivoda D, Vučević D, Majstorović I, Vasilijić S, Rudolf R, Brkić Z, Milosavljević P. Regulatory T-cells in periapical lesions. *J Dent Res*. 2009 Nov;88(11):997-1002.

Consolaro A. *Inflamação e Reparo. Um Sílabo para compreensão clínica e implicações terapêuticas*. Maringá, Brasil: Dental Press Editora; 2009.

Constantino J, Gomes C, Falcão A. et al. Dendritic cell-based immunotherapy: a basic review and recent advances. *Immunol Res*. 2017; 65, 798–810.

Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*. 2006.

Couto AMD, Meirelles DP, Valeriano AT, Almeida DS, Moraes Ê, Tarquinio SBC, Batista AC, Mendonça EF, Costa ND, Alves PM, Nonaka CFW, Abreu LG, Aguiar MCF. Chronic inflammatory periapical diseases: a Brazilian multicenter study of 10,381 cases and literature review. *Braz Oral Res*. 2021 Mar 15;35:e033.

Cruvinel WM, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, Andrade LPC. Sistema Imunitário – Parte I, Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Bras J Rheumatol*. 2010; 50(4):434-61.

da Silva LA, da Silva RA, Branco LG, Navarro VP, Nelson-Filho P. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. *Braz Dent J*. 2008;19(4):296-300.

Dale BA, Krisanaprakornkit S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *J Oral Pathol Med*. 2001 Jul;30(6):321-7.

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*. 2016;83(1):9-15.

Dokić J, Tomić S, Marković M, Milosavljević P, Colić M. Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2013 Jul;43(7):1862-72.

Figueiredo JAP, Machado AM, Oliveira VP, Hartmann R, Waltrick SBG, Borba MG, Brew MC, Estrela CRA, Böttcher DE. Dendritic cells and their relation to apical periodontitis. *Braz Oral Res*. 2018 Oct 18;32(suppl 1):e71.

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.

Folkvord JM, McCarter MD, Ryder J, Meditz AL, Forster JE, Connick E. alpha-Defensins 1, 2, and 3 are expressed by granulocytes in lymphoid tissues of HIV-1-seropositive and -seronegative individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006 Aug 15;42(5):529-36.

Frederic MK, Yamaai T, Mizukawa N, Kaneda Y, Katase N, Gunduz M, Nagatsuka H, Sugahara T. Expression of human beta-defensin -1, -2, and -3 in non-inflamed pseudocyst, mucocoeles. *Oral Dis*. 2008 Oct;14(7):652-7.

Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, Drage MG, Jadowsky J, Harding CV, Weinberg A, Sieg SF. Human α -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 20;104(47):18631-5.

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

Ghattas Ayoub C, Aminoshariae A, Bakkar M, Ghosh S, Bonfield T, Demko C, Montagnese TA, Mickel AK. Comparison of IL-1 β , TNF- α , hBD-2, and hBD-3 Expression in the Dental Pulp of Smokers Versus Nonsmokers. *J Endod*. 2017 Dec;43(12):2009-2013.

Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Mocchegiani F, Del Prete MS, Viticchi C, Kamysz W, Łempicka E, Saba V, Scalise G. Potential therapeutic role of cationic peptides in three experimental models of septic shock. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jul;46(7):2132-6.

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 CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *J Endod*. 2007 Jul;33(7):773-81.

Hancock RE, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol*. 1998 Feb;16(2):82-8.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta α -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*. 2001 Feb 23;276(8):5707-13

Harris F, Dennison SR, Phoenix DA. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr Protein Pept Sci*. 2009 Dec;10(6):585-606.

Inomata M, Horie T, Into T. Effect of the Antimicrobial Peptide LL-37 on Gene Expression of Chemokines and 29 Toll-like Receptor-Associated Proteins in Human Gingival Fibroblasts Under Stimulation with *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2020 Mar;12(1):64-72.

Iwasaki A, Medhritov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010; 15-327(5963):291-295.

Janssen KW, Westra J, Chalan P, Boots AM, De Smit MJ, Van Wikelhoff AJ, Vissink A, Brouwer E. Regulatory CD4⁺ T cell Subsets and Anti-Citrullinated Protein Antibody Repertoire: Potential Biomarkers for Arthritis Development in Seropositive Arthralgia Patients? *PLoSOne*. 2016.

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.

Kaneko T, Okiji T, Zhao L, Esgeurra R, Suda H. Heterogeneity of dendritic cells in rat apical periodontitis. *Cell Tissue Res*. 2008 Mar;331(3):617-23.

- Khurshid Z, Naseem M, Sheikh Z, Najeeb S, Shahab S, Zafar MS. Oral antimicrobial peptides: Types and role in the oral cavity. *Saudi Pharm J*. 2016 Sep;24(5):515-524.
- Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013 Mar;13(3):159-75.
- Lee JK, Chang SW, Perinpanayagam H, Lim SM, Park YJ, Han SH, Baek SH, Zhu Q, Bae KS, Kum KY. Antibacterial efficacy of a human β -defensin-3 peptide on multispecies biofilms. *J Endod*. 2013a Dec;39(12):1625-9.
- Lee JK, Park YJ, Kum KY, Han SH, Chang SW, Kaufman B, Jiang J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg L. Antimicrobial efficacy of a human β -defensin-3 peptide using an *Enterococcus faecalis* dentine infection model. *Int Endod J*. 2013b May;46(5):406-12.
- Lee JW, Chun W, Lee HJ, Min JH, Kim SM, Seo JY, Ahn KS, Oh SR. The Role of Macrophages in the Development of Acute and Chronic Inflammatory Lung Diseases. *Cells*. 2021 Apr 14;10(4):897.
- Lee SH, Baek DK. Antibacterial and neutralizing effect of human β -defensins on *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid. *J Endod*, 38 (2012), pp. 351-356.
- Lee SH, Jun HK, Lee HR, Chung CP, Choi BK. Antibacterial and lipopolysaccharide (LPS) neutralising activity of human cationic antimicrobial peptides against periodontopathogens. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Feb;35(2):138-45.
- Lee SH, Lim HH, Lee HM, Choi JO. Expression of human beta-defensin 1 mRNA in human nasal mucosa. *Acta Otolaryngol*. 2000 Jan;120(1):58-61.
- Leonardo MR, Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci*. 2004 Jun;12(2):93-8.
- Li X, Duan D, Yang J, Wang P, Han B, Zhao L, Jepsen S, Dommisch H, Winter J, Xu Y. The expression of human β -defensins (hBD-1, hBD-2, hBD-3, hBD-4) in gingival epithelia. *Arch Oral Biol*. 2016 Jun; 66:15-21.
- Lima SC, Rizo VH, Silva-Sousa YT, Almeida LY, Almeida OP, León JE. Immunohistochemical evaluation of angiogenesis and tryptase-positive mast cell infiltration in periapical lesions. *J Endod*. 2011 Dec;37(12):1642-6.
- Linehan E, Dombrowski Y, Snoddy R, Fallon PG, Kissenpfennig A, Fitzgerald DC. Aging impairs peritoneal but not bone marrow derived macrophage phagocytosis. *Aging Cell*. 2014; 13(4):699-708.
- Lips A, Antunes LS, Antunes LA, Abreu JGB, Barreiros D, Oliveira DSB, Batista AC, Nelson-Filho P, Silva LABD, Silva RABD, Alves GG, Küchler EC. Genetic Polymorphisms in DEFB1 and miRNA202 Are Involved in Salivary Human β -Defensin 1 Levels and Caries Experience in Children. *Caries Res*. 2017;51(3):209-215.
- MacDonald D. The most frequent and/or important lesions that affect the face and the jaws. *Oral Radiol*. 2019 Feb 13.
- Mahendrakumar PH, Naik P, Tewari N, Sartaj Singh Jadhav K. Immunoregulatory Role of Mast Cells in Apical Granulomas and Periapical Cysts-An Immunohistochemical Study. *Medicine, Biology*, 2015.

Mahita VN, Manjunatha BS, Shah R, Astekar M, Purohit S, Kovvuru S. Quantification and localization of mast cells in periapical lesions. *Ann Med Health Sci Res.* 2015;5(2):115-118.

Mai S, Mauger MT, Niu LN, Barnes JB, Kao S, Bergeron BE, Ling JQ, Tay FR. Potential applications of antimicrobial peptides and their mimics in combating caries and pulpal infections. *Acta Biomater.* 2017 Feb;49:16-35.

Martin L, van Meegern A, Doemming S, Schuerholz T. Antimicrobial Peptides in Human Sepsis. *Front Immunol.* 2015 Aug 20;6:404.

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:453-61.

Márton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiology Imunology.* 2000; 15(3)139-150.

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.

Meghji S, Qureshi W, Henderson B, Harris M. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. *Arch Oral Biol.* 1996 Jun;41(6):523-31.

Melo KM, Carvalho BTC. *T regulatory cell: mechanism of action and function in human diseases.* *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 2009; 0932-05:184.

Mesquita Júnior, Danilo et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista Brasileira de Reumatologia [online];* 2010;50, 5.

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

Mittelbrunn M, Martínez del Hoyo G, López-Bravo M, Martín-Cofreces NB, Scholer A, Hugues S, Fetler L, Amigorena S, Ardavin C, Sánchez-Madrid F. Imaging of plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells. *Blood.* 2009 Jan 1;113(1):75-84.

Miyara M, Gorochov G, Ehrestein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FOXP3 regulatory T cemedlls in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews Journals.* 2011; 10(12):744-755.

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

Nan Ma, Yang D, Okamura H, Teramachi J, Hasegawa T, Qiu L, Haneji T. Involvement of interleukin-23 induced by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide in osteoclastogenesis. *Molecular Medicine Reports.* 2017; 15(2).

Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LA, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod.* 2002 Oct;28(10):694-6.

- Nireeksha Varma SR, Damdoun M, Alsaegh MA, Hegde MN, Kumari SN, Ramamurthy S, Narayanan J, Imran E, Shabbir J, Khurshid Z. Immunomodulatory Expression of Cathelicidins Peptides in Pulp Inflammation and Regeneration: An Update. *Curr Issues Mol Biol*. 2021 May 13;43(1):116-126.
- Orstavik D. Time-course and risk analyses of the development and healing of chronic apical periodontitis in man. *Int Endod J*. 1996 May;29(3):150-5.
- Paris S, Wolgin M, Kielbassa AM, Pries A, Zakrzewicz A. Gene expression of human beta-defensins in healthy and inflamed human dental pulps. *J Endod*. 2009 Apr;35(4):520-3.
- Park OJ, Kim J, Ahn KB, Lee JY, Park YJ, Kum KY, Yun CH, Han SH. A 15-amino acid C-terminal peptide of beta-defensin-3 inhibits bone resorption by inhibiting the osteoclast differentiation and disrupting podosome belt formation. *J Mol Med (Berl)*. 2017 Dec;95(12):1315-1325.
- Pereira RF, Cintra LTA, Tessarin GWL, Chiba FY, de Lima Coutinho Mattera MS, Scaramele NF, Tsosura TVS, Ervolino E, de Oliveira SHP, Sumida DH. Periapical Lesions Increase Macrophage Infiltration and Inflammatory Signaling in Muscle Tissue of Rats. *J Endod*. 2017 Jun;43(6):982-988. *Pharmaceuticals (Basel)* 2016 Sep; 9(3): 59.
- Philippi, Christine Kalvelage et al. Distribution of CD8 and CD20 lymphocytes in chronic periapical inflammatory lesions. *Brazilian Dental Journal* [online]. 2003, v. 14, n. 3 [Accessed 20 June 2022], pp. 182-186.
- Polanco XBJ, Bertasso AS, Silveira HA, Yamamoto de Almeida L, Almeida LKY, da Silva RAB, da Silva LAB, de Rossi A, Nelson-Filho P, León JE. IgG4-positive plasma cells are more often detected in chronic periapical lesions arising from permanent rather than primary teeth. *Int Endod J*. 2021 May;54(5):682-692.
- Rahman A, Fahlgren A, Sitohy B, Baranov V, Zirakzadeh A, Hammarström S, Danielsson A, Hammarström ML. Beta-defensin production by human colonic plasma cells: a new look at plasma cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Jul;13(7):847-55.
- 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
- 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.
- Röhr J, Yang D, Oppenheim JJ, Hehlhans T. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. *J Immunol*. 2010 Jun 15;184(12):6688-94.
- Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Journal of Immunology*. 2005; 175(3):1373-81.
- Santos LC, Ramos EA, Gurgel CA, de Santana EJ, Dos Santos JN. Immunohistochemical detection of Langerhans cells in dental granulomas and radicular cysts. *J Mol Histol*. 2007 Jun;38(3):201-5.

Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. Human defensins. *J Mol Med (Berl)*. 2005 Aug;83(8):587-95. Epub 2005 Apr 9.

Sheethal HS, Kn H, Smitha T, Chauhan K. Role of mast cells in inflammatory and reactive pathologies of pulp, periapical area and periodontium. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2018 Jan-Apr;22(1):92-97.

Shiromany A, Sood R, Akifuddin S, Sidhu GK, Khan N, Singla K. Comparison of Mast Cells and Inflammatory Cells within Periapical Lesions and Comparison of Degranulated Mast Cells Between Fibrous and Inflamed Area in Radicular Cysts: An Immunohistochemical Study. *J Clin of Diagn Res*. 2014; 8(12):ZC61-ZC64.

Silva L, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod*. 2002 Feb;28(2):94-8.

Silva TA, Garlet GP, Fudaka SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in Oral Inflammatory Diseases: Apical Periodontitis and Periodontal Disease. *Journal Dent Res*. 2007; 86(4):306-319.

Simon, A. Katharina, Georg A. Hollander, and Andrew McMichael. "Evolution of the immune system in humans from infancy to old age." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282.1821 (2015): 20143085.

Smiley AK, Gardner J, Klingenberg JM, Neely AN, Supp DM. Expression of human beta defensin 4 in genetically modified keratinocytes enhances antimicrobial activity. *J Burn Care Res*. 2007 Jan-Feb;28(1):127-32.

Sociedade Brasileira de Pediatria. Moraes-Pinto MI, Suano-Souza F, Aranda CS. Immune system: development and acquisition of immunological competence. *J Pediatr (Rio J)*. 2021; (97 (S1):59-66.

Song W, Shi Y, Xiao M, Lu H, Qu T, Li P, Wu G, Tian Y. In vitro bactericidal activity of recombinant human beta-defensin-3 against pathogenic bacterial strains in human tooth root canal. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Mar;33(3):237-43.

Stashenko P, Yu SM. T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. *J Dent Res* 1989; 68:830-4.

Taira TM, Lima V, Prado DS, Silva TA, Issa JPM, da Silva LAB, Zamboni DS, Cunha FQ, Fukada SY. NLRP12 Attenuates Inflammatory Bone Loss in Experimental Apical Periodontitis. *J Dent Res*. 2019 Apr;98(4):476-484.

Teixeira FFC, Cardoso FGR, Ferreira NS, Corazza BJM, Valera MMC, Nascimento GG, Martinho FC. Effects of Calcium Hydroxide Intracanal Medications on T Helper (Th1, Th2, Th9, Th17, and Tfh) and Regulatory T (Treg) Cell Cytokines in Apical Periodontitis: A CONSORT RCT. *J Endod*. 2022 Apr 26:S0099-2399(22)00307-7.

Tibúrcio-Machado CS, Michelon C, Zanatta FB, Gomes MS, Marin JA, Bier CA. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J*. 2021 May;54(5):712-735.

- Veloso P, Fernández A, Terraza-Aguirre C. et al. Macrophages skew towards M1 profile through reduced CD163 expression in symptomatic apical periodontitis. *Clin Oral Invest* 2020. 24, 4571–4581.
- Wang L, Yang F, Qiu Y, Ye L, Song D, Huang D. The Potential Roles of T Cells in Periapical Lesions. *J Endod*. 2022 Jan;48(1):70-79.
- Weber M, Ries J, Büttner-Herold M, Geppert CI, Kesting M, Wehrhan F. Differences in Inflammation and Bone Resorption between Apical Granulomas, Radicular Cysts, and Dentigerous Cysts. *J Endod*. 2019 Aug 7.
- 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.
- Webster SJ, Brode S, Ellis L, Fitzmaurice TJ, Elder MJ, Gekara NO, Tourlomousis P, Bryant C, Clare S, Chee R, Gaston HJS, Goodall JC. Detection of microbial metabolite by STING regulates inflammasome activation in response to *Chlamydia trachomatis* infection. *Plos Pathogens*. 2017; 1-13(6):1006383.
- Yang H, Zhu L, Xiao L, Shen Y, Wang L, Peng B, Haapasalo M. Imbalance of Interleukin-17+ T-cell and Foxp3+ Regulatory T-cell Dynamics in Rat Periapical Lesions. *Journal of Endodontics*. 2014; 1(40):56-62.
- Yang NY, Zhou Y, Zhao HY, Liu XY, Sun Z, Shang JJ. Increased interleukin 1 α and interleukin 1 β expression is involved in the progression of periapical lesions in primary teeth. *BMC Oral Health*. 2018 Jul 16;18(1):124.
- Yoo YJ, Kwon I, Oh SR, Perinpanayagam H, Lim SM, Ahn KB, Lee Y, Han SH, Chang SW, Baek SH, Zhu Q, Kum KY. Antifungal Effects of Synthetic Human Beta-defensin-3-C15 Peptide on *Candida albicans*-infected Root Dentin. *J Endod*. 2017 Nov;43(11):1857-1861.
- Yoo YJ, Perinpanayagam H, Choi Y, Gu Y, Chang SW, Baek SH, Zhu Q, Fouad AF, Kum KY. Characterization of Histopathology and Microbiota in Contemporary Regenerative Endodontic Procedures: Still Coming up Short. *J Endod*. 2021 Aug;47(8):1285-1293.e1.
- Yoo YJ, Perinpanayagam H, Lee JY, Oh S, Gu Y, Kim AR, Chang SW, Baek SH, Kum KY. Synthetic Human β Defensin-3-C15 Peptide in Endodontics: Potential Therapeutic Agent in *Streptococcus gordonii* Lipoprotein-Stimulated Human Dental Pulp-Derived Cells. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 20;21(1):71.
- Yu X, Quan J, Long W, Chen H, Wang R, Guo J, Lin X, Mai S. LL-37 inhibits LPS-induced inflammation and stimulates the osteogenic differentiation of BMSCs via P2X7 receptor and MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res*. 2018 Nov 15;372(2):178-187.
- Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol*. 2020 Jun 15; 877:173090.
- Zasloff M. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *Lancet*. 2002 Oct 12;360(9340):1116-7.

Zhai Y, Wang Y, Rao N, Li J, Li X, Fang T, Zhao Y, Ge L. Activation and Biological Properties of Human β Defensin 4 in Stem Cells Derived From Human Exfoliated Deciduous Teeth. *Front Physiol.* 2019 Oct 22; 10:1304.

Zhai Y, Yuan X, Zhao Y, Ge L, Wang Y. Potential Application of Human β -Defensin 4 in Dental Pulp Repair. *Front Physiol.* 2020 Aug 21; 11:1077.

Zhang LJ & Gallo RL (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), R14-R19.

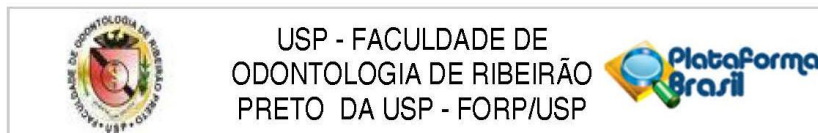
Zhang Y, Guo J, Jia R. Treg: A Promising Immunotherapeutic Target in Oral Diseases. *Front Immunol.* 2021 Jun 10; 12:667862.

Zhuang Z, Yoshizawa-Smith S, Glowacki A, Maltos K, Pacheco C, Shehabeldin M, Mulkeen M, Myers N, Chong R, Verdalis K, Garlet GP, Little S, Sfeir C. Induction of M2 macrophages prevents bone loss in murine periodontitis models. *J Dent Res.* 2019 Feb;98(2):200-208.

ANEXO

ANEXO

Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização e Quantificação dos Tipos Celulares da Resposta Inflamatória e Imune em Lesões Periapicais de Dentes Decíduos e Permanentes: Estudo em Humanos

Pesquisador: Amanda Silva Bertasso

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 80253417.6.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.905.102

Apresentação do Projeto:

A presente notificação refere-se à solicitação de emenda ao projeto de pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: O objetivo do presente estudo será identificar e quantificar, por meio da técnica de imunohistoquímica, macrófagos M1 e M2, linfócitos T (TREGs e T citotóxicos), células NK e células dendríticas plasmocitoides, em lesões periapicais de dentes decíduos e permanentes de humanos.

Objetivo Secundário: Será avaliar por meio de análise histopatológica as diferenças morfológicas entre a lesão periapical de dentes decíduos e permanentes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Avaliados no momento da submissão do projeto de pesquisa ao CEP.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente pesquisa propõe mapear as células inflamatórias na Lesão Periapical de Dentes Decíduos e Dentes Permanentes e realizar uma comparação, se a resposta imunológica do Adulto é diferente da criança, além das características morfológicas em si da lesão periapical.

Endereço: Avenida do Café s/nº - Bloco K 2 sala k-10
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP - FORP/USP



Continuação do Parecer: 4.905.102

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

vide item Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Recomendações:

vide item Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda aprovada conforme deliberado na 250ª Reunião Ordinária do CEP/FORP de 05/08/2021.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1793299_E2.pdf	22/07/2021 08:51:53		Aceito
Outros	documento.docx	22/07/2021 08:51:18	Amanda Silva Bertasso	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	justificativa.docx	03/11/2019 19:05:59	Amanda Silva Bertasso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclepara23.pdf	23/11/2017 11:35:45	Amanda Silva Bertasso	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto23.pdf	23/11/2017 11:35:31	Amanda Silva Bertasso	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostopara23.pdf	23/11/2017 11:35:15	Amanda Silva Bertasso	Aceito
Cronograma	cronogramacep.pdf	21/11/2017 09:28:59	Amanda Silva Bertasso	Aceito
Parecer Anterior	plataformasimone.pdf	10/11/2017 13:12:13	Amanda Silva Bertasso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaoinfraestruturaaaa.pdf	10/11/2017 13:07:11	Amanda Silva Bertasso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaoinfraestruturaa.pdf	10/11/2017 13:07:00	Amanda Silva Bertasso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaoinfraestrutura.pdf	10/11/2017 13:06:48	Amanda Silva Bertasso	Aceito

Endereço: Avenida do Café s/nº - Bloco K, sala k-10

Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904

UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP - FORP/USP



Continuação do Parecer: 4.905.102

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 13 de Agosto de 2021

Assinado por:

Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida do Café s/nº - Bloco K e sala k-10
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

APÊNDICES

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL - ODONTOPEDIATRIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Resolução 466/2012 – Conselho Nacional de Saúde)

Nós, Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho (orientador e responsável pelo projeto), Prof. Dr. Jorge Esquiche León (pesquisador) e Pós-Graduanda Amanda Silva Bertasso (Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, responsáveis pelo projeto convidamos

você _____,

CPF _____, bem como seu (sua) filho (a) ou quem esteja sobre seus cuidados _____, a participar do referido projeto de pesquisa “Caracterização e Quantificação dos Tipos Celulares da Resposta Inflamatória e Imune em Lesões Periapicais de Dentes Decíduos e Permanentes: Estudo em Humanos”, que será realizado na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP.

Este termo consta de 2 vias idênticas, que serão assinadas por todos os pesquisadores e por você. Uma via ficará com você e a outra será arquivada pelo pesquisador. Esta pesquisa tem como objetivo identificar e quantificar células presentes na lesão, que está presente no seu dente ou no dente do seu (sua) filho (a) que foi extraído.

Você e seu (sua) filho (a) ou quem esteja sobre cuidados terão de comparecer as Clínicas Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP), durante o período de tratamento. O nosso estudo consiste em coletar o dente com indicação de extração, para análise.

Esta pesquisa não trará nenhum risco adicional para você e seu (sua) filho (a), pois consiste somente na coleta do dente decíduo no ato da extração. O dente deve apresentar extensa destruição coronária, que não possibilite tratamento restaurador e ter lesão periapical visível radiograficamente.

O seu (sua) filho (a) ou quem esteja sobre seus cuidados terá como benefício remover a infecção, além disso terá acesso a um laudo feito por um patologista experiente sob a condição do dente do seu filho que foi extraído. A participação do seu (sua) filho (a) ou quem esteja sobre seus cuidados nesta pesquisa é muito importante, pois os resultados encontrados poderão trazer benefícios à ciência e assim ajudar outras pessoas.

Não será oferecido nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa, mas caso necessário serão ressarcidas despesas eventuais como transporte e alimentação para o comparecimento na FORP. Todo o atendimento ao seu (sua) filho (a) ou quem esteja sobre seus cuidados será gratuito. A identidade do seu (sua) filho (a) ou quem esteja sobre seus cuidados será mantida em sigilo. As divulgações dos resultados das pesquisas serão publicadas em revistas científicas e terá, por parte de nós, pesquisadores, a garantia do sigilo (segredo), garantindo a sua privacidade.

Você terá total liberdade para pedir maiores esclarecimentos antes e durante o desenvolvimento da pesquisa. Se tiver alguma dúvida poderá ligar para a pesquisadora para pedir qualquer informação (Amanda Silva Bertasso cel: 16 988568454 – Avenida do Café S/N – Departamento de Clínica Infantil – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto). Suas reclamações e/ou insatisfações relacionadas à sua participação na pesquisa poderão também ser comunicadas por escrito à secretaria do CEP/FORP/USP (16) 3315-0493 - horário de atendimento das 8h às 12h, de segunda a sexta-feira, devendo conter seu nome que será mantido em sigilo. A participação de vocês não é obrigatória, e vocês poderão desistir a qualquer momento, retirando sua autorização por meio de documento escrito. Caso não queira participar ou decida sair da pesquisa em momento posterior, não haverá nenhum prejuízo ao seu (sua) filho (a) ou quem esteja sobre seus cuidados, bem como em seu relacionamento com o pesquisador ou com a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

Você poderá conversar com outras pessoas, se julgar necessário, antes de decidir se irá participar desta pesquisa.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL - ODONTOPEDIATRIA

Eu _____, portador do
RG _____, residente a _____,
número _____, na cidade de _____ no Estado _____, Telefone
_____, declaro que li, compreendi e concordo com o presente Termo. Por isso
assino este documento de livre e espontânea vontade.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do responsável direto pelo participante de pesquisa

Amanda Silva Bertasso
CPF: 400.928.2 98-30
Pesquisadora

Prof. Dr. Jorge Esquiche León
CPF: 228.617.908-57
Pesquisador

Prof. Dr. Paulo Nelson Filho
CPF: 156.200.398-4
Pesquisador Responsável

Apêndice B - Termo de Assentimento



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL – ODONTOPEDIATRIA

TERMO DE ASSENTIMENTO

Você, _____ está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa “Caracterização e Quantificação dos Tipos Celulares da Resposta Inflamatória e Imune em Lesões Periapicais de Dentes Decíduos e Permanentes: Estudo em Humanos”. Participam deste projeto, Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho (orientador e responsável), Prof. Dr. Jorge Esquiche León (pesquisador) e Amanda Silva Bertasso (Pós-Graduanda do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP). Este documento tem duas vias idênticas (folhas iguais), que serão assinadas pelo seu responsável legal e por mim. Uma via (folha) ficará com você e a outra será guardada por mim. Esta pesquisa tem a finalidade de identificar e quantificar células presentes na lesão presente no seu dente que foi extraído.

Você e o seu responsável (pai, mãe ou cuidador) terão que doar o dente extraído para pesquisa. Se você quiser participar deste projeto de pesquisa, seu responsável também terá que concordar. Porém se você não quiser, mesmo que seu responsável concorde, você poderá falar que não quer. Você pode conversar com seu responsável antes de decidir se quer ou não participar. Pode ter algumas palavras que você não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais, porque você ficou interessado ou preocupado. Por favor, peça que eu pare, a qualquer momento, e explique novamente. Ninguém ficará bravo com você se você disser não; a escolha é sua.

Esta pesquisa consiste na doação do dente extraído para análise. A sua participação é muito importante, pois os resultados encontrados poderão trazer vários benefícios à ciência e ajudar outras pessoas. O seu nome bem como e o do seu responsável serão mantidos em segredo, mas participando da pesquisa você autoriza que os resultados obtidos seja divulgados e publicados em revistas científicas e terá, por parte dos pesquisadores, a garantia do sigilo (segredo). Nós garantimos sigilo (segredo) e sua privacidade na hora da publicação.

Se tiver alguma dúvida poderá ligar para o pesquisador para pedir qualquer informação (Amanda Silva Bertasso, cel: 16 988568454 – Avenida do Café S/N – Departamento de Clínica Infantil – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Suas reclamações e/ou insatisfações relacionadas à sua participação na pesquisa poderão ser comunicadas também por escrito à secretaria do CEP/FORP/USP (16- 3315-0493 - Horário de atendimento das 8h às 12h, de segunda a sexta-feira), devendo conter seu nome que será mantido em sigilo.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20 ____.

Nome do responsável legal: _____.

Assinatura e CPF: _____.

Nome da criança ou adolescente: _____.

Amanda Silva Bertasso
CPF:400.928.298-30