



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOPEDIATRIA

XIOMARA BEATRIZ JIMÉNEZ POLANCO

**PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE
IMUNOGLOBULINAS DE CADEIA PESADA E LEVE EM LESÕES
PERIAPICAIS CRÔNICAS DE DENTES DECÍDUOS E
PERMANENTES**



Ribeirão Preto -SP
2021

XIOMARA BEATRIZ JIMÉNEZ POLANCO

**PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE
IMUNOGLOBULINAS DE CADEIA PESADA E LEVE EM LESÕES
PERIAPICAIS CRÔNICAS DE DENTES DECÍDUOS E
PERMANENTES**

Versão original

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Odontopediatria
Orientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche León

**Ribeirão Preto -SP
2021**

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Polanco, Xiomara Beatriz Jiménez.

Perfil imunoistoquímico comparativo da expressão de imunoglobulinas de cadeia pesada e leve em lesões periapicais crônicas de dentes decíduos e permanentes.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: León, JE.

1. Lesão periapical crônica; 2. Plasmócitos IgG4+; 3. Imunoglobulinas; 4. Cadeias leves de imunoglobulinas; 5. Cadeias pesadas de imunoglobulinas; 6. Dentes decíduos; 7. Dentes permanentes.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Polanco XBJ. Dissertação Perfil imunoistoquímico comparativo da expressão de imunoglobulinas de cadeia pesada e leve em lesões periapicais crônicas de dentes decíduos e permanentes.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de: Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche León.

Aprovado em: ____/____/ 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

XIOMARA BEATRIZ JIMÉNEZ POLANCO

Nascimento	20 de abril de 1991 – San Salvador– El Salvador
Filiação	Enrique Armando Jiménez Romero Aida Mercedes Polanco de Jiménez
2009-2017	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia da Universidad Evangélica de El Salvador-UEES
2017-2018	Curso em Endodontia Faculdade de Odontologia Faculdade de Odontologia da Universidad Evangélica de El Salvador-UEES
2019-2019	Curso Aperfeiçoamento em Pacientes Especiais Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
2019-2020	Curso de Especialização em Endodontia Faculdade de Odontologia de Bauru - USP
2018-2021	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível Mestrado (bolsa CNPq) Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

Dedicatória

Dedico este trabalho, primeiramente, à Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia. Aos meus pais, Enrique Jiménez Romero e Aida Polanco, e, também, aos meus irmãos Alejandro e Cristina.”

“Aos meus Professores, em especial, meu orientador Prof. Dr. Jorge Esquiche León. Meus amigos, especialmente, Amanda, Silvia, Carla, Heitor, Evânio e Beatriz, e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.”

“Dedico este trabalho aos meus avós paternos e maternos, *“In memoriam”*, pela existência de meus pais, e, pois sem eles este trabalho e muitos dos meus sonhos não se realizariam.”

“Ao Curso de Odontopediatria da FORP-USP, e às pessoas com quem convivi nesses espaços ao longo desses anos. A experiência de uma produção compartilhada na comunhão com amigos, nesses espaços, foram a melhor experiência da minha formação acadêmica.”

Agradecimentos

Agradeço à meu orientador Prof. Dr. Jorge Esquiche León, pelos conhecimentos compartilhados, por sua cordialidade, paciência e confiança.

Aos professores do Curso de Mestrado em Odontopediatria, pelos conhecimentos compartilhados ao longo do tempo, em especial, à Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva, Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula Silva e a Profa. Kranya Vizctoria Diaz; Por me motivar, compartilhar o conhecimento e sempre ser um exemplo de profissionais

Agradeço à FORP/USP, por me permitir realizar este Mestrado, e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários da FORP-USP, pela presteza e atendimento quando nos foi necessário.

Aos meus amigos, pelas risadas, por estarem presentes e por toda ajuda, por contribuírem nesta obra.

À minha família, por todo o apoio em horas difíceis. À minha mãe e meu pai, por me mostrar o amor para a Odontologia e os caminhos da ciência. A minha irmã Cristina e meu irmão Enrique, por estarem sempre a me apoiar e incentivar, mesmo a distância.



A presente Dissertação foi desenvolvida nos seguintes Laboratórios:

- Laboratório de Microscopia, do Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.
- Laboratório de Histopatologia, do Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.
- Laboratório de Imunopatologia e Análise Genética do Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

RESUMO

Polanco XBJ. Dissertação. Perfil imunoistoquímico comparativo da expressão de imunoglobulinas de cadeia pesada e leve em lesões periapicais crônicas de dentes decíduos e permanentes. (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

OBJETIVO: Estudos recentes sugerem que citocinas liberadas por células imunes adaptativas e inatas podem regular a infiltração tissular de plasmócitos IgG4+. Diferente da dentição permanente, o perfil imunoistoquímico dos plasmócitos presentes na lesão periapical crônica (LPC) na dentição decídua é desconhecido. O objetivo deste estudo foi caracterizar subgrupos de plasmócitos em LPCs afetando dentes permanentes e decíduos.

METODOLOGIA: Somente LPCs sem tratamento endodôntico foram selecionadas. 21 cistos radiculares (CRs) e 07 granulomas periapicais (GPs) afetando dentes permanentes, e 19 CRs e 04 GPs afetando dentes decíduos, foram avaliados através de imunomarcadores para cadeia leve de imunoglobulina (Ig) (kappa e lambda), cadeia pesada de Ig (IgG, IgG4, IgA, IgM e IgD), bem como imunomarcadores de plasmócitos (MUM1/IRF4, EMA e CD138).

RESULTADOS: Todos os casos foram policlonais (similar proporção Kappa/Lambda). A IgG foi a mais abundante quando comparada com as outras cadeias pesadas de Ig (todos, $p < 0,001$), e semelhante às cadeias leves de Ig, porém diferente da IgA, houve maior expressão na dentição primária do que permanente, tanto no CR ($p < 0,001$) e GP ($p > 0,05$). Destaca-se, por outro lado, que a expressão de IgG4 foi maior na dentição permanente do que na primária, tanto no CR ($p < 0,01$) e GP ($p > 0,05$). A expressão de IgM e IgD foi escassa e variável, enquanto as populações de plasmócitos foram detectadas eficientemente através dos marcadores EMA, CD138 e MUM1/IRF4, com este último sendo mais sensível, em ambas as dentições.

CONCLUSÕES: Nossos resultados mostram ligeiras variações no perfil de cadeias leves e pesadas de Ig nas LPCs, comparando as dentições permanente e decídua, sugerindo alterações imunes relacionadas à idade. Relevantemente, a participação de plasmócitos IgG4+, modulando respostas inflamatórias nas LPCs na dentição permanente do que na decídua, deverá ser considerada.

Palavras-Chaves: Lesão periapical crônica; Plasmócito IgG4+; Imunoglobulina; Cadeias leves de imunoglobulinas; Cadeias pesadas de imunoglobulinas; Dentes decíduos; Dentes permanentes; Imunoistoquímica.

ABSTRACT

Polanco XBJ. Comparative immunohistochemical profile of heavy and light chain immunoglobulins expression in chronic periapical lesions arising from deciduous and permanent teeth. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

AIM: Recent studies suggest that cytokines released from innate and adaptive immune cells can mediate infiltration of IgG4+ plasma cells into tissue. Unlike the permanent dentition, the immunohistochemical (IHC) profile of chronic periapical lesion (CPL)-infiltrating plasma cells in primary dentition is unknown. The aim of this study was to characterize plasma cell subsets in CPLs affecting permanent and primary teeth.

METHODOLOGY: Only CPLs without endodontic treatment were selected. 21 one radicular cysts (RCs) and 07 periapical granulomas (PGs) affecting permanent teeth, and 19 RCs and 04 PGs affecting primary teeth, were assessed through immunoglobulin (Ig) light chain (kappa and lambda), Ig heavy chain (IgG, IgG4, IgA, IgM, and IgD), as well as plasma cell (MUM1/IRF4, EMA and CD138) IHC markers.

RESULTS: All cases were polyclonal (similar kappa/lambda ratio). The IgG was the most abundant when compared to other Ig heavy chains (for all, $p < 0.001$), and similar to Ig light chains, but different from IgA, there was a greater expression in the primary than permanent dentition, for both RC ($p < 0.001$) and PG ($p > 0.05$). Noteworthy, conversely, the IgG4 expression was higher in the permanent than primary dentition, for both RC ($p < 0.01$) and PG ($p > 0.05$). The IgM and IgD expression was scarce and variable, whereas plasma cell populations were detected efficiently through EMA, CD138 and MUM1/IRF4 markers, the latter being the more sensitive, in both dentitions.

CONCLUSIONS: Our results show slight variations in the Ig light and heavy chain profiles in CPLs when comparing permanent and primary dentition, which suggest age-related immune changes. Notably, the participation of IgG4+ plasma cells modulating inflammatory responses in CPLs of the permanent than primary dentition should be considered.

Keywords: Chronic periapical lesion; IgG4+ plasma cell; Immunoglobulin; Light chain of immunoglobulin; Heavy chain of immunoglobulin; Deciduous teeth; Permanent teeth; Immunohistochemistry.

LISTA DE SIGLAS

ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
IQ	Imunoistoquímico
LPC	Lesão periapical crônica
CR	Cisto Radicular
GP	Granuloma Periapical
Ig	Imunoglobulina, gammaglobulina ou anticorpos
PMNs	Polimorfonucleares
NK	Células exterminadoras naturais

SUMÁRIO

1. Introdução	23
1.1. Lesão periapical	23
1.1.1. Características clinicopatológicas dos granulomas periapicais	23
1.1.1.1. Características clínicas	23
1.1.1.2. Características radiográficas	24
1.1.1.3. Características microscópicas	24
1.1.2. Características clinicopatológicas dos cistos radiculares	24
1.1.2.1. Características clínicas	24
1.1.2.2. Características microscópicas	25
1.2. Sistema imune	26
1.2.1. Primeira linha de defesa	26
1.2.2. Segunda linha de defesa - O Sistema Imune Inato	26
1.2.3. Terceira Linha de Defesa - O Sistema Imune Adaptativo	27
1.2.4. Linfócitos B	27
1.2.5. Anticorpos	28
1.2.6. Tipos de imunoglobulinas de acordo com o tipo de cadeia pesada ou cadeia leve	28
2. Proposição	35
2.1. Objetivos Geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. Material e Métodos	39
3.1. Seleção da amostra	39
3.2. Dentes decíduos	39
3.3. Etapa cirúrgica	40
3.4. Processamento histotécnico	40
3.5. Dentes permanentes	41
3.6. Análise histopatológica dos cortes corados com H&E	42
3.7. Processamento e análise imunoistoquímica	42
3.8. Análise Estatística	45
4. Resultado	49
5. Discussão	57
6. Conclusão	63
7. Referências	67

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Lesão periapical

A lesão periapical crônica (LPC) define um processo inflamatório crônico localizado na região periapical (porção apical dentária, ligamento periodontal e osso alveolar), decorrente da presença de microrganismos e toxinas no interior do sistema de canais radiculares. Nesses casos, a necrose da polpa dentária pode ser induzida por lesão cariosa, trauma dentário ou procedimento odontológico (García et al., 2015; Natkin et al., 1984).

Os componentes estruturais de uma LPC dependem do equilíbrio entre os fatores microbiológicos bem como a defesa do hospedeiro. Desta maneira, quando a infecção pulpar se estende pelo periápice radicular, uma resposta inflamatória do tecido conjuntivo em localização periapical é produzida, suportada por um estroma frouxo de tecido conjuntivo (Ricucci et al., 2006; Vier et al., 2004).

A LPC, afetando dentes decíduos e permanentes, pode ser classificada pela histopatologia como granuloma periapical (GP) ou cisto radicular (CR) ou periapical, sendo ambas as lesões provenientes de uma necrose pulpar, isto é, de origem endodôntica ou odontogênica (Neville, 2016; Ricucci et al., 2006; Vier et al., 2004).

1.1.1. Características clinicopatológicas dos granulomas periapicais

1.1.1.1. Características clínicas

A maioria dos GPs são assintomáticos e, geralmente, descobertos por meio de exame radiográfico de rotina (Mass et al., 1995). Todavia, a lesão pode desencadear dor ou sensibilidade se ocorrer uma exacerbação aguda. Frequentemente, o dente envolvido não apresenta mobilidade ou sensibilidade significativa à percussão. Além desses aspectos clínicos, o dente envolvido não responde aos testes pulpares térmicos ou elétricos (Neville, 2016; Neto et al., 2004).

1.1.1.2. Características radiográficas

Em exames radiográficos, os GPs apresentam-se como lesões radiolúcidas, podendo ser lesões pequenas, quase imperceptíveis, até lesões radiolúcidas excedendo 2,0 cm de diâmetro. Os dentes acometidos podem apresentar perda da lâmina dura. A lesão pode ser bem circunscrita ou mal definida e pode ou não apresentar um halo radiopaco circundante (Carrillo et al.,2008; Neville, 2016).

1.1.1.3. Características microscópicas

De acordo com a Academia Americana de Endodontia (2019), o GP está constituído microscopicamente por um tecido de granulação adjacente ao ápice de um dente com necrose pulpar, e caracterizado por apresentar células inflamatórias crônicas como linfócitos, plasmócitos, macrófagos xantomatosos e, às vezes, células gigantes multinucleadas, e menos frequentemente mastócitos e eosinófilos, suportados por estroma de tecido conjuntivo fibrovascular. O GP representa uma reação de defesa ao conteúdo do canal radicular de um dente com polpa necrosada (Torabinejad & Kettering, 1982; Novaes, 2016; Neville, 2016).

1.1.2. Características clinicopatológicas dos cistos radiculares

1.1.2.1. Características clínicas

Os CRs, geralmente não apresentam sintomas, a menos que exista uma exacerbação inflamatória aguda. A lesão é mais comum em molares mandibulares, quando o cisto atinge um tamanho significativo, podendo apresentar tumefação e sensibilidade discreta. Com o crescimento do CR, podem ocorrer mobilidade e deslocamento dos dentes adjacentes. O dente de origem não responde ao teste pulpar térmico e elétrico (OMS 2017, Neville, 2016; Lin et al.,2009).

O CR é o cisto mais frequente dos maxilares, representando 39,3% % de todos os cistos odontogênicos inflamatórios (Louredo et al., 2007).

Comumente afeta a dentição permanente; os dentes decíduos são pouco frequentes, uma vez que representam entre 0,5% ao 3,3% do total dos CRs (Mass et al.,1995).

É possível que a prevalência dos CRs nos dentes decíduos seja maior do que a previamente documentada, porque essas lesões geralmente resolvem-se após a extração dentária. Além disso, infecções pulpares nos dentes decíduos tendem a drenar mais facilmente por um trajeto fistuloso através da gengiva, o que favorece uma diminuição da pressão cística e, conseqüentemente, causam menos sintomas, o que significa que muitas vezes eles não são tratados ou diagnosticados (OMS 2017; Neville, 2016; Mass et al., 1995,).

Características radiográficas

Os CRs radiograficamente podem simular GPs. Observa-se perda da lâmina dura ao longo da raiz adjacente e uma imagem radiolúcida arredondada circunda o ápice do dente acometido. A reabsorção radicular não é incomum. Podem se desenvolver até mesmo como imagens radiolúcidas periapicais pequenas, e o tamanho radiográfico da lesão não pode ser utilizado como critério para o diagnóstico definitivo. Com o crescimento, a imagem radiolúcida muitas vezes se torna achatada, conforme a lesão se aproxima dos dentes adjacentes (Neville, 2009).

Os CRs também são conhecidos por envolvimento em dentes decíduos, principalmente associados aos molares, e aparecem como uma zona radiolúcida circundante às raízes e que preenche o espaço interradicular na região de furca (OMS 2017; Neville, 2009; Carrillo et al., 2008).

1.1.2.2. Características microscópicas

Segundo a Associação Americana de Endodontia (2019), o CR apresenta microscopicamente uma cavidade central revestida por epitélio, estando aberta e contínua com o canal radicular. Especificamente, o CR está constituído por um revestimento epitelial estratificado escamoso de variável espessura (podendo apresentar exocitose, espongirose e hiperplasia), o qual delimita uma cavidade cística central. Na parte periférica, pode ser observada uma cápsula cística composta de um tecido conjuntivo fibrocelular associado com numerosas células inflamatórias, tais como plasmócitos, linfócitos, macrófagos, seguidos por neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (Meghji et al., 1996).

1.2. Sistema imune

O sistema imune é responsável pelo reconhecimento e pela resposta contra antígenos (patógenos), ou outros agentes agressores externos ou internos, para manter a homeostasia (equilíbrio), sendo essa resposta imune a que determina a aquisição ou não de uma determinada doença, bem como a duração da mesma.

O sistema imunológico pode ser dividido basicamente em três linhas de defesa que se complementam, com o intuito de conferir proteção ao nosso organismo. Abaixo podemos observar as características de cada uma delas (Maria et al., 2002).

1.2.1. Primeira linha de defesa

A primeira linha de defesa é responsável por bloquear mais de 85% dos patógenos, a sua ação é primordial para que os patógenos não atinjam a corrente sanguínea. Dentro dela atuam fatores mecânicos, fatores químicos e fatores biológicos (Abbas, 2015; Maria et al., 2002).

1.2.2. Segunda linha de defesa - O Sistema Imune Inato

Quando a primeira linha de defesa não consegue conter a entrada do patógeno, a segunda linha de defesa entra em ação. Esta linha de defesa consiste em combater os microrganismos que entram no organismo, incitando mecanismos de defesa celulares e bioquímicos, os quais já existiam antes do estabelecimento de uma infecção ou agressão. Trata-se de um mecanismo inato, que não mudarão durante toda a vida.

Os componentes celulares do sistema imune inato incluem células dendríticas (CDs), fagócitos (macrófagos e neutrófilos), granulócitos e células NK. Considerando a sua especificidade, o sistema imune inato possui habilidade de reconhecer padrões moleculares, ainda que não seja tão representativo quanto ao sistema imune adaptativo.

Deste modo, esta linha de defesa possui baixa especificidade, sendo capaz de reconhecer microrganismos que expressam determinado padrão molecular, mas não diferenciando-os entre si (Abbas, 2015; Maria et al., 2002).

1.2.3. Terceira Linha de Defesa - O Sistema Imune Adaptativo

O sistema imune adaptativo (adquirido ou específico), como seu próprio nome diz, é adquirido decorrente do contato com uma substância estranha, ou seja, após exposição à patógeno. O primeiro contato com uma substância estranha ocasiona uma série de eventos que induzem uma resposta imunitária específica para aquela determinada substância.

A imunidade adquirida ainda pode ser dividida em dois grupos que interagem entre si, com o intuito de eliminar o antígeno. Um dos grupos é mediado essencialmente pelos linfócitos B e os anticorpos circulantes, chamado de imunidade humoral. O outro grupo é mediado por linfócitos T (derivados do timo), que atacam o antígeno através da liberação de citocinas, este grupo é chamado de imunidade celular (Abbas, 2015; Maria et al., 2002).

1.2.4. Linfócitos B

Os linfócitos B, derivam da medula óssea e se desenvolvem em órgãos linfoides secundários (linfonodos e baço), e quando ativados, proliferam e se diferenciam em plasmócitos, que são as células efetoras da linhagem B, cuja função principal é a produção de anticorpos. O receptor de antígeno da célula B é uma molécula de imunoglobulina ligada à membrana, que a célula B usa para a sua ativação e diferenciação em plasmócitos e células B de memória. Os anticorpos são moléculas secretadas pelos plasmócitos, pertencentes ao grupo das gamaglobulinas. A imunidade humoral é mediada por células B e plasmócitos, e consiste na secreção de anticorpos liberados no sangue e em outros líquidos orgânicos, como resultado de efeitos protetores (Abbas, 2015; Maria et al., 2002).

Os anticorpos circulam no plasma sanguíneo e linfa. Sua função é detectar e destruir, através de ligações específicas, microrganismos patogênicos e toxinas encontrados nos espaços extracelulares do corpo, facilitando a ingestão pela célula fagocitária ou pela ativação de um sistema de proteínas do sangue, coletivamente denominado sistema do complemento (Abbas, 2015; Junqueira et al., 2013; Maria et al., 2002).

1.2.5. Anticorpos

Os anticorpos, ou imunoglobulinas (Igs), são formados estruturalmente por quatro cadeias: duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, as quais estão unidas entre si por pontes dissulfeto, resultando em uma molécula na forma de “Y”. As duas cadeias pesadas (cadeia H) e as duas cadeias leves (cadeias L) de uma molécula de Ig são idênticas; entretanto apenas a fração Fab é característica de cada tipo de Ig, o que lhe confere alta especificidade.

As cadeias leves são chamadas Kappa (K) e Lambda (L). Por outro lado, existem cinco tipos de cadeias pesadas que determinam as diferenças nas funções imunológicas importantes tais como IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Interessantemente, a variedade de Igs produzidas nas LPCs são determinadas pelas populações de plasmócitos que se encontram em grande quantidade permeando o tecido de granulação nestas lesões (Abbas, 2015; Junqueira et al., 2013).

1.2.6. Tipos de imunoglobulinas de acordo com o tipo de cadeia pesada ou cadeia leve

1.2.6.1. Cadeias pesadas

1.2.6.1.1. IgG

São as Igs mais abundantes, representam 80% do plasma sanguíneo, sua estrutura é um monômero. Há pelo menos quatro subclasses de IgG. Predominam na resposta imune secundária e tem atividade antitoxina. Tem a função de ativar o sistema complemento, facilitando assim a fagocitose. Eles atravessam a placenta, conferindo imunidade ao recém-nascido. Estas Igs medeiam a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), que é um processo lítico que várias populações celulares exercem, tais como linfócitos T citotóxicos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e especialmente as células NK (células naturais assassinas) e que exige que a célula alvo esteja revestida por IgG específica (Maria et al., 2002; Junqueira et al., 2013).

Na literatura científica, há evidências indicando que a IgG é predominante no citoplasma de plasmócitos em GPs e CRs de dentes permanentes (Pulver et al., 1978).

No estudo de Matthews et al. (1983), os quais avaliaram GPs de dentes permanentes, observaram predominância de IgG. No estudo de Naidorf et al. (1975), indica elevados níveis de IgG em CRs e GPs de dentes permanentes. Similarmente, outro estudo mostrou que a IgG foi a mais abundante em LPCs na dentição permanente (Stern et al., 1981).

1.2.6.1.2. IgG4

A IgG está constituída de 4 subclasses (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). A IgG4, é a menos comum. No entanto, parece desempenhar um papel significativo nas reações alérgicas. Ainda, parece não ativar o sistema do complemento e tem pouca afinidade por antígenos alvos (Maria et al., 2002; Junqueira et al., 2013).

Após a revisão de literatura, há apenas um estudo (Strehl et al., 2011) o qual avalia a presença de plasmócitos IgG4+ em LPCs na dentição permanente. No entanto, relevantemente, há falta de estudos em LPCs afetando dentes decíduos avaliando a expressão de IgG4, a qual impossibilita uma análise comparativa com LPCs em dentes permanentes.

1.2.6.1.3. IgM

São Igs de alto peso molecular, em forma pentamérica, e representam 5%-10% das Igs no plasma sanguíneo; sua expressão ocorre durante o desenvolvimento das células B e estão associadas a uma resposta imune primária (Schroeder & Cavacini, 2010). A sua função é ativar o sistema do complemento e agir como opsoninas (revestimento); estas Igs cobrem o antígeno e facilitam a fagocitose por macrófagos (Maria et al., 2002; Junqueira et al., 2013).

Poucos estudos avaliam a expressão de IgM nas LPCs na dentição permanente. Destes, há dois estudos, os quais avaliaram a expressão de IgM em GPs e CRs, sem diferença significativa entre estas lesões (Pulver et al., 1978; Stern et al., 1981). E, no estudo de Matthews et al. (1983), os GPs dos dentes permanentes apresentaram escassas células IgM positivas.

1.2.6.1.4. IgA

Esta Ig é o anticorpo predominante nas superfícies mucosas e nas secreções, incluindo a saliva e o leite materno, e constitui um importante defesa contra infecções bacterianas e virais, representando 10%-15% das Ig no plasma sanguíneo (Schroeder & Cavacini, 2010). Sua estrutura é um dímero com componente secretor. A IgA não atravessa a placenta, mas pode ser transmitida ao recém-nascido através do colostro. Notavelmente, os eosinófilos, através da expressão do receptor IgA, medeiam a ADCC localmente (Junqueira et al., 2013).

Na literatura, alguns estudos são descritos sugerindo que plasmócitos IgA positivos são predominantes nos CRs do que nos GPs em dentes permanentes (Skaug et al., 1976; Pulver et al., 1978; Torabinejad et al., 1981). A IgA foi a segunda Ig mais prevalente nas LPCs em dentes permanentes (Stern et al., 1981; Torabinejad et al., 1981). Outros estudos avaliando presença de plasmócitos em LPCs (Matthews et al., 1983; Naidorf et al., 1975), mostraram a presença de escassas células IgA positivas nos GPs. Todavia, há falta de estudos em LPCs de dentes decíduos avaliando a expressão de IgA e que possibilite uma análise comparativa com LPCs em dentes permanentes.

1.2.6.1.5. IgD

Esta Ig está presente em pouca quantidade no plasma, constituindo 0,2% no plasma sanguíneo, com estrutura de monômero. Está presente nas mucosas e nas membranas celulares dos linfócitos B, e parece desempenhar um papel importante na diferenciação antigênica nos linfócitos (Junqueira et al., 2013).

Apenas um estudo, até o presente momento, avaliou a presença de IgD em GPs de dentes permanentes, detectando raras células IgD positivas (Matthews et al., 1983). Assim, há falta de estudos em CRs afetando dentes permanentes e em LPCs na dentição decídua avaliando a expressão de IgD.

1.2.6.1.6. IgE

É uma Ig escassa no plasma sanguíneo, sendo 0,002% do plasma sanguíneo; sua estrutura é um monômero. Está presente na membrana celular dos mastócitos e desempenha um papel importante em reações de hipersensibilidade imediata, anafilaxia e também nas reações parasitárias. A interação da IgE com um alérgeno induz a degranulação de mastócitos, liberando substâncias farmacologicamente ativas, tais como histamina, prostaglandinas e outros intermediários da resposta inflamatória (Maria et al., 2002; Junqueira et al., 2013).

Após a revisão da literatura, encontramos quatro estudos avaliando a expressão de IgE nos GPs e CRs na dentição permanente, sem diferença significativa entre estas lesões (Pulver et al., 1978; Stern 1981; Torabinejad et al., 1981; Matthews et al., 1983). No entanto, há falta de estudos em LPCs afetando dentes decíduos.

1.2.6.2. Cadeias leves

Todas as Igs compartilham a mesma estrutura de quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Os dois tipos de cadeias leves (Kappa e Lambda) têm um peso molecular de 22,5 kDa cada uma. Ambas as cadeias leves têm uma região constante e uma região variável e podem ser facilmente identificadas pelas propriedades antigênicas da sua região constante (Maria et al., 2002; Junqueira et al., 2013).

Estudos avaliando a expressão das cadeias leves de Igs, Kappa e Lambda, em CRs e GPs de dentes permanentes, mostraram que as cadeias leves foram igualmente distribuídas nestas lesões (Naidorf et al., 1975; Stern et al., 1981; Torabinejad et al., 1981).

2. Proposição

2. Proposição

2.1. Objetivos Geral

Identificar e quantificar, por meio da técnica imunoistoquímica, a expressão das cadeias pesadas de imunoglobulinas IgG, IgG4, IgA, IgM e IgD, bem como as cadeias leves de imunoglobulina Kappa e Lambda, em lesões periapicais crônicas de dentes decíduos e permanentes.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar e quantificar de cadeias pesadas de imunoglobulina IgG, IgG4, IgA, IgM, IgD, em lesões periapicais crônicas de dentes decíduos e permanentes.

- Analisar a proporção de plasmócitos IgG4/IgG em lesões periapicais crônicas de dentes decíduos e permanentes.

- Analisar e quantificar de cadeias leves de imunoglobulina Kappa e Lambda, em lesões periapicais crônicas de dentes decíduos e permanentes.

- Analisar e quantificar dos marcadores CD138, MUM1/IRF4 e EMA, em lesões periapicais crônicas de dentes decíduos e permanentes.

- Comparar a prevalência das cadeias pesadas e leves de imunoglobulinas em lesões periapicais crônicas de dentes decíduos e permanentes e estabelecer correlações clinicopatológicas.

3. Material e Métodos

3. Material e Métodos

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) (CAAE: 80253417.60000.5419).

3.1. Seleção da amostra

Para a presente pesquisa, foram utilizados 23 dentes decíduos com LPC, os quais tinham indicação de extração, sem possibilidade de tratamento restaurador. Também foram incluídas 28 dentes permanentes com LPC, armazenados nos arquivos do Laboratório de Histopatologia Oral, do Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal (DESCOL) da FORP/USP.

3.2. 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 e que não foram submetidos à antibioticoterapia há pelo menos três meses. Os responsáveis pelos pacientes foram informados a respeito do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), autorizando a participação na pesquisa.

Assim, foram selecionados 23 dentes decíduos com indicação de exodontia (primeiros e segundos molares decíduos, superiores e inferiores) com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente, sem tratamento prévio, com extensa destruição coronária em função de lesões de cárie impossibilitando o tratamento restaurador, com ausência de dor e presença/ausência de fístula. Para seleção dos dentes, foi realizada a anamnese, o exame clínico e o exame radiográfico, tendo como base a ficha da disciplina de Odontopediatria da FORP/USP.

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

3.3. Etapa cirúrgica

Os dentes decíduos foram extraídos na Clínica de Odontopediatria, por um único cirurgião-dentista. Nos casos onde a lesão não foi removida juntamente com as raízes, foi efetuada a sua preensão com pinça hemostática, divulsão com cureta e corte com bisturi lâmina 15. Em seguida, quando necessário, foi realizada a sutura da área.

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

3.4. Processamento histotécnico

A lesão removida foi fixada por, no máximo, 24 horas, sendo a seguir lavada por 24 horas, desidratada em álcool, diafanizada em xilol e incluída em parafina. A partir dos blocos de parafina, foram realizados 10 cortes seriados de 3 micrometros cada, montados em lâminas. Um dos cortes foi corado com Hematoxilina e Eosina (H&E), para o diagnóstico histopatológico das lesões. Os demais cortes sequenciais foram montados em lâminas silanizadas, para realização da técnica imunohistoquímica, pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (Andrade et al., 2012; Bezerra da Silva et al., 2014; Hidalgo et al., 2016). (Figura 9).

De acordo com o laudo emitido por um patologista experiente, após análise dos cortes corados com H&E, dos 23 dentes decíduos extraídos, 19 eram CRs e 4 eram GPs.



Figura 9- A presente imagem ilustra a sequência do passo-a-passo do processamento histotécnico.

3.5. Dentes permanentes

Foram utilizados 28 dentes permanentes (primeiros e segundos molares; superiores e inferiores) com LPCs, incluídos em parafina, obtidos do Arquivo do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal da FORP/USP que, após processamento histológico de rotina (corte e coloração com H&E), tiveram diagnóstico histopatológico confirmado de CR (n=21) e GP (n=7).

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

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

Imagens radiográficas representativas dos casos selecionados para o presente estudo estão apresentadas na Figura 10.

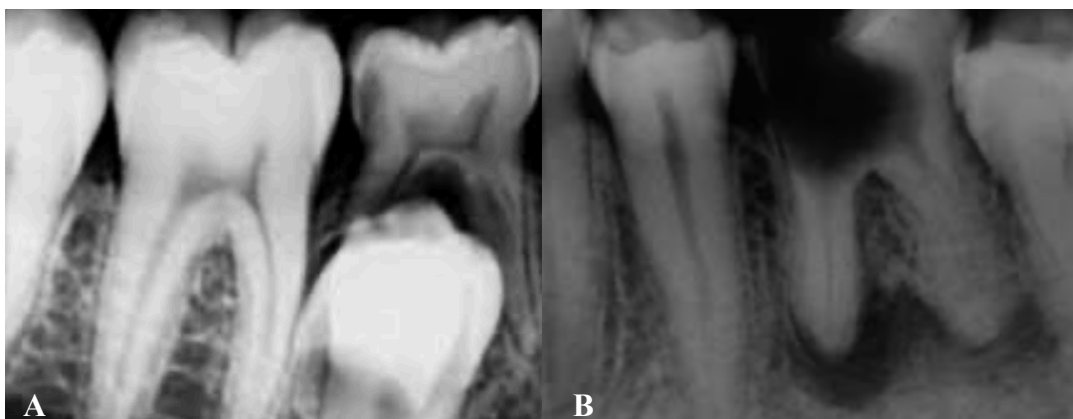


Figura 10 - Imagens radiográficas representativas das lesões coletadas de dentes decíduos (A) e permanentes (B).

3.6. Análise histopatológica dos cortes corados com H&E

As lâminas coradas com H&E foram analisadas em microscópio Axio Imager M1 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Gottingen, Alemanha), por um patologista experiente ($Kappa > 0,9$). Os espécimes foram avaliados em aumentos de x10 e x40, a fim de verificar a presença/ausência de células inflamatórias e caracterizar o grau do infiltrado inflamatório crônico.

3.7. Processamento e análise imunoistoquímica

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

Em seguida, as lâminas foram lavadas com o tampão Dako (S3006) (Dako Wash Buffer, código S3006, Carpinteria, CA, EUA), diluído a 1:10 em água destilada e incubadas com o anticorpo secundário 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 Carrazzi, durante 2 minutos, e a diferenciação da hematoxilina por meio da lavagem com água destilada (20 vezes), seguida da desidratação em álcool absoluto (3 trocas), diafanização em xilol e montagem em Entellan (Figura11).



Figura 11- Sequência do passo-a-passo da técnica de imunohistoquímica realizada no presente estudo.

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 $\times 10$, e $\times 40$, conforme preconizado por Gonçalves et al. (2012). No aumento de $\times 10$ foram escolhidas as áreas que apresentavam maior quantidade de células imunomarcadas. No aumento de $\times 40$, foram fotografados 5 campos representativos de cada espécime. Após a captura das imagens foi utilizado o software Image J 1.28 (National Same patterns of

Health, Bethesda, EUA) para registro da imunomarcção (presença/ausência) e posterior quantificação do número de células imunomarcadas.

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 a serem utilizados, para identificação dos diferentes tipos celulares.

Tabela 1. Especificações dos anticorpos primários utilizados neste estudo.

Anticorpo	Clone	Diluição	Fornecedor
IgM	8H6	1:1,000	Leica Biosystems, Newcastle, UK
IgG	DRN1C	1:40,000	Leica Biosystems, Newcastle, UK
IgG4	EP138	1:1,000	BioSB, Santa Barbara, USA
IgA	N1CLA	1:1,000	Leica Biosystems, Newcastle, UK
IgD	DRN1C	1:1,000	Leica Biosystems, Newcastle, UK
Kappa	Policlonal	1:60,000	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
Lambda	Policlonal	1:60,000	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
MUM1/IRF4	EAU32	1:500	Leica Biosystems, Newcastle, UK
CD138	MI5	1:500	DakoCytomation, Glostrup, Denmark.
EMA	E29	1:1,000	DakoCytomation, Glostrup, Denmark

3.8. Análise Estatística

A normalidade foi verificada usando o teste de *Shapiro-Wilk* e, de acordo com a distribuição dos dados, os grupos foram analisados pelo teste t de *Student* ou *Mann-Whitney U* e *Friedman*, seguido pelo teste de comparação múltipla de *Dunn*. As relações entre os marcadores imunistoquímicos e as variáveis clínicopatológicas foram analisadas pela correlação de Spearman. A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc. EUA). $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. Resultados

4. Resultado

Pela análise histopatológica, todos os casos mostraram características típicas de CR ou GP. Nenhum dos casos apresentou fibrose significativa, menos ainda com padrão estoriforme ou flebite obliterativa. No entanto, em todos os casos, foram visualizados graus variados de infiltrado linfoplasmocítico permeado por neutrófilos, macrófagos e mastócitos.

Todos os casos foram policlonais (similar proporção Kappa/Lambda); no entanto, houve maior expressão de ambos os marcadores da cadeia leve na dentição decídua do que na permanente, quando comparados os CRs (kappa, $p < 0,01$; lambda, $p < 0,01$) e os GPs (kappa, $p > 0,05$; lambda, $p > 0,05$) (Figura 12).

A IgG foi a mais abundante quando comparada com outras cadeias pesadas de Ig (todas, $p < 0,001$) e, semelhante às cadeias leves de Ig, houve maior expressão na dentição decídua do que permanente, tanto para CRs ($p < 0,001$) quanto para GPs ($p > 0,05$) (Figura 12).

Destaca-se, por outro lado, que a expressão de IgG4 foi maior na dentição permanente do que na decídua, tanto no CR ($p < 0,01$) e GP ($p > 0,05$) (Figura 12).

Na dentição decídua e permanente, a média da proporção de plasmócitos IgG4+/IgG+ para CRs foi 6% e 23% ($p < 0,001$), e para GPs foi 5% e 11% ($p > 0,05$), respectivamente. A proporção de plasmócitos IgG4+/IgG+ variou de 0,01% a 32% nos CRs e de 1% a 7% nos GPs na dentição decídua; a proporção variou de 7% a 92% nos CRs, e de 0,01% a 57% nos GPs na dentição permanente. Somente 2 CRs e 1 GP na dentição permanente mostraram uma proporção de plasmócitos IgG4+/IgG+ $> 40\%$. Além disso, apenas 2 CRs na dentição decídua, bem como 4 CRs e 1 GP na dentição permanente, mostraram uma proporção de plasmócitos IgG4+/IgG+ $> 20\%$. (Figura 12).

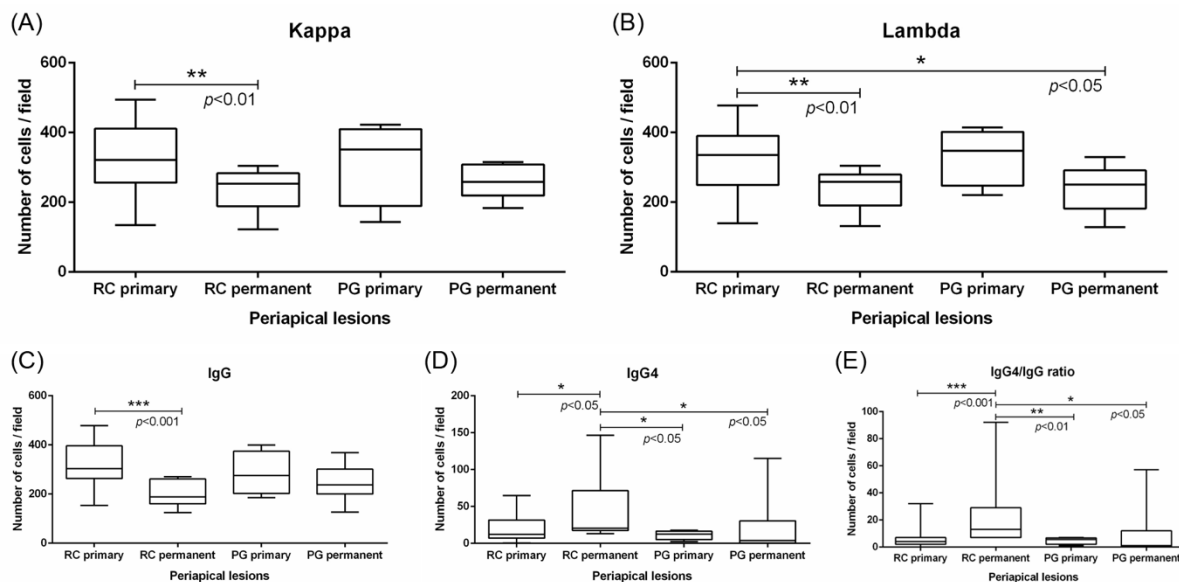


Figura 12- A expressão de Kappa e Lambda é maior em LPCs de dentes decíduos do que permanentes. No entanto, houve expressão semelhante (policlonal) dentro de cada grupo de LPC (A, B). A expressão de IgG foi maior nas LPCs de dentes primários do que permanentes; inversamente, a expressão de IgG4 e a proporção IgG4/IgG foi maior em LPCs de dentes permanentes do que decíduos (C-E).

Nas LPCs de ambas as dentições, a expressão de IgA, IgM e IgD mostrou uma ordem decrescente, com IgM e IgD mostrando os valores mais baixos. Considerando a IgA, os CRs ($p < 0,05$) e os GPs ($p < 0,05$) apresentaram uma maior expressão na dentição permanente, enquanto a expressão de IgM foi variável, sendo semelhante nos CRs, porém maior nos GPs ($p > 0,05$), na dentição permanente do que na decídua. Considerando a expressão de IgD, esta foi significativamente maior nos CRs da dentição decídua do que permanente ($p < 0,001$). Considerando os GPs, todos os casos na dentição decídua foram negativos para IgD, enquanto que 5 dos 7 casos na dentição permanente apresentaram escassas células positivas (Figura 13).

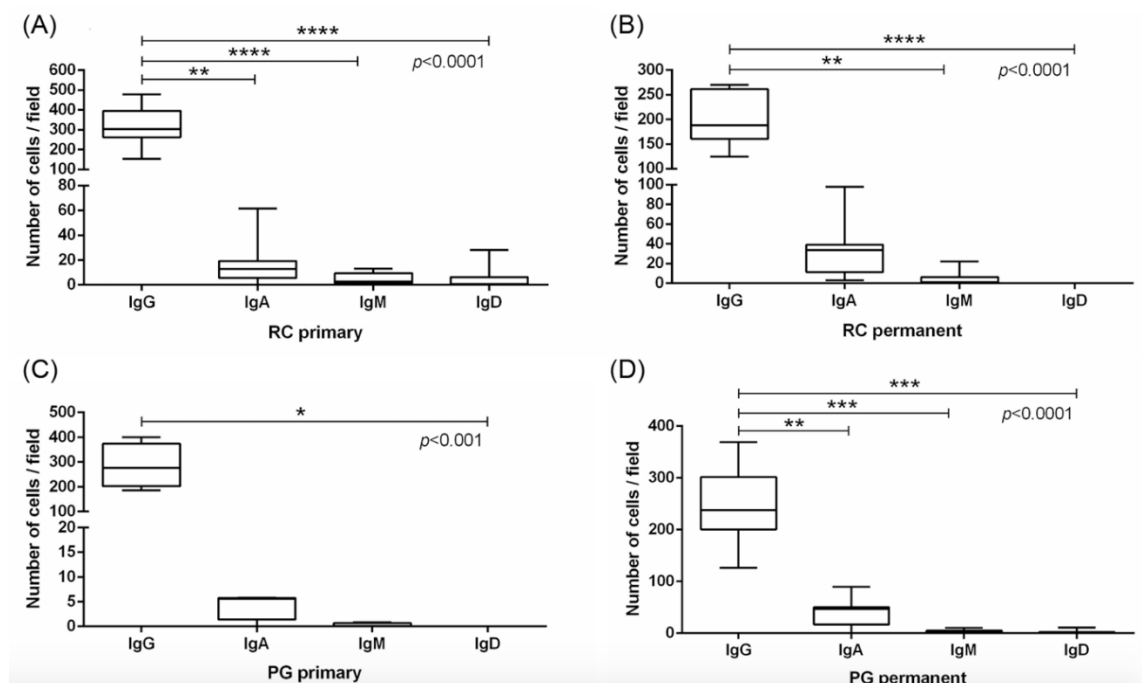


Figura 13 – LPCs de dentes decíduos e permanentes mostram maior expressão de IgG e IgA, respectivamente, nos CRs (A, B). No entanto, similar expressão é observada nos GPs (C, D). Note que as LPCs em ambas as dentições mostram escassas células IgM e IgD.

Considerando os marcadores de plasmócitos, sem diferenças estatisticamente significantes entre eles, o MUM1/IRF4 foi mais sensível na detecção de subtipos de plasmócitos, seguido por EMA e CD138 (Figura 14, 15, 16 e 17).

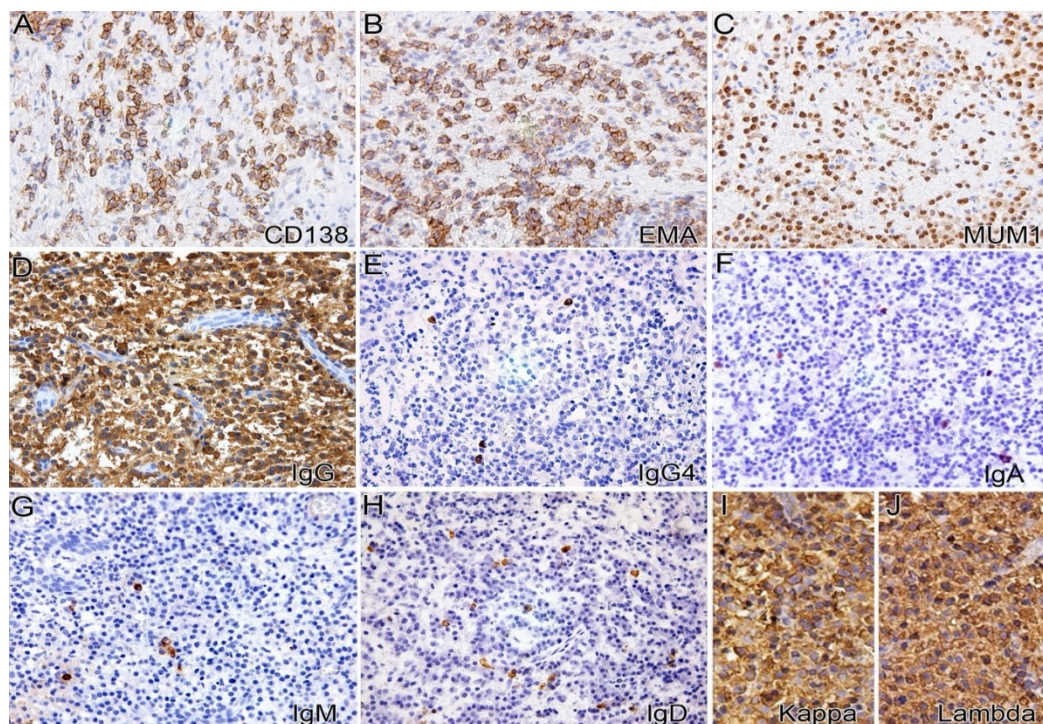


Figura 14 – Análise imunoistoquímica do perfil de plasmócitos em CRs na dentição decídua. Positividade homogênea para CD138, EMA e MUM/IRF4 (A-C). Observe numerosos plasmócitos positivos para IgG (D), rodeados por escassos plasmócitos IgG4+, IgA+ e IgM+ (E-G). Plasmócitos positivos para IgD não são incomuns (H). Os plasmócitos são policlonais (I, J) (todas as figuras, 40x).

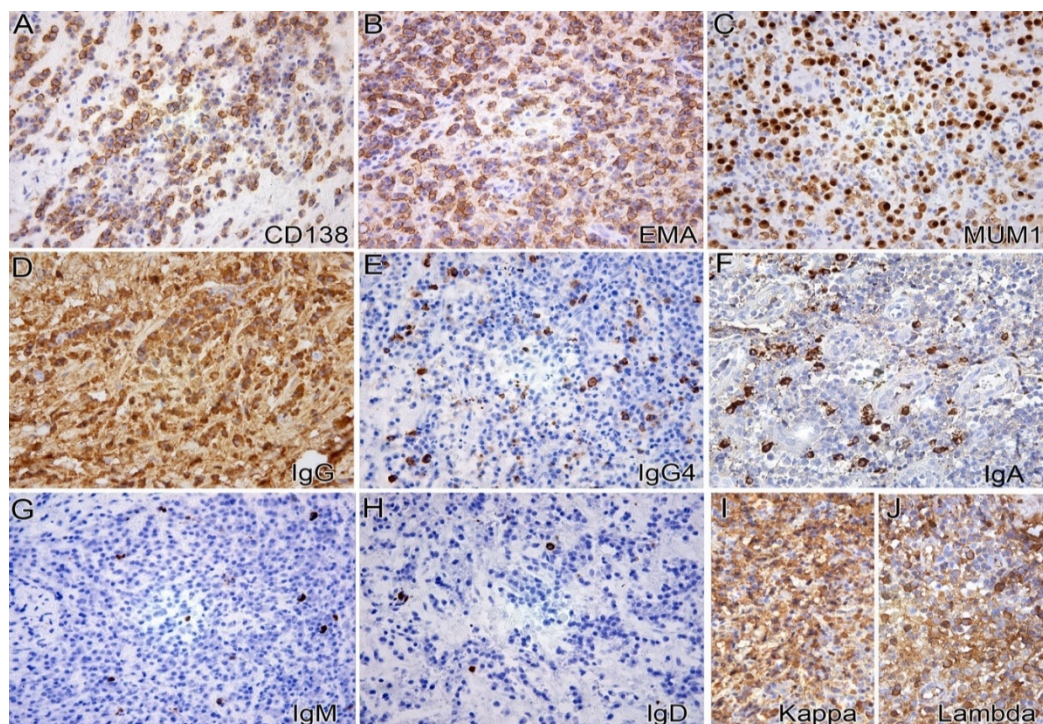


Figura 15 – Análise imunoistoquímica de plasmócitos em CRs de dentes permanentes. Forte expressão de CD138, EMA e MUM1/IRF4 (A-C), a maioria expressando IgG (D). Este caso mostra similar expressão de IgG4 e IgA (E, F), enquanto poucos plasmócitos foram IgM e IgD positivos (G, H). Plasmócitos policlonais (I, J) (todas as figuras, 40x).

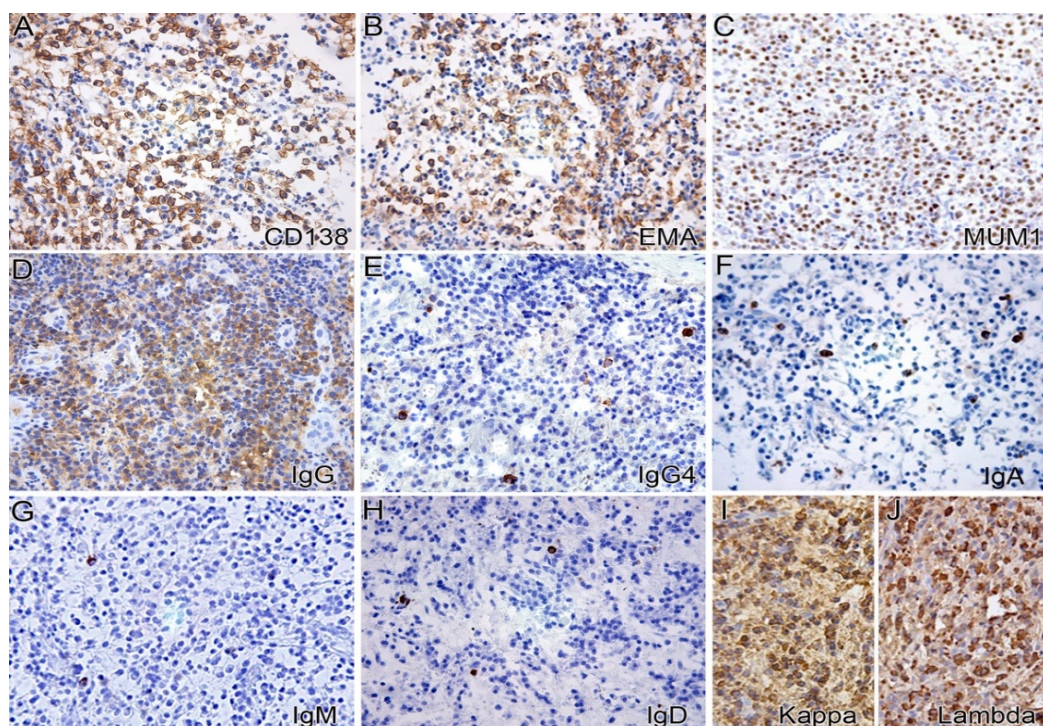


Figura 16 – Análise imunoistoquímica do perfil de plasmócitos em GPs de dentes decíduos. Positividade homogênea e forte para CD138, EMA e MUM1/IRF4 (A-C). A maioria dos plasmócitos são IgG positivos (D), porém escassamente positivos para IgG4, IgA, IgM e IgD (E-H), de natureza reativa (I, J) (todas as figuras, 40x).

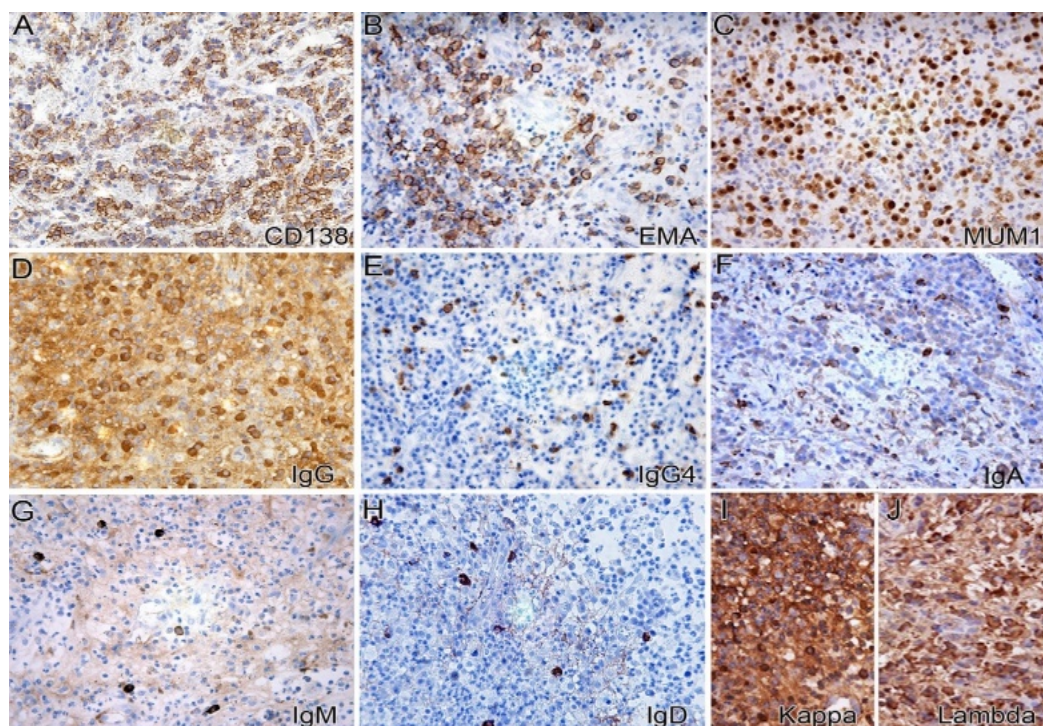


Figura 17 - Análise imunoistoquímica do perfil de plasmócitos em GPs de dentes permanentes. Plasmócitos exibindo forte expressão de CD138, EMA e MUM1/IRF4 (A-C), com a maioria sendo IgG positivos (D). A expressão de IgG4 e IgA foi evidente, diferente de IgM e IgD (E-H). A expressão de cadeias leves de Ig suportou uma natureza reativa (I, J) (todas as figuras, 40x).

5. Discussão

5. Discussão

Vários estudos avaliaram o perfil de Igs nas populações de plasmócitos nas LPCs afetando dentes permanentes (Takahashi et al., 1996; Smith et al. 1987; Matthews & Mason 1983; Torabinejad et al. 1981; Stern et al. 1981; Pulver et al. 1978; Skaug 1976; Naidorf 1975), os quais evidenciaram achados semelhantes com o presente estudo. De fato, as populações de plasmócitos são policlonais, sendo predominantes os plasmócitos IgG+, seguidas pelo plasmócitos IgA+, e em menor quantidade pelos plasmócitos IgM+ e IgD+. Além disso, o presente estudo avalia pela primeira vez a expressão de IgD nos CRs em dentes permanentes, confirmando níveis semelhantes aos observados nos GPs (Matthews & Mason 1983; Pulver et al., 1978).

É relevante que poucos estudos (Yang et al. 2018; Bolan et al., 2008; Mass et al., 1995) tenham avaliado LPCs na dentição decídua. Em nosso Serviço de Patologia Oral, os CRs são detectados com mais frequência (> 85%) do que os GPs, ao analisar LPCs na dentição decídua, o que está de acordo com estudo prévio (Mass et al., 1995). Além disso, parece possível que a prevalência de CRs na dentição decídua seja maior do que a documentada anteriormente (entre 0,5% e 3,3% de todos os CRs), porque essa lesão geralmente se resolve após a extração dentária. Além disso, as infecções pulpares que afetam os dentes decíduos geralmente tendem a drenar através de uma fístula gengival, seguindo um curso assintomático, o que significa que esses CRs geralmente não são tratados ou não são diagnosticados (Mass et al., 1995)

Curiosamente, através da imunoistoquímica, foi relatada a infiltração de células imunes (células T, células B, macrófagos) nas LPCs em dentes decíduos (Bertasso et al., 2020; Bolan et al., 2008). No entanto, vale ressaltar que o perfil de Igs dos plasmócitos nessas LPCs é desconhecido. No presente estudo, mostramos que a IgG foi a mais abundante e semelhante às cadeias leves de Ig, mas diferente da IgA, havia uma expressão maior na dentição decídua do que permanente, tanto para a CR quanto para a GP, enquanto a expressão de IgM e IgD foi escassa e variável, nas duas dentições. Esses achados refletem alterações significativas relacionadas à idade no perfil dos plasmócitos nas LPCs, sendo possível o estabelecimento de um processo de maturação e/ou seleção competitiva dessas populações celulares, visando respostas imunes específicas no microambiente do tecido periapical.

Notavelmente, a detecção desses anticorpos (IgG, IgA, IgM) nas LPCs parece estar relacionada à presença de vários microrganismos, os quais participam dos mecanismos etiopatogênicos nessas lesões (Kettering et al., 1991); no entanto, a distribuição semelhante das populações dos plasmócitos, como mostrado no presente estudo, expõe uma assinatura do resposta imune humoral, apoiando o conceito de infecção multibacteriana inespecífica nessas lesões (da Silva et al., 2006; Takahashi et al., 1996). Além disso, é necessário ter em mente a complexidade dessas respostas imunes, considerando que IgG e IgA consistem em quatro (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e duas (IgA1 e IgA2) subclasses, não sendo claro o mecanismo exato pelo qual os plasmócitos mudam dentro das subclasses de IgG e IgA (Vidarsson et al., 2014). De fato, essas populações distintas de plasmócitos foram descritas em LPCs de dentes permanentes. As proporções relativas de plasmócitos que expressam RNA mensageiro (mRNA) específicos da subclasse IgG em PGs e RCs, respectivamente, foram IgG1 (57,4% e 55,5%), IgG2 (34,1% e 34,6%), IgG3 (4,0% e 4,3%) e IgG4 (4,0% e 5,5%) (Takahashi et al., 1998). Assim, os níveis mais altos de IgG1 (com atividades pró-inflamatórias) e as menores quantidades de IgG4 (com propriedades não inflamatórias) (Yoshikawa et al., 2019) podem estar envolvidos nos mecanismos etiopatogênicos das LPCs. Nas LPCs, as células que expressam o mRNA da IgA1 são predominantes, enquanto as células positivas para o mRNA da cadeia J são escassas. A cadeia J é essencial para a construção molecular da IgA secretora, um anticorpo mucoso predominante que liga patógenos e micróbios comensais. Esses achados sugerem a ativação local da resposta imune periapical para IgA, diferente das respostas imunes da mucosa diméricas associadas a IgA (Takahashi et al., 1997). No presente estudo, observamos uma maior expressão de IgA na dentição permanente do que na decídua, o que pode indicar mecanismos moleculares ou celulares de adaptação ou maturação, após desafio antigênico secundário no microambiente periapical inflamado.

Como comentado acima, descrevemos pela primeira vez a infiltração de IgG4 por análise imunistoquímica em LPCs de dentes decíduos e permanentes. Diferentemente, um estudo anterior avaliou plasmócitos que expressam mRNAs específicos das diferentes subclasses de IgG por hibridização *in situ* em LPCs de dentes permanentes, mostrando que a IgG1 é predominante, seguida pela IgG2 e em menor quantidade por níveis semelhantes de IgG3 e IgG4 (Takahashi et al., 1998). No presente estudo, a expressão de IgG4 foi maior nas LPCs de dentes permanentes

do que decíduos. Relevantemente, a expressão de IgG4, semelhante à IgA, parece estar relacionada a alterações imunes relacionadas à idade e sugere que essas diferenças podem estar envolvidas, pelo menos em parte, com certas características clinicopatológicas, especialmente características microscópicas do estroma lesional.

Na cavidade oral, alguns estudos demonstraram a infiltração de plasmócitos IgG4+ em lesões inflamatórias crônicas ricas em plasmócitos específicas e inespecíficas (Cottom et al., 2015; Laco et al., 2015; Andrew et al., 2014; Strehl et al., 2011). Além disso, um único estudo avaliou LPCs, sem uma descrição detalhada em CRs ou GPs (Strehl et al., 2011), no qual a proporção média de plasmócitos IgG4/IgG foi 32%. No presente estudo, a proporção média de plasmócitos IgG4/IgG para CRs foi 6% e 23%, e para GPs foi 5% e 11%, na dentição decídua e permanente, respectivamente. Esses achados sugerem que os plasmócitos IgG4+ podem ser detectadas na maioria dos casos de LPCs, participando de seus mecanismos etiopatogênicos e devem ser considerados como tal. No entanto, é necessário enfatizar que a infiltração de plasmócitos IgG4+, conforme descrita no presente estudo, é diferente da doença relacionada ao IgG4 (IgG4-RD) (Yoshikawa, 2019; Cottom et al., 2015; Yamamoto et al., 2015; Andrew et al., 2014; Yamamoto et al., 2014; Detlefsen 2013; Strehl et al., 2011), uma condição fibroinflamatória que afeta múltiplos tecidos e/ou órgãos, e caracterizada microscopicamente por um infiltrado linfoplasmocítico denso, fibrose estoriforme e flebite obliterativa, com aumento da densidade de plasmócitos IgG4+ (razão de células IgG4+/IgG+ >40%). Além disso, diferentemente dos critérios diagnósticos para IgG4-RD, as características microscópicas dos nossos casos eram típicas de LPCs, e apenas 2 CRs e 1 GP na dentição permanente apresentaram uma proporção de plasmócitos IgG4+/IgG+ de >40%.

Em relação aos nossos resultados, a contribuição dos plasmócitos IgG4+ na patogênese da LPC deve ser elucidada. Como comentado acima, as subclasses de IgG são numeradas de acordo com sua concentração plasmática, sendo o IgG4 o anticorpo menos comum, enquanto o IgG1 representa mais de 50% do total de IgG (Pezzilli & Morselli-Labate 2010). A IgG2 é a principal fonte de anticorpos contra polissacarídeos bacterianos, enquanto a IgG4 está relacionada principalmente à produção de anticorpos induzidos por alérgenos (Detlefsen et al., 2013); no entanto, também foi considerada uma relação com infecção bacteriana e autoimunidade

relacionada com Th2 (Lehman et al., 2014). Estes últimos podem ajudar a entender nossos resultados.

O fator de ativação de células B (BAFF), produzido por células dendríticas, macrófagos e basófilos, induz a produção de IgG4 por plasmócitos (Yoshikawa et al., 2019). A interleucina (IL)-33 produzida por células imunes inatas (células dendríticas, macrófagos M2), bem como células epiteliais, ativa respostas Th2 e fibrogênicas. De fato, em pacientes com IgG4-RD, é observada uma expressão aumentada de IL-33, cujas citocinas a jusante incluem IL-13 e TGF- β 1 (Yoshikawa et al., 2019; Yamamoto et al., 2015; Yamamoto et al., 2014). A IL-13 é uma das moléculas pró-fibrogênicas prototípicas produzidas por basófilos, mastócitos, células linfóides inatas, células Th2 e macrófagos M2. Esses achados podem ajudar a explicar por que um estroma fibroso é mais evidente nas LPCs de dentes permanentes do que decíduos (Bertasso et al., 2020; Lima et al., 2011).

6. Conclusão

6. Conclusão

Nossos resultados mostram discretas variações no perfil de cadeias leves e pesadas de Ig nas LPCs, comparando a dentição permanente com a dentição decídua, o que sugere alterações imunes relacionadas a idade. Em particular, a participação de plasmócitos IgG4+, modulando respostas inflamatórias nas LPCs da dentição permanente do que na dentição decídua, deve ser considerada.

7. Referências

7. Referências

Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.

American association of endodontics. *Glossary of endodontic terms*. 10 Ed. Chicago. 2019.

Andrew N, Kearney D, Sladden N, Goss A, Selva D. Immunoglobulin G4-related disease of the hard palate. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014;72(4):717-723.

Akamine A, Hashiguchi I, Toriya Y, Maeda K. Immunohistochemical examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions. *Endodontics & Dental Traumatology*. 1994 Jun;10(3):121-128

Arévalo MT, Rizzo GM, Polsky R, Glaros T, Mach PM. Proteomic Characterization of Immunoglobulin Content in Dermal Interstitial Fluid. *J Proteome Res*. 2019;18(6):2381-2384.

Basto Camargo, Lucila; Camhaji, Flavia; Chelotti, Adolpho; Barbosa, José; Prócida Raggio, Daniela *Estudo Histopatológico de Lesões da Furca de Molares Decíduos Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, vol. 9, núm. 2, mayo-agosto, 2009, pp. 199-203

Bertasso AS, Léon JE, Silva RAB, et al. Immunophenotypic quantification of M1 and M2 macrophage polarization in radicular cysts of primary and permanent teeth. *Int Endod J*. 2020;53(5):627-635.

Bezerra da Silva LA. MyD88 Knockout mice develop initial periodical lesions with increased numbers of neutrophils. *Journal Endodontic*. 2014; 47(7):675-86.

Bianchini R, Karagiannis SN, Jordakieva G, Jensen-Jarolim E. The Role of IgG4 in the Fine Tuning of Tolerance in IgE-Mediated Allergy and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14):5017. Published 2020 Jul 16. doi:10.3390/ijms21145017

Bolan M, Lima DA, Figueiredo CP, Di Giunta G, Rocha MJ (2008) Immunohistochemical study of presence of T cells, B cells, and macrophages in periradicular lesions of primary teeth. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry* **32**, 287-93.

Browne RM. Some observations on the fluids of odontogenic cysts. *J Oral Pathol.* 1976;5(2):74-87.

Carrillo C, Peñarrocha M, Bagán JV, Vera F. Relationship between histological diagnosis and evolution of 70 periapical lesions at 12 months, treated by periapical surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(8):1606-1609.

Carruthers MN, Khosroshahi A, Augustin T, Deshpande V, Stone JH. The diagnostic utility of serum IgG4 concentrations in IgG4-related disease. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(1):14-18.

Chan JKC, El-Naggar AK, Grandis JR, Takata T, Slotweg PJ. WHO Classification of Head and Neck Tumours. World Health Organization, 4th edition; 2017.

Cheuk W, Yuen HK, Chan JK. Chronic sclerosing dacryoadenitis: part of the spectrum of IgG4-related Sclerosing disease?. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(4):643-645.

Cottom H, Mighell AJ, High A, Bateman AC. Are plasma cell-rich inflammatory conditions of the oral mucosa manifestations of IgG4-related disease?. *J Clin Pathol.* 2015;68(10):802-807.

Davies AM, Sutton BJ. Human IgG4: a structural perspective. *Immunol Rev.* 2015;268(1):139-159.

de Andrade BA, León JE, Carlos R, Delgado-Azañero W, Mosqueda-Taylor A, de Almeida OP. Immunohistochemical expression of p16, p21, p27 and cyclin D1 in oral nevi and melanoma. *Head Neck Pathol.* 2012;6(3):297-304.

da Silva LA, Nelson-Filho P, Faria G, de Souza-Gugelmin MC, Ito IY. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. *Braz Dent J.* 2006;17(2):144-148.

García-Rubio A, Bujaldón-Daza AL, Rodríguez-Archilla A. Lesiones periapicales. Diagnóstico y tratamiento. *Av. Odontoestomatol* 2015; 31 (1): 31-42

Goncalves CK, Fregnani ER, Leon JE, Silva-Souza YT, Peres 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.

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

Hungria, V, T; Maiolino A; Almeida, M, S; Crusoé, E, Q; Tratado de Hematologia. 4.ed. 2019. 555p.

Janeway C. Immunobiology: the immune system in health and disease. 6th ed. New York: Garland Science; 2005.

Junqueira LC; Carneiro, J. Histologia básica. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

Johannessen AC, Nilsen R, Skaug N. Deposits of immunoglobulins and complement factor C3 in human dental periapical inflammatory lesions. *Scandinavian Journal of Dental Research.* 1983;91(3):191-199.

John B. Matthews M.Sc., PhD. and Gillianl. Mason, A.I.M.L.S. Immunoglobulin Producing Cells In human Periapical Granulomas. *British Journal of Oral Surgery* 1983; 21,192-197

Takahashi K, Lappin DF, MacDonald GD, Kinane DF. Relative distribution of plasma cells expressing immunoglobulin G subclass mRNA in human dental periapical lesions using in situ hybridization. *J Endod.* 1998;24(3):164-167.

Kettering JD, Torabinejad M, Jones SL. Specificity of antibodies present in human periapical lesions. *J Endod.* 1991;17(5):213-216.

Koneczny I. A New Classification System for IgG4 Autoantibodies. *Front Immunol.* 2018;9:97.

Khosroshahi A, Wallace ZS, Crowe JL, Akamizu T, Azumi A, Carruthers MN, et al. International Consensus Guidance Statement on the Management and Treatment of IgG4-Related Disease. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67:1688-1699.

Laco J, Kamarádová K, Mottl R, et al. Plasma cell granuloma of the oral cavity: a mucosal manifestation of immunoglobulin G4-related disease or a mimic?. *Virchows Arch.* 2015;466(3):255-263.

Leonardi R, Caltabiano R, Loreto C. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed in periapical lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J.* 2005;38(5):297-301.

Lehman JS, Smyrk TC, Pittelkow MR. Increased immunoglobulin (Ig) G4-positive plasma cell density and IgG4/IgG ratio are not specific for IgG4-related disease in the skin. *Am J Clin Pathol.* 2014;141(2):234-238.

Lin LM, Ricucci D, Lin J, Rosenberg PA. Nonsurgical root canal therapy of large cyst-like inflammatory periapical lesions and inflammatory apical cysts. *J Endod.* 2009; 35: 607-15.

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;37(12):1642-1646.

Louredol BV; Freitas II CT; Câmara J; Libório-Kimura T N, Estudo epidemiológico de lesões odontogênicas provenientes do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Amazonas. *ev. Bras. Odontol.* 2017 74(2):126-132

Martín AP, Escudero JB, Barcenilla HR, Díaz MD. Funciones de los linfocitos B. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2013;11(28):1752-1759

Maria Cinta Gamundi Planas, *Inmunología, Farmacia Hospitalaria*, 3ed. 2002. 1078,1079pp.

Matthews JB, Mason GI. Immunoglobulin producing cells in human periapical granulomas. *Br J Oral Surg*. 1983;21(3):192-197.

Mass E, Kaplan I, Hirshberg A. A clinical and histopathological study of radicular cysts associated with primary molars. *J Oral Pathol Med*. 1995;24(10):458-461.

Meghji S, Qureshi W, Henderson B, Harris M. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. *Arch Oral Biol*. 1996;41(6):523-531.

Mejico LJ. IgG4-related ophthalmic disease. *Saudi J Ophthalmol*. 2015;29(1):53-6.

Naidorf, I.J. Immunoglobulins in periapical granulomas: a preliminary report. *Journal of Endodontic* 1975;1,15

Neville, W.B., Brad W; Damm, Douglas D. *Patología oral & maxilofacial*. 3.ed: Guanabara Koogan, 4ª ed, 2016.

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

Novaes AB Jr. Comparison between one-session root canal treatment with aPDT and two-session treatment with calcium hydroxide-based antibacterial dressing, in dog's teeth with apical periodontitis. *Laser Med Sci*. 2016; 31(7):1481-91

Pezzilli R, Morselli-Labate AM. The concept of autoimmune pancreatitis and its immunological backgrounds. *Expert Rev Clin Immunol*. 2010;6(1):125-136.

Pulver, W.H.; Taubman, M.A.; and Smith, D.J. Immune components in human dental periapical lesions. *Arch Oral Bio.*1977;123:435- 443.

Ricucci D, Mannocci F, Ford TR. A study of periapical lesions correlating the presence of a radiopaque lamina with histological findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101(3):389-394.

Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S41-52.

Skaug, N. Origin of immunoglobulins in fluid from nonkeratizing jaw cysts. Fifth Meeting of the Scandinavian Society for Immunology, 1976, p 889

Stern MH, Dreizen S, Mackler BF, Levy BM. Antibody-producing cells in human periapical granulomas and cysts. *J Endod.* 1981;7(10):447-452.

Strehl JD, Hartmann A, Agaimy A. Numerous IgG4-positive plasma cells are ubiquitous in diverse localised non-specific chronic inflammatory conditions and need to be distinguished from IgG4-related systemic disorders. *J Clin Pathol.* 2011;64(3):237-243.

Takahashi K, Lappin DF, MacDonald GD, Kinane DF. Relative distribution of plasma cells expressing immunoglobulin G subclass mRNA in human dental periapical lesions using in situ hybridization. *J Endod.* 1998;24(3):164-167.

Takahashi H, Yamamoto M, Suzuki C, Naishiro Y, Shinomura Y, Imai K. The birthday of a new syndrome: IgG4-related diseases constitute a clinical entity. *Autoimmun Rev.* 2010;9(9):591-594.

Takahashi K, MacDonald DG, Kinane DF. Analysis of immunoglobulin-synthesizing cells in human dental periapical lesions by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Oral Pathol Med.* 1996;25(6):331-335.

Takahashi K, MacDonald GD, Kinane DF. Detection of IgA subclasses and J chain mRNA bearing plasma cells in human dental periapical lesions by in situ hybridization. *J Endod.* 1997;23(8):513-516.

Toller PA, Holborow EJ. Immunoglobulins and immunoglobulin-containing cells in cysts of the jaws. *Lancet.* 1969;2(7613):178-181.

Torres JO, Torabinejad M, Matiz RA, Mantilla EG. Presence of secretory IgA in human periapical lesions. *J Endod.* 1994;20(2):87-89.

Torabinejad M, Kettering JD. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endod.* 1985;11(3):122-125.

Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5:520.

Vier FV, Figueiredo JA. Internal apical resorption and its correlation with the type of apical lesion. *Int Endod J.* 2004;37(11):730-7.

Yamamoto M, Shimizu Y, Takahashi H, et al. CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α)(+) M2 macrophages contribute to fibrosis in IgG4-related disease?. *Mod Rheumatol.* 2015;25(3):484-486.

Yamamoto M, Takahashi H, Shinomura Y. Mechanisms and assessment of IgG4-related disease: lessons for the rheumatologist. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(3):148-159.

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;18(1):124.

Yanagisawa S. Pathologic study of periapical lesions 1. Periapical granulomas: clinical, histopathologic and immunohistopathologic studies. *J Oral Pathol.* 1980;9(5):288-300.

Yoshikawa T, Watanabe T, Minaga K, Kamata K, Kudo M. Cytokines produced by innate immune cells in IgG4-related disease. *Mod Rheumatol*. 2019;29(2):219-225.

8. Anexos



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comitê de Ética em Pesquisa


Atest.CEP 002/2018

ATESTADO

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

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

Ribeirão Preto, 02 de maio de 2018.


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