MONIQUE SAVERIANO DE BENEDETTO

**EXPRESSÕES DOS PROTEOGLICANOS BIGLICAN E DECORIN NA
MATRIZ EXTRACELULAR EM DENTES DECÍDUOS HUMANOS
DURANTE O PROCESSO DE RIZÓLISE**

São Paulo

2006

Monique Saveriano De Benedetto

**Expressões dos proteoglicanos biglican e decorin na matriz
extracelular em dentes decíduos humanos durante o processo de
rizólise**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, para obter o título de
Doutor pelo Programa de Pós Graduação em
Odontologia.

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Marcelo José Strazzeri Bönecker

São Paulo

2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

De Benedetto MS. Expressões dos proteoglicanos biglican e decorin na matriz extracelular em dentes decíduos humanos durante o processo de rizólise [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, / /2006

Banca examinadora

1) Prof(a). Dr(a).: _____
Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a).: _____
Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a).: _____
Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a).: _____
Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a).: _____
Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

O Milagre da Vida

Albert Einstein

Pode ser que um dia deixemos de nos falar...

Mas, enquanto houver amizade,

Faremos as pazes de novo.

Pode ser que um dia o tempo passe...

Mas, se a amizade permanecer,

Um de outro se há-de lembrar.

Pode ser que um dia nos afastemos...

Mas, se formos amigos de verdade,

A amizade nos reaproximará.

Pode ser que um dia não mais existamos...

Mas, se ainda sobrar amizade,

Nascemos de novo, um para o outro.

Pode ser que um dia tudo acabe...

Mas, com a amizade construiremos tudo novamente,

Cada vez de forma diferente.

Sendo único e inesquecível cada momento

Que juntos viveremos e nos lembraremos para sempre.

Há duas formas para viver a sua vida:

Uma é acreditar que não existe milagre.

A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

José e Maria Inez,

Pela minha criação.

Vocês são meus maiores exemplos de amor e carinho.

São meu porto seguro SEMPRE!

Amo muito vocês!

A minha irmã, **Gisele**, pela amizade, companheirismo e por ser essa pessoa fantástica que você é.

Amo muito você Gi!

Ao **Marcelo**, meu marido e companheiro de todas as horas. Por estar sempre ao meu lado, me incentivando a seguir em frente !

Te amo muito lindo!

Ao meu filho **Marco**...

A razão da minha vida...

Minha maior riqueza .

Te amo muito filho!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador,

Prof. Dr. Marcelo Bönecker,

Agradeço a confiança, as palavras de carinho e conforto, e o incentivo desde a monitoria. Foi muito bom trabalhar mais próximo a você durante o doutorado.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Coordenador do Curso de Pós Graduação,
Prof. Dr. Antonio Carlos Guedes-Pinto,

Agradeço a confiança que me foi depositada há dez anos quando prestei o concurso para monitoria da disciplina de odontopediatria. Desde então sempre fui recebida com muito carinho pelo departamento e tive a oportunidade de cursar todos os estágios, especialização, mestrado e doutorado.

Professor Guedes, seus valiosos ensinamentos nunca serão esquecidos!

Obrigada pela agradável convivência e pelo carinho durante todos esses anos!

A Prof. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo,

Por ter tido a valiosa oportunidade de conviver mais com a senhora durante a realização da pesquisa e principalmente por ter acreditado em mim desde o início. Sempre admirei muito a senhora desde a graduação. Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida! Agradeço por estar ao meu lado sempre, me fortalecendo a cada obstáculo encontrado.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da FOU SP: Prof. Dr. Antonio Carlos Guedes-Pinto, Prof^a Dr^a Célia Regina Martins Delgado Rodrigues, Prof^a Dr^a Ana Lúcia Ciamponi, Prof^a Dr^a Ana Estela Haddad, Prof. Dr. Marcelo Bönecker, Prof^a Dr^a Maria Salete Nahás Pires Corrêa, Prof. Dr. José Carlos Pettorossi Imparato, Prof^a Dr^a Claudia Trindade e Prof. Dr. Fausto Medeiros Mendes pelos valiosos ensinamentos transmitidos desde a graduação e principalmente pela amizade criada nesses anos. Nunca esquecerei da minha segunda casa!

Ao Prof. Dr. José Carlos Pettorossi Imparato pela amizade desde a época de graduação, pelos seus ensinamentos científicos sempre tão valiosos e por me proporcionar a primeira experiência na docência. Sou muito grata a você e é uma grande honra fazer parte da sua equipe!

A Prof^a Dr^a Maria Salete Nahás Pires Corrêa por tudo o que aprendi com a sra. não só em relação a atendimento a bebês mas principalmente pela maneira com que trata esses pequenos pacientes... Admiro muito a senhora por ser esta pessoa maravilhosa e uma profissional extremamente competente!

A Prof^a Dr^a Célia Regina Martins Delgado Rodrigues pelo exemplo de professora, pesquisadora e mãe! Obrigada pelos ensinamentos tão valiosos transmitidos durante todos esses anos!

A Prof^a Dr^a Márcia Turolla Wanderley, pelo exemplo de dedicação à profissão e pelo convívio durante todos esses anos!

A Prof^a Dr^a Ana Lúcia Ciamponi pelos ensinamentos e amizade ao longo desses anos!

A Profª Drª Ana Estela Haddad pela confiança depositada desde a graduação e pelo carinho que sempre teve comigo!

A Profª Drª Claudia Perez Trindade pelo convívio desde a graduação.

Ao Prof. Dr. Ricardo Simão Mathias (*in memoriam*) por ter acreditado em mim desde a época da monitoria. Jamais esquecerei tudo o que o senhor fez por mim e tenho certeza que, de onde estiver, ainda o faz.

Ao Prof. Dr. Danilo Antonio Duarte, por ter sempre acreditado em mim, por ter me orientado sempre desde a época da monitoria, pela convivência sempre tão agradável... Não importa se ultimamente não temos tido muito contato, te admiro muito e sempre serei grata a você por ter iniciado na Odontopediatria.

Ao Prof. Dr. José Nicolau pela oportunidade de conhecer e conviver com essa pessoa maravilhosa que o senhor é. Um grande exemplo de pesquisador e professor! Admiro e me espelho muito no senhor, sempre.

Aos meus amigos do laboratório de Biologia oral, Fernando, Mariana, Emily, Paulinha, Douglas, Jonas e Walter pela amizade tão importante que construímos ao longo desses anos!

Aos meus colegas do curso de doutorado: Luciana Butini, Luciana Sanglard, Fernanda Moraes, Thiago, Sandra, Selma, Marise, Ricardo Navarro, Francisco e Alessandra pela agradável convivência e pela troca de experiências que nos foi proporcionada. Foram ótimos momentos difíceis de serem esquecidos!

Aos meus queridos amigos Luciana Butini e Thiago, pela oportunidade de conhecê-los melhor durante o doutorado e ainda pela convivência, sempre muito gratificante, na UNIARARAS, nossa primeira experiência como professores! Admiro muito vocês dois e tenho certeza que vão muito longe na área acadêmica!!

Ao meu querido amigo Fausto, por todos os momentos que passamos juntos em todas as fases do início da nossa carreira! Te admiro muito. Você é um grande amigo para todas as horas e um exemplo a ser seguido como pessoa e profissional!

As minhas colegas Daniela Forlin, Fernanda Nahás, Adriana Tashima e Ana Paula Verrastro que cursavam o mestrado no mesmo período e tivemos a oportunidade de conviver juntas!

A todos os funcionários da Odontopediatria pela ótima convivência durante todos esses anos. Em especial gostaria de agradecer ao Júlio e a Marize por terem me agüentado por tanto tempo e por serem sempre tão solícitos e competentes.

Aos professores doutores da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP: Suzana Catanhede Orsini Machado de Sousa, Marina Helena C. G. Magalhães, Décio dos Santos Pinto Júnior, Fabio Daumas Nunes, Andréa Mantesso e Karem Ortega meu sincero agradecimento pela acolhida no departamento e pela possibilidade de realizar a pesquisa no laboratório de imunoistoquímica.

Ao meu grande amigo Filipe Modolo por ter me ajudado durante todo o andamento da pesquisa, por ter me ensinado tudo o que sei de imunoistoquímica, or estar sempre pronto a me ouvir, tirar minhas dúvidas, pelos conselhos e principalmente por ter me incentivado sempre a seguir em frente. Te admiro pela sua competência e pela sua simplicidade... Ganhei um amigo muito valioso para sempre!

A Edna Toddai (*in memoriam*), por ter tido o prazer de conhecê-la, pelos valiosos ensinamentos no laboratório de imunoistoquímica, por ter sempre sido tão solícita sempre que precisei de sua ajuda. Sei que onde estiver, continua acompanhando meus passos na patologia.

A Elisa dos Santos pelo indispensável auxílio na confecção da parte experimental deste trabalho, pela convivência sempre tão agradável durante esses anos, pela sua competência e amor ao seu trabalho. Muito obrigada por tudo!

A todos os funcionários do Departamento de Patologia por terem sempre me recebido com tanto carinho.

A Elizabeth Martinez, carinhosamente conhecida por Betinha: Adorei ter te conhecido melhor e te agradeço muito por tudo que me ensinou na patologia! Te admiro muito como pessoa e como pesquisadora.

Aos Profs. Drs. Jackson C. Bittencourt e Carol F. Elias responsáveis pelo laboratório de Neuroanatomia do ICB, por me permitirem capturar as imagens no microscópio e por serem sempre tão agradáveis.

A Prof. Dr^a Cristiane Furuse por me ter me ajudado a confeccionar as pranchas de figuras. Muito obrigada pela sua disponibilidade!

Ao Prof. Dr. Ricardo Bozzo, diretor da Faculdade de Odontologia da UNIARARAS, pela oportunidade de fazer parte do corpo docente, e por sempre tão atencioso com todos. Aos meus amigos da UNIARARAS, Mariana Braga, Mariana Pellegrinetti, Marianinha, Paulinha, Bárbara, Flávia, Paulo, Silvia Vedovello, Júlio, Sofia e todos os professores que tenho a oportunidade de conviver semanalmente.

A todos os funcionários da SDO pela estruturação, formatação, correção das referências e elaboração da ficha catalográfica. E obrigada por me ajudarem durante todos estes anos na FOU SP.

A Minha amiga Karina Kambourakis pela correção do Abstract.

A Flávia Kiertsman pela ajuda na finalização das pranchas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos durante o curso .

A FOU SP pelos anos inesquecíveis passados aqui. E por tudo que esses anos me proporcionarão no futuro.

De Benedetto MS. Expressões dos proteoglicanos biglican e decorin na matriz extracelular em dentes decíduos humanos durante o processo de rizólise [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

As proteínas são importantes componentes da matriz extracelular da polpa dentária e possuem diferentes funções nos tecidos. A literatura odontológica não relata como os proteoglicanos se distribuem e agem na matriz extracelular de dentes decíduos durante o processo fisiológico de rizólise. Foi objetivo do trabalho analisar as expressões dos proteoglicanos biglican e decorin e relacioná-las com as diversas fases do processo de rizólise. Para isso foram utilizados dentes decíduos humanos extraídos e livres de lesões de cárie, apresentando vários estágios de reabsorção radicular, divididos em três grupos: com dois terços ou mais do comprimento radicular médio, um terço ou mais do comprimento radicular médio e menos de um terço do comprimento radicular médio. Foi utilizada a técnica da imunoistoquímica, com o método da estreptavidina-biotina-peroxidase, e anticorpos contra as proteínas anteriormente citadas. Os resultados mostraram que os proteoglicanos estudados apresentaram imunorreatividade na matriz extracelular da polpa e da dentina dos dentes nas três fases de reabsorção. Foi possível concluir que houve diferença na distribuição e no padrão de expressão dos proteoglicanos biglican e decorin apenas na área de reabsorção, nos dentes decíduos hígidos nas três fases de rizólise o que sugere um papel regulador destes proteoglicanos no processo de reabsorção fisiológica nos dentes decíduos hígidos.

Palavras-Chave: polpa dentária – dente decíduo – proteoglicanos

De Benedetto MS. Expression of proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of deciduous teeth at the resorption process [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

Proteins are important components in pulp extracellular matrix and perform several different roles in the body tissues. The distribution and functions of some proteins have already been described but there aren't studies showing how the proteoglycans are distributed and act in the extracellular matrix of deciduous teeth at the physiological resorption process. The aim of the present work was to study the expression and distribution of the following non-collagenous components of the extracellular matrix: biglycan and decorin in deciduous teeth dental tissues at the physiological root resorption. Hygid human deciduous teeth that were extracted for orthodontic reasons were grouped together according to root length: group I - two thirds or more of average length root, group II - one third or more of average length root and group III – less than one third of average length root. The streptavidin-biotin-peroxidase method of immunohistochemistry was used with antibodies against the antigens previously quoted. The results showed that the proteoglycans had been found in pulp and dentin extracellular matrix in all groups. In conclusion, biglycan and decorin were differentially found only in the resorption area, between tissues in resorption process and its adjacent zone, which make us believe that these proteoglycans act regulating the physiological resorption process in hygid deciduous teeth.

Keywords: dental pulp – deciduous tooth – proteoglycans

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1 – Fotomicrografias dos cortes dos dentes decíduos corados em H/E	61
Figura 5.2 – Fotomicrografias dos cortes dos dentes decíduos após reação imunoistoquímica para o biglican	63
Figura 5.3 – Fotomicrografias dos cortes dos dentes decíduos após reação imunoistoquímica para o decorin	65

LISTA DE TABELAS

Quadro 4.1 - Clone, título e tempo de incubação dos anticorpos primários e tratamento enzimático utilizado	52
Tabela 5.1 - Perfil imunoistoquímico apresentado pelo proteoglicano biglican nos grupos I, II e III	62
Tabela 5.2 - Perfil imunoistoquímico apresentado pelo proteoglicano decorin nos grupos I, II e III	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BGC KO	Sigla em inglês para biglican nocaute
BMP-4	Sigla em inglês para proteína morfogenética do osso-4
BSA	Sigla em inglês para albumina de soro bovino
CS	Condroitin sulfato
DEC KO	Sigla em inglês para decorin nocaute
DNA	Sigla em inglês para ácido desoxirribonucleico
DS	Dermatan sulfato
EDTA	ácido tetracético etilenodiamino
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GAG	Glicosaminoglicano
HCl	Ácido clorídrico
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-1 β	Interleucina 1-beta
LF136	Anticorpo anti-decorin humano
LF51	Anticorpo anti-biglican humano
MEC	Matriz extracelular
MMP-3	Metaloproteinase-3
PG	Proteoglicano
RNA	Sigla em inglês para ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SABC	Sigla em inglês para complexo estreptoavidina biotina

SLRP	Sigla em inglês para pequenos proteoglicanos ricos em leucina
TBST	Solução salina tamponada TRIS-HCl acrescida de tween
TGF β	Sigla em inglês para fator de crescimento transformador beta
TRIS	Hidroximetil-amino-metano
VEGFR- 2	Sigla em inglês para fator de crescimento endotelial vascular-2

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrometros
KDa	KiloDaltons
pH	Medida do potencial hidrogeniônico
°C	Graus Celsius
%	Valores percentuais
mM	Medida de milimolaridade

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Polpa dentária	26
2.2 Matriz extracelular (MEC)	28
2.3 Proteoglicanos	29
2.3.1 Biglican	32
2.3.2 Decorin	37
2.3.3 Estudos envolvendo biglican e decorin em outros tecidos	40
3 PROPOSIÇÃO	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	48
4.2 Grupo Amostral	48
4.3 Descalcificação	50
4.4 Hematoxilina e Eosina	51
4.5 Imunoistoquímica	51
4.6 Análise do Material	54
5 RESULTADOS	56
5.1 Análise dos cortes histológicos em hematoxilina e eosina	56
5.2 Rizólise dos dentes decíduos	56
5.2.1 Grupo I	57
5.2.2 Grupo II	57
5.2.3 Grupo III	58

5.3 Expressão dos proteoglicanos de acordo com as fases de rizólise	58
5.3.1 Biglican	59
5.3.2 Decorin	59
6 DISCUSSÃO	66
6.1 Biglican	68
6.2 Decorin	71
6.3 Considerações clínicas	76
7 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICES	86
ANEXOS	88

1 INTRODUÇÃO

Dentre os aspectos biológicos do tratamento em odontopediatria, um dos principais objetivos é a preservação dos dentes decíduos em condições anátomo-funcionais, até a época de sua esfoliação fisiológica. Sabe-se, porém, que, apesar do declínio, a prevalência de cárie na dentição decídua ainda é altamente significativa e que a recuperação destes dentes envolve, muitas vezes, terapia pulpar.

O conhecimento da dinâmica histológica da polpa dentária e do progresso natural da rizólise constitui requisito complementar para interpretação apropriada dos dados obtidos, por exame clínico e radiográfico, e para a instituição da terapia endodôntica adequada. As condições de resposta do tecido pulpar, relativas a um determinado tipo de estímulo, variam de acordo com o estado da polpa - jovem ou senil -, o que está intimamente associado às fases do processo de rizólise.

O tecido conjuntivo frouxo, que compõe a polpa dentária, é constituído por inúmeras células, a maioria fibroblastos, que sintetizam a matriz extracelular. Essa matriz, por sua vez, apresenta na sua composição uma variedade de proteínas colágenas, não-colágenas e polissacarídeos que, secretados localmente, formam a estrutura que suporta e envolve as células. A integração entre matriz extracelular e células é de fundamental importância para o controle da migração, proliferação, desenvolvimento e função tecidual; de tal forma que uma alteração nesta relação comprometerá a integridade tecidual.

Dentre as proteínas colágenas, os proteoglicanos são constituintes da substância fundamental que embebe os elementos celulares e fibrilares da matriz

extracelular nos tecidos dentários. Na polpa, suas principais funções são regular a retenção de água e protegê-la contra aumento de pressão (Tenório; Santos; Zorn, 2003). Nos tecidos mineralizados executam papéis essenciais na regulação da formação da matriz extracelular, modulam a atividade celular e direcionam o crescimento e a morfologia dos cristais de hidroxiapatita.

Biglican e decorin são os principais proteoglicanos encontrados nos tecidos dentários (Waddington et al., 2003) e, já foram identificados em dentes ainda em estágios iniciais de formação. A maioria destas pesquisas envolve dentes de animais. Pouco se sabe a respeito a respeito da distribuição dos proteoglicanos na matriz extracelular da polpa e dos tecidos mineralizados.

O conhecimento da expressão dos proteoglicanos nos diferentes estágios de rizólise é, sem dúvida, fundamental para o conhecimento da dinâmica histológica e, conseqüentemente, para a instituição de tratamentos pulpares, conservadores ou não, em dentes decíduos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

No Brasil há, reconhecidamente, uma preocupação com relação à manutenção dos dentes decíduos no arco dentário até o cumprimento de todo o ciclo biológico. As diversas pesquisas a respeito dos elementos constituintes do tecido pulpar dos dentes decíduos elucidam suas funções em cada fase do ciclo biológico. Esses trabalhos avaliaram basicamente a morfologia, histometria, histoquímica e histopatologia da polpa de dentes decíduos humanos.

Siquara-da-Rocha e Nicolau (1980) estudaram o metabolismo de carboidratos em polpa de molares decíduos de suínos, em três fases distintas do ciclo biológico: rizogênese, raiz completa e rizólise. Os autores concluíram que a capacidade de metabolização dos carboidratos pela polpa foi maior na fase de rizogênese, com predominância da via pentose fosfato sobre a glicólise, o que se justifica pela plena atividade de formação dos tecidos dentários nessa fase do ciclo biológico. Os autores encontraram atuação tanto da via pentose fosfato como da glicólise nos dentes em fase de rizólise, quando comparados com os dentes com a raiz completa. Esse resultado ajuda a entender que a rizólise não é um processo contínuo e sim intermitente, com alternância de processos de síntese e degeneração, fato encontrado na clínica e demonstrado histologicamente.

Araújo (1982) teve como objetivo descrever os aspectos morfológicos, histométricos e histoquímicos da polpa de molares decíduos humanos hígidos, em três fases distintas de reabsorção radicular: início, meio e final. Os dentes foram fixados em formol 10%, a polpa foi removida e seguiu-se o protocolo para análise do tecido em microscópio de luz, após realização da técnica de hematoxilina–eosina.

Com base nos resultados obtidos, o autor concluiu que as estruturas pulpares não mostraram alterações significativas em suas características estruturais e fisiológicas no início e metade de reabsorção radicular, apresentando pequenas alterações morfológicas no estágio final de rizólise. Na análise histométrica, a quantidade de fibroblastos foi significativamente menor ao final da reabsorção; o de fibras colágenas, menor no início e metade da rizólise. No caso de estruturas vasculares o número foi menor no final da reabsorção radicular e, morfológicamente, ocorreu um aumento no calibre desses vasos ao final da rizólise.

Perussolo (1984) estudou as características histopatológicas da polpa de 28 molares decíduos, em início de rizólise, apresentando lesões de cárie em dentina - 20 com lesões crônicas e 8 com lesões agudas. Após exame histológico dos dentes, a autora concluiu que a reação inflamatória predominante na polpa dos molares decíduos estudados constituiu-se por infiltrado mononuclear, em especial linfoplasmocitário; sendo mais discreto sob lesões superficiais, e mais proliferativo na polpa dos dentes com lesões profundas, agudas ou crônicas.

Há também uma grande preocupação com a resposta do tecido pulpar frente a diversos medicamentos utilizados na terapia endodôntica em dentes decíduos. Santos (1998) comparou a citotoxicidade *in vitro* da pasta Guedes-Pinto com a de formocresol, glutaraldeído e ácido fosfórico, fármacos utilizados em terapia endodôntica de dentes decíduos. Além disso, a autora avaliou também a citotoxicidade dos componentes individuais da pasta: iodofórmio, rifocort e paramonoclorofenolcanforado. Para a realização do trabalho foram utilizados fibroblastos originados de embriões de camundongos e linhagem de fibroblastos de polpa. Os materiais testados foram colocados em lamínulas de vidro depositadas, em seguida, sobre as células em cultura. Os resultados mostraram que a pasta

Guedes-Pinto foi menos citotóxica *in vitro*, quando comparada às demais substâncias utilizadas e, dentre os componentes individuais da pasta, o mais citotóxico foi o paramonoclorofenol canforado.

Di Nicolo, Guedes-Pinto e Carvalho (2000) compararam as características histológicas da polpa de 36 molares decíduos humanos - de crianças entre 5 e 9 anos de idade - com lesões de cárie ativas e inativas. Pelo diagnóstico histológico o tecido pulpar foi classificado em: com polpa normal; estágio de transição; pulpite parcial; pulpite total e necrose e, a partir daí, foram divididos em três subgrupos: dentes passíveis de tratamento, não passíveis de tratamento e tratamento questionável. Os resultados mostraram que os casos com polpa normal ou em estágio de transição (passíveis de tratamento) foram diagnosticados em 50% dos dentes com lesões inativas e em 11.1% dos dentes com lesões ativas de cárie. Os casos com pulpite parcial (tratamento questionável) estavam presentes em 38.8% dos dentes com lesões inativas e em 22.2% daqueles que apresentavam lesões ativas. Pulpite total e necrose (não passíveis de tratamento) foram diagnosticados em 11.2% dos dentes com lesões inativas de cárie e em 66.7% dos casos com lesões ativas de cárie. Os autores observaram a formação de uma linha basofílica cálcio-traumática na junção da dentina primária e reparadora; formação de dentina reparadora e de camada regular de odontoblastos em 60% dos casos que apresentavam lesões de cárie ativas ou inativas. Os resultados mostraram que o tipo de lesão é um bom indicativo do estado histológico da polpa dos dentes decíduos.

Santos (2002) avaliou histologicamente a reação subcutânea de ratos submetidos à utilização da pasta Guedes-Pinto e do hidróxido de cálcio e também a atividade quimiotática, para macrófagos *in vitro*, dos referidos medicamentos. Como resultados, a pasta Guedes-Pinto demonstrou resposta inflamatória moderada, com

predominância celular de macrófagos. A reação subcutânea de ratos, após uso de hidróxido de cálcio, mostrou intensa resposta inflamatória, apresentando infiltrado inflamatório misto, inclusive com presença de células gigantes multinucleadas.

Estudos posteriores utilizaram a técnica de imunoistoquímica, para conhecer melhor a dinâmica histológica da polpa dentária e do progresso natural da rizólise. Bönecker et al. (2003) estudaram a distribuição de fibras colágenas do tipo I e III, fibronectina, tenascina, osteonectina e proteína morfogenética do osso-4 (BMP-4) na matriz extracelular de tecido conjuntivo normal de dentes decíduos em três fases distintas de reabsorção radicular, por meio de técnica imunoistoquímica. Os resultados do estudo mostraram alterações significativas na expressão de tenascina, colágeno I e osteonectina na matriz extracelular da polpa de dentes decíduos durante o processo de rizólise. Ficou evidente também que a marcação para fibronectina, colágeno III e BMP4 foi constante, guardadas as diferenças na intensidade. A expressão dessas proteínas tem implicações relevantes no ciclo biológico do tecido conjuntivo pulpar durante a reabsorção fisiológica e com conseqüências para o diagnóstico e tratamento restaurador.

Mattuella (2005) avaliou, por meio de reação imunoistoquímica, a expressão do receptor do fator de crescimento endotelial vascular-2 (VEGFR-2, do inglês vascular endothelial growth factor receptor-2) em células endoteliais da polpa de dentes decíduos e permanentes jovens humanos. A amostra constituiu-se de nove dentes decíduos e quatro permanentes jovens, selecionados de indivíduos com idade entre 5 e 10 anos e 11 e 14 anos, respectivamente. Os espécimes foram fixados em formol diluído a 10% e descalcificados. Após a análise histológica, pela técnica de hematoxilina e eosina, os cortes foram submetidos à reação imunoistoquímica. Após o processamento das lâminas, os campos microscópicos

mais significativos foram capturados e analisados qualitativamente quanto à presença ou ausência do VEGFR-2 nas células endoteliais pulpare, assim como em relação à intensidade da imuno-marcação. Os resultados mostraram que na polpa dos dentes decíduos nem todas as células apresentaram a mesma intensidade de marcação e quanto à localização, a marcação foi mais evidente na região subodontoblástica em relação à região central da polpa. As células endoteliais da polpa dos dentes permanentes, por sua vez, demonstraram ausência de marcação ou marcação tênue. Seus resultados sugerem maior capacidade de resposta das células endoteliais da polpa dos dentes decíduos, ao anti-VEGFR-2, em relação aos dentes permanentes. A intensidade da imuno-marcação varia conforme a célula endotelial observada nos dois grupos.

2.1 Polpa dentária

A polpa dentária é composta por um tecido conjuntivo frouxo especializado, formado por células e matriz extracelular, envolta por uma estrutura rígida de tecidos mineralizados. A polpa é mais sensível a alterações de pressão tecidual do que outros tecidos, o que requer um sistema ativo de drenagem da matriz extracelular para eliminação de fluidos e substâncias macromoleculares (PIMENTA; SA; GOMEZ, 2003). A periferia da polpa é formada principalmente por odontoblastos; na região central encontra-se uma população heterogênea de células, incluindo endoteliais, neurais, imunes e outras. Entretanto, o principal tipo de célula da polpa

dentária é o fibroblasto, responsável pela síntese e secreção da matriz extracelular (GOLDBERG; LASFARGUES, 1995).

A polpa comunica-se com o periodonto através do forame apical; vasos e nervos entram e saem por esta abertura. A polpa costuma ser dividida em três zonas concêntricas, ao redor de um núcleo central. A zona mais externa é constituída por uma única camada de odontoblastos, cujos prolongamentos se estendem para os túbulos dentinários adjacentes a dentina. Logo abaixo encontra-se a região subodontoblástica, constituída zona pobre em células e zona rica em células.

A primeira, mais periférica, contém poucas células, e é atravessada por inúmeros prolongamentos das células subjacentes, os quais se ramificam muito estabelecendo contatos entre eles e com as superfícies basais dos odontoblastos. Em dentes humanos esta região tem aproximadamente 40 µm de espessura, sobretudo na polpa coronária onde é mais evidente; apresenta também numerosos vasos sanguíneos, que constituem o plexo capilar, cujas ramificações penetram até a camada odontoblástica, onde estabelecem alças entre os odontoblastos. A zona pobre em células é atravessada por fibras nervosas, principalmente do tipo amielínico, que também se dirigem para a camada odontoblástica, podendo atingir a pré-dentina e a parte inicial dos túbulos odontoblásticos. A zona rica em células é constituída pelos corpos das células que apresentam, na sua maioria, forma bipolar e emitem seus prolongamentos tanto para a zona pobre em células como para a região central da polpa. Esta zona rica em células é muito mais evidente na polpa coronária do que na porção radicular, o que indica alta potencialidade metabólica desta região pulpar, especialmente no que se refere a processos de reparação e diferenciação de novas células. A zona rica em células circunda a região central da

polpa, cujas células mais abundantes são os fibroblastos em diversos estados funcionais - ativos ou em repouso. Outro tipo celular é representado pelas células indiferenciadas, mesmo em dentes completamente formados (KATCHBURIAN; ARANA-CHAVEZ, 2004).

2.2 Matriz extra celular (MEC)

A matriz extracelular não serve apenas como uma rede para estabilização da estrutura física (HILLMANN; GEURTSSEN, 1997) mas tem também um papel importante na influência do desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função de todas as células pulpares (CHIQUET-EHRISMANN et al., 1994). Sendo assim, alterações nas relações das células com a matriz extracelular podem interferir na integridade dos tecidos (MARTINEZ; ARAÚJO, 2004).

A matriz extracelular da dentina é constituída por colágeno (90%), principalmente o tipo I (85%) e os tipos III e IV (5%), e pelas proteínas não colágenas (10%) – fibronectina, tenascina, osteonectina, osteopontina e osteocalcina –, proteoglicanos (condroitin sulfato e heparan sulfato) e fosfolípidos (GOLDBERG; LASFARGUES, 1995; KATCHBURIAN; ARANA-CHAVEZ, 2004; SEPTIER et al., 2001). Embora em pequenas quantidades, as proteínas não-colágenas são muito importantes para fisiologia tecidual, influenciando na sua forma e função, seja através do controle da proliferação celular e morfogênese tecidual, seja participando ativamente da organização do colágeno. Além disso, são as principais responsáveis pela promoção e controle da mineralização das fibras

colágenas na dentina. Entre os principais grupos de proteínas não-colágenas da matriz extracelular encontra-se o grupo dos proteoglicanos, observados em tecidos mineralizados e não-mineralizados (SEPTIER et al., 2001).

O tecido conjuntivo pulpar é formado por células e matriz extracelular, que consiste em substância fundamental amorfa e fibras. A matriz extracelular, formada pelos fibroblastos, pode ser definida como um complexo de proteínas e glicoproteínas que envolve as células e pode ser abundante em alguns tecidos como cartilagem, tecido conjuntivo e tecidos mineralizados como osso e dentina. Os principais constituintes identificados na matriz extracelular incluem colágeno, glicoproteínas não-colágenas e proteoglicanos (HALL; EMBERY, 1997).

2.3 Proteoglicanos (PGs)

Os glicosaminoglicanos são polissacarídeos longos, não flexíveis, não ramificados, constituídos de cadeias de unidades de dissacarídeos que se repetem. A maioria dos principais glicosaminoglicanos da matriz extracelular é sulfatada - entre eles o queratan-sulfato, o heparan-sulfato, a heparina, o condroitino-4-sulfato, o condroitino-6-sulfato e o dermatan-sulfato - e está geralmente ligada covalentemente a moléculas de proteína. Quando os glicosaminoglicanos sulfatados estabelecem ligações covalentes com um núcleo de proteína, eles formam uma família de macromoléculas, conhecida como proteoglicanos, muitas das quais possuem grandes extensões. O único glicosaminoglicano não-sulfatado é o ácido

hialurônico que não forma ligações covalentes com moléculas de proteínas (GOLDBERG; TAKAGI, 1993).

Proteoglicanos são importantes macromoléculas não fibrosas extracelulares identificadas na maioria das estruturas dentais e orais (RAHEMTULLA, 1992). Estruturalmente são compostos por um eixo central proteico, ao qual um ou mais glicosaminoglicanos são ligados covalentemente (RUOSLAHTI, 1988), conferindo aos proteoglicanos a capacidade de formar complexos com vários componentes da matriz extracelular e de interagir na superfície das células (RUOSLAHTI, 1988; SCOTT, 1988).

Há cerca de 30 anos, os proteoglicanos eram considerados componentes sem importância dos tecidos mineralizados. Poucos estudos eram realizados sobre essas moléculas por duas razões: primeiro porque sua quantidade é insignificante quando comparada aos componentes principais da matriz extracelular, como colágeno ou proteínas fosforiladas; segundo, naquela época prevalecia o conceito, segundo o qual os glicosaminoglicanos ou proteoglicanos não estavam diretamente envolvidos no processo de mineralização dos tecidos e constituíam apenas fatores negativos impeditores da realização da cascata de eventos que ocorre durante o início do referido processo. Com o advento de novos métodos de pesquisa, o estudo dos componentes da matriz extracelular dos tecidos foi facilitado (GOLDBERG et al., 2002).

Os proteoglicanos são classificados com base no seu tamanho e nas características do seu eixo central proteico. A densidade, tamanho e carga dos mesmos estão relacionados à manutenção e regulação das funções teciduais (TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003). Neste estudo dedica-se especial atenção ao grupo dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs, do inglês: small

leucine rich proteoglycans), composto pelos membros principais: biglican e decorin. Esses proteoglicanos compartilham algumas características comuns como abundante número de moléculas de leucina em seu eixo central proteico, que confere a maioria das suas funções biológicas (HALL; EMBERY, 1997).

Os SLRPs são importantes para manutenção das matrizes mineralizadas dos tecidos ósseos e dentários, para a transparência da córnea, resistência à tensão da pele e tendões e viscoelasticidade dos vasos sanguíneos (IOZZO, 1998).

Esta classe de proteoglicanos é dividida em quatro subclasses, com base na homologia entre suas seqüências de aminoácidos, na presença de agrupamentos ricos em cisteína no N ou C-terminal, número e espaçamento das repetições ricas em leucinas (CHAKRAVARTI et al., 2003). Biglican e decorin apresentam 57% de suas seqüências de aminoácidos idênticas e constituem uma subclasse (classe I). Lumican e fibromodulin pertencem a outra subclasse e apresentam 47% de homologia entre seus aminoácidos (SVENSSON; NÄRLID; OLDBERG, 2000).

Diversos estudos bioquímicos dos PGs, presentes nos tecidos dentários sugerem que, em sua maioria, sejam os SLRPs biglican e decorin (WADDINGTON et al., 2003). A presença, distribuição e função do biglican e decorin nos tecidos dentários têm sido extensivamente estudada (SEPTIER et al., 2001; GOLDBERG et al., 2002, 2003, 2005). Foi elucidado recentemente que estes dois proteoglicanos contribuem para o desenvolvimento dentário (GOLDBERG et al., 2002, 2005) e são componentes importantes das matrizes pré-dentinária e dentinária. Mas estudos demonstraram que os proteoglicanos intactos podem inibir a mineralização; conseqüentemente, a degradação do proteoglicano na pré-dentina pode ser um passo necessário para o processo de mineralização (ARMSTRONG; BARRACH; EHRLICH, 2002; FANCHON et al., 2004). O papel dos proteoglicanos na

dentinogênese ainda necessita de maiores esclarecimentos (GOLDBERG et al., 2003).

A distribuição e função biológica do biglican e decorin variam significativamente entre os tecidos.

2.3.1 Biglican

O biglican está localizado no cromossomo humano X e é transcrito de forma diferente em pacientes com anomalias genéticas associadas ao cromossomo X, como síndrome de Turner (XO) e síndrome de Klinefelters (XXY) caracterizadas por baixa e alta estatura respectivamente (BI et al., 2006). Descoberto há cerca de 20 anos, como um pequeno proteoglicano no interior do conteúdo mineral do tecido ósseo, o biglican contém duas cadeias do glicosaminoglicano condroitino-sulfato ligadas à serina, próximo ao terminal amina (FISHER; TERMINE; YOUNG, 1989; YOUNG et al., 2003). Apesar de abundante em muitos tecidos, suas funções biológicas ainda não foram totalmente elucidadas (SCHAEFER et al., 2005).

Várias funções do biglican têm sido descritas, incluindo interações proteína-proteína, adesão celular, transdução de sinais, reparo de ácido desoxiribonucleico (DNA) e processamento do ácido ribonucleico (RNA) (ZANOTTI et al., 2005). Chen et al. (2005) revelaram que deficiência de biglican afeta os genes que controlam a inflamação, resposta imune e crescimento de células tumorais. Tenório, Santos e Zorn (2003) sugeriram também um papel estrutural para o biglican devido a sua

interação com as fibras colágenas, principalmente as do tipo I e VI (ZANOTI et al., 2005), e conseqüente expressão na pré-dentina.

É atualmente aceito que o biglican, uma proteína de 40 kDa, exerça papel importante durante o processo de diferenciação de odontoblastos e ameloblastos (MATSUURA et al., 2001).

Com o objetivo de determinar as funções do biglican têm sido realizadas muitas pesquisas, em animais, com tecidos dentários em estágios iniciais do desenvolvimento.

Matsuura et al. (2001), examinaram o padrão de expressão de RNA mensageiro (RNAm) do biglican, em germes dentários de ratos com 19 dias de vida, utilizando hibridização *in situ* e encontraram expressão do RNAm deste proteoglicano por todo o germe dentário, incluindo odontoblastos e ameloblastos pré secretores, papila dentária e retículo estrelado. Entretanto, a expressão do biglican não foi evidente nos odontoblastos secretores, sugerindo que o proteoglicano esteja envolvido na diferenciação dos odontoblastos.

Goldberg et al. (2002) após pesquisarem as funções do proteoglicano biglican utilizando ratos nocaute, (BGN KO) encontraram espaços interglobulares não mineralizados na mandíbula de ratos com um dia de vida. Na dentina também foram observados calcosferitos envolvidos por dentina interglobular pobremente mineralizada. Além desses defeitos, e após comparação com os ratos não nocaute, o diâmetro das fibrilas colágenas na pré-dentina foi menor no terço proximal (próximo à camada de odontoblastos), mas aumentou significativamente nos terços central e distal (próximo à dentina). Esses resultados reforçam a observação feita por Xu et al. (1998), no primeiro relato na literatura envolvendo ratos com deficiência de biglican, quando encontraram fenótipo semelhante à osteoporose nesses

animais, o que confirma o papel do biglican como um regulador da organização da matriz extracelular. Outro resultado observado por Goldberg et al. (2002) foi a formação de esmalte 3 a 5 vezes mais espesso nos ratos nocaute para biglican com um dia de vida, em comparação aos ratos não nocaute. Os autores concluíram que o biglican age como repressor da expressão de amelogenina nos ameloblastos e odontoblastos secretores, os dois únicos grupos de células envolvidos na síntese de amelogenina.

Goldberg et al. (2003) investigaram a distribuição e as funções do biglican em dentes de ratos com e sem deficiência desse proteoglicano. Comparando com os ratos sem deficiência, o diâmetro das fibras de colágeno nos ratos com deficiência apresentava-se menor na pré-dentina proximal, porém maior na pré-dentina central e distal; a metadentina apresentava-se mais larga e a mineralização mostrou-se alterada e heterogênea. A concentração foi aparentemente constante por toda a pré-dentina nos ratos sem a deficiência. Os autores sugeriram um papel importante para o biglican na formação de dentina e mineralização.

Tenório, Santos e Zorn (2003) após estudarem a distribuição de proteoglicanos em germes dentários de ratos com 5, 7, 9 e 11 dias e 2 meses de idade, pela técnica de imunistoquímica, relataram a presença do biglican em ameloblastos, odontoblastos, pré-dentina e polpa nos ratos com 5 dias; com 7 dias, expressão acentuada em ameloblastos, odontoblastos, pré-dentina e nas células e matriz da polpa; com 9 dias os ameloblastos e odontoblastos foram menos reativos, enquanto que na pré-dentina houve marcação intensa e na polpa o biglican foi fracamente expresso na matriz extracelular e não foi expresso nas células pulpares; com 11 dias o biglican foi expresso intensamente na pré-dentina e fracamente expresso nos odontoblastos, ameloblastos e células pulpares; com 2 meses de vida

o biglican foi expresso apenas na pré-dentina e polpa. Como conclusão, o biglican foi expresso na pré-dentina durante todo o período do estudo, sugerindo um papel estrutural deste proteoglicano pela interação com fibras colágenas.

Waddington et al. (2003), examinaram alterações no perfil de proteoglicanos durante a transição da pré-dentina não mineralizada para a dentina mineralizada. Os autores utilizaram dentes decíduos de bezerros com 3 semanas de vida e purificaram proteoglicanos a partir da pré-dentina, interface pré-dentina/dentina e dentina. O biglican foi identificado, assim como o decorin, como um dos principais proteoglicanos principais dos extratos da pré-dentina, interface pré-dentina/dentina e dentina. Após análise dos glicosaminoglicanos, por meio de eletroforese, foram verificadas alterações significativas na composição destes, sendo que na pré-dentina foi constatada uma maior proporção de dermatan sulfato (DS) (51.5%) e condroitino sulfato (CS) (17.8%). Já na interface pré-dentina/dentina a proporção de CS aumentou bastante (62.5%), com correspondente diminuição do DS (21.4%). Na matriz dentinária apenas CS foi identificado. Os glicosaminoglicanos presentes na dentina apresentam cadeias mais longas do que aqueles presentes na interface pré-dentina/dentina e pré-dentina. Os autores concluíram que os proteoglicanos submetem-se a modificações estruturais, principalmente no início da mineralização, o que indica um envolvimento ativo dessas macromoléculas nesse processo.

Fanchon et al. (2004) estudaram o envolvimento das metaloproteinases da matriz na formação de dentina e mineralização em germes dentários de embriões de camundongos com 18 dias de idade gestacional. Foram obtidos três grupos: germes dentários controle; germes dentários em meio de cultura com três concentrações de um inibidor geral de metaloproteinases da matriz, (0.2, 1 e 2 μ M) e germes dentários em meio de cultura com três diferentes concentrações de um inibidor mais seletivo

de metaloproteinases (0.2, 1 e 2 μM). Como resultados, após análise em microscopia óptica e eletrônica na presença do inibidor geral, as alterações foram dose dependentes: com a concentração de 0.2 μM as camadas de pré-dentina apresentaram-se mais largas; com 1 μM a mineralização da dentina foi prejudicada em grande extensão e com 2 μM apenas pré-dentina foi formada. Não foi observado nenhum sinal de formação de esmalte. Na presença do inibidor mais seletivo não houve diferenças relacionadas às diferentes concentrações. Tanto a amelogênese quanto a dentinogênese foram prejudicadas. Pela técnica da imunoistoquímica, os autores observaram a imunoreatividade dos tecidos dentários aos anticorpos anti-biglican e anti-decorin nos três grupos de germes. No grupo controle o biglican esteve presente em todos os tecidos dos germes dentários; entretanto, foi observada maior expressão na pré-dentina do que nas outras camadas da dentina. Com o inibidor geral não foi identificada diferença, enquanto no grupo tratado com o inibidor mais seletivo a expressão foi limitada à pré-dentina com maior intensidade. No grupo controle, a pré-dentina foi positiva para o decorin, porém em menor intensidade que o biglican. Na presença do inibidor geral a expressão foi aumentada na pré-dentina e na dentina; na presença do inibidor mais seletivo a expressão foi intensa na pré-dentina, mas o restante do germe permaneceu sem expressão. Os autores concluíram que, no início da formação de dentina e esmalte, as metaloproteinases da matriz são importantes na formação e mineralização dos tecidos dentários de ratos, por degradarem os proteoglicanos na pré-dentina e permitirem a deposição de minerais.

Goldberg et al. (2005) descreveram as características fenotípicas de dentes de ratos recém-nascidos nocaute para o biglican (BGN KO) e compararam com as características de ratos não nocaute. Após análise imunoistoquímica, os autores

encontraram formação de esmalte sete vezes mais espesso, dentina porosa e pobremente mineralizada nos molares dos ratos com deficiência. Os autores não encontraram alteração na expressão de enamelinina; porém, observaram uma superexpressão de sialoproteína dentinária nas camadas odontoblástica e subodontoblástica dos ratos com deficiência. Na ausência de biglican a dentina apresentou-se porosa, a metadentina – camada onde inicia-se o processo de mineralização, localizada próxima a junção pré-dentina/dentina - tornou-se mais larga. Após análise dos resultados, os autores concluíram que o biglican promove a mineralização da dentina. Apesar destas alterações induzidas pela deficiência do biglican nos ratos recém-nascidos, não foram encontradas diferenças significativas nos ratos adultos, sugerindo que os efeitos relatados são transitórios e passíveis de reparação.

Poucas pesquisas têm sido feitas com relação à presença e distribuição do biglican em dentes humanos. Bianco et al. (1990) observaram que em tecidos humanos em desenvolvimento o biglican é associado com tipos celulares mais especializados. Aparentemente ele participa dos processos de desenvolvimento dos tecidos. Tenório, Santos e Zorn (2003) sugeriram que o biglican exerce papel importante durante o processo de diferenciação, fixação celular e proliferação, eventos que ocorrem durante o desenvolvimento dentário.

2.3.2 Decorin

O decorin, uma proteína de 40 kDa, está envolvido na formação da dentina (MATSUURA et al., 2001) e é preferencialmente localizado em tecidos ricos em colágeno fibrilar (BIANCO et al., 1990). O decorin liga-se a colágenos tipo I, II, III e IV (ZANOTTI et al., 2005). Essa ligação ocorre através do seu eixo central proteico e pode contribuir para a reunião e agregação do colágeno, bem como vários outros componentes da MEC (TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003). Além dessas propriedades de ligações, o decorin executa diversas funções na matriz extracelular como formação, organização e adesão celular (LEWANDOWSKA et al., 1987; VOGEL; PAULSSON; HEINEGARD, 1984). Também é capaz de ligar-se e neutralizar o fator β (TGF β) e, dessa forma, controlar o crescimento celular (YAMAGUCHI; RUOSLAHTI, 1988; YAMAGUCHI; MANN; RUOSLAHTI, 1990).

Após realização de hibridização *in situ*, para análise do padrão de expressão de RNAm de germes dentários de ratos recém nascidos (19 dias), Matsuura et al. (2001) relataram que a expressão do RNAm do decorin coincidiu com a do colágeno tipo I e foi observado principalmente em odontoblastos secretores. Ao contrário do biglican, não houve expressão do RNAm do decorin nos ameloblastos secretores.

O decorin é sintetizado por odontoblastos e pode estar envolvido na formação da dentina, via associação específica com fibras de colágeno tipo I, demonstrando papel importante na construção e crescimento das fibras (TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003). Em pesquisa realizada com ratos nocaute para o decorin (DCN KO), após análise histológica dos dentes inferiores, Goldberg et al. (2005) encontraram falta de formação de esmalte e dentina porosa e pobremente mineralizada. A metadentina apresentava-se mais larga que nos ratos sem deficiência do proteoglicano. Os autores concluíram que o decorin promove a mineralização da dentina, ressaltando que, na ausência do decorin, a dentina formada apresentava-se

mais pobremente mineralizada do que na ausência do biglican, o que sugere uma participação mais intensa do decorin na mineralização da dentina.

Assim como o biglican, o decorin também foi identificado a partir de extratos de pré-dentina, interface pré-dentina/dentina e dentina, em dentes de bezerros com 3 semanas de vida (WADDINGTON et al., 2003).

Tenório, Santos e Zorn (2003) após estudarem a distribuição de proteoglicanos em germes dentários de ratos com 5, 7, 9 e 11 dias e 2 meses de idade, pela técnica de imunoistoquímica, concluíram que não teve expressão do decorin nos odontoblastos e este foi expresso exclusivamente na pré-dentina, durante todo o período do estudo. Nos ratos com 2 meses de idade o decorin também esteve concentrado na periferia pulpar, sugerindo um papel deste proteoglicano na formação de dentina, especificamente pela sua interação com fibras colágenas. A presença do decorin na polpa pode contribuir para a manutenção de células indiferenciadas, e o estado de não mineralização deste tecido.

Outros estudos, entretanto, sugerem que o decorin tem papel inibitório na mineralização, devido a três razões: primeiro, o decorin liga-se especificamente aos sítios do colágeno, bloqueia sua interação com as moléculas que iniciam esse processo, regulando, assim, o padrão de mineralização do colágeno (EMBERY et al., 2001). Segundo, a ausência de decorin ligado aos sítios do colágeno na matriz óssea; e terceiro, sua presença em tecidos não mineralizados (YOSHIBA et al., 1996).

Yoshiba et al. (1996) avaliaram a imunolocalização do decorin com microscopia de varredura confocal a laser e microscopia eletrônica de transmissão. Os autores utilizaram três terceiros molares parcialmente formados e não erupcionados, quatro pré molares completamente erupcionados e três terceiros

molares com ápices fechados. Foi utilizado fluoresceína isotiocianato-conjugada a IgG suína anti-coelho (DAKO, Denmark) para a imunoistoquímica. Como controle alguns cortes foram pré incubados com condroitinase ABC (Seikagaku, Co, Japan). Os autores não encontraram diferença no padrão de marcação da imunoistoquímica do núcleo proteico de ambos os grupos, com e sem digestão pela condroitinase. Nas porções apicais dos dentes em formação foram observadas marcações fluorescentes para decorin das células da papila dentária e pré-odontoblastos, assim como nas células da bainha epitelial de Hertwig. Não houve marcação na dentina do manto e na pré-dentina inicial. No tecido pulpar, células endoteliais dos vasos sanguíneos apresentaram marcação positiva. A expressão do decorin observada na junção pré-dentina/dentina, onde inicia-se a mineralização, pode regular esse processo na matriz dentinária, porém mais estudos são necessários para confirmação dessa hipótese.

2.3.3 Estudos envolvendo biglican e decorin em outros tecidos

Os proteoglicanos biglican e decorin estão presentes em vários tecidos conjuntivos frouxos, inclusive no tecido periodontal humano (OKSALA et al., 1995). Oksala et al. (1997), demonstraram uma expressão significativamente menor dos proteoglicanos biglican e decorin em sítios de inflamação periodontal crônica. Os autores utilizaram para o estudo espécimes de tecido periodontal inflamado, obtidos de adultos que apresentavam a doença em fase avançada. Para análise imunoistoquímica, os autores utilizaram anticorpos que reconhecem uma sequência

específica de peptídeos no núcleo proteico, tanto para o biglican como para o decorin, e, encontraram alta expressão deste último em tecido conjuntivo sadio, sendo mais evidente na camada subepitelial do tecido conjuntivo. O biglican também apresentou expressão relativamente alta, porém menos intensa e mais evidente que o decorin na camada subepitelial. No tecido conjuntivo inflamado, tanto o decorin quanto o biglican apresentaram diminuição notável da expressão. Estes resultados estão de acordo com os achados bioquímicos que indicam uma degradação dos proteoglicanos durante a inflamação periodontal (PURVIS; EMBERY; OLIVER, 1984).

Na literatura médica são encontradas inúmeras pesquisas envolvendo os proteoglicanos biglican e decorin em vários tecidos e órgãos - tecido ósseo e córnea, por exemplo -; já foram relacionados a processos inflamatórios e angiogênese, dentre outros. Neste item serão apresentadas algumas destas pesquisas que contribuirão para o melhor entendimento das funções desses proteoglicanos.

Nelimarkka et al. (2001) investigaram o envolvimento do proteoglicano decorin na angiogênese, *in vivo*, associado a processos inflamatórios. Os autores utilizaram espécimes de artérias temporais; de granuloma piogênico, obtidos da pele; de tecido de granulação de feridas na derme em processo de cicatrização e espécimes de ovários de mulheres saudáveis em período pré menopausa, submetidas a histerectomia eletiva; de pacientes com diagnóstico histológico de arterite de células gigantes e de pacientes sem a doença. Para análise imunoistoquímica foram utilizados os anticorpos: anti-CD68, para identificação de macrófagos, anti-CD31, para identificação de células endoteliais e LF-30, para distribuição do decorin nos espécimes. Os resultados mostraram que nas artérias temporais normais o decorin foi expresso principalmente nas camadas média e adventícia, enquanto que nas

artérias com inflamação, o decorin foi distribuído por todo o vaso, inclusive na camada íntima. Houve também expressão nas células endoteliais dos capilares dos granulomas piogênicos e tecidos de granulação, mas essa foi negativa nos ovários. A reação mais intensa foi evidenciada nas células endoteliais de capilares neoformados nas camadas média e íntima de artérias temporais inflamadas. Baseados nos resultados, os autores concluíram que o decorin é um componente integral de novos capilares na angiogênese *in vivo*, principalmente naqueles associados à inflamação profunda. O papel exato do decorin na angiogênese e os fatores responsáveis pela indução de sua produção de pelas células endoteliais ainda não foi totalmente elucidado.

Biglican e decorin são bastante expressos em tecido ósseo. Waddington et al. (2003) após análise dos níveis de RNAm e da natureza do proteoglicano em cultura de células ósseas de ratos, relataram que tanto o biglican quanto o decorin apresentam um papel importante, influenciando a diferenciação celular óssea e a atividade proliferativa. Além disso, esses proteoglicanos estão envolvidos na regulação da deposição mineral e morfologia do cristal; o decorin tem funções também na organização da matriz orgânica. Os autores identificaram alterações no padrão com relação à natureza do glicosaminoglicano conjugado ao núcleo proteico do proteoglicano durante o desenvolvimento da matriz óssea: ao longo das fases de proliferação celular, o dermatan-sulfato foi expresso no biglican, com interrupção no início da deposição da matriz e retomada no início da mineralização, mas conjugado ao condroitino-sulfato. O decorin, expresso mais tarde que o biglican, foi associado com início de deposição de matriz, mas continuou durante os estágios de mineralização. Da mesma forma que o biglican, o dermatan-sulfato associado ao decorin prevaleceu no início na matriz osteóide, enquanto que o condroitino-sulfato

predominou mais tarde no interior da matriz em mineralização. Com esses resultados, os autores concluíram que a natureza do glicosaminoglicano conjugado ao núcleo proteico e o período de sua expressão parecem ditar as funções do biglican e decorin na formação óssea.

Young et al. (2003) relataram que, com a idade, ratos nocaute para biglican adquiriram progressivamente menor massa óssea, tiveram menor capacidade de produzir células da medula óssea, precursoras das células ósseas. Ratos nocaute para decorin apresentaram massa de tecido ósseo normal, enquanto que os ratos nocaute para biglican e decorin apresentaram osteopenia mais severa do que aqueles que possuíam deficiência apenas do gene para produção de biglican.

Schönherr et al. (2004) investigaram as conseqüências da ausência dos genes para produção dos proteoglicanos decorin, biglican e fibromodulin na angiogênese da córnea de camundongos, após inflamação induzida. Depois de realizarem reações imunoistoquímicas, a fim de caracterizar a expressão normal dos proteoglicanos nos vasos sanguíneos dos camundongos, os autores encontraram expressão de decorin apenas ao redor dos vasos sanguíneos, enquanto que o biglican e fibromodulin foram expressos nas células endoteliais. Os autores induziram inflamação na córnea, por meio de cauterização química com nitrato de prata, em três grupos de camundongos nocaute para decorin, biglican e fibromodulin respectivamente, e em camundongos não nocaute, utilizados como grupo controle. Após 96 horas foi realizada a remoção cirúrgica dos olhos, que foram fixados em solução de paraformaldeído fosfato-tamponado 4% e emblocados em parafina. Os blocos foram seccionados e processados para análise de hematoxilina e eosina e preparados para técnica de imunoistoquímica ou hibridização *in situ*. Para identificação dos vasos sanguíneos foi utilizado o fator Von Willebrand. Apesar de

terem encontrado os três proteoglicanos nos camundongos não nocaute, os autores observaram maior expressão do decorin no estroma da córnea, enquanto o biglican e o fibromodulin foram mais expressos no epitélio. Após compararem a córnea dos camundongos nocaute e não nocaute para os três proteoglicanos, respectivamente, utilizando técnica imunoistoquímica e análise de Western Blot, os autores não encontraram maior expressão de nenhum proteoglicano nos ratos nocaute. Isso significa que, durante a angiogênese, a matriz em que ocorre invasão das células endoteliais, células inflamatórias e miofibroblastos é caracterizada pela perda de um proteoglicano específico e não há compensação pela maior expressão de nenhum outro proteoglicano. Durante a angiogênese, o decorin foi expresso nos capilares, enquanto os vasos sanguíneos originais permaneceram negativos, o que indica um papel importante do decorin na formação dos capilares. Biglican e fibromodulin foram observados tanto nos pequenos capilares como nos vasos sanguíneos maiores. A exclusiva presença do decorin nos vasos sanguíneos neoformados parece ter relevância diretamente relacionada à angiogênese, considerando que a formação de novos vasos sanguíneos foi mais lenta nos camundongos nocaute para o decorin. Os resultados indicam que, além do papel do decorin na fibrillogênese, este proteoglicano apresenta também uma função reguladora na angiogênese.

Strazynski et al. (2004) pesquisaram como ocorre a indução da expressão do decorin pelas células endoteliais durante a angiogênese. Os autores utilizaram cultura de células endoteliais humanas tratadas com interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10); ambos os tratamentos induziram formação de RNAm do proteoglicano decorin nas células endoteliais humanas. Os autores concluíram que ambas interleucinas induzem à transcrição do decorin no RNAm, mas são necessários sinais adicionais da matriz extracelular para sua tradução.

Schaefer et al. (2005) investigaram a influência do biglican no processo inflamatório, após induzirem um processo infeccioso em camundongos nocaute para biglican e não nocaute. Os autores encontraram um aumento de RNAm do biglican nos pulmões dos camundongos com processo infeccioso, comparado aos ratos sem infecção; esses dados confirmados pela técnica de imunoistoquímica e hibridização *in situ* revelaram ainda os macrófagos como fontes do proteoglicano biglican. Como consequência, os ratos nocaute para biglican apresentaram uma vantagem porque a sequência inicial dos eventos do processo inflamatório é interrompida na ausência deste componente, causando menos danos aos órgãos. Um dado importante obtido na pesquisa foi o fato de que os macrófagos uma vez ativados por interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 β (IL-1 β) começam a expressar RNAm do biglican e secretar este proteoglicano. Os resultados da pesquisa identificaram um novo papel do biglican como fator pró-inflamatório crucial.

Alimohamad et al. (2005) utilizaram amostras de gengiva inserida do palato de adultos saudáveis e, após realização da técnica de imunoistoquímica, localizaram os proteoglicanos biglican e decorin nessas amostras. O biglican foi associado a macrófagos e células basais do epitélio gengival apresentaram imunoreatividade para o biglican. Os autores concluíram que os proteoglicanos estudados, associados ao colágeno tipo I, podem colaborar para a regulação da fibrillogênese do colágeno na gengiva humana.

Bi et al. (2006) observaram que os ratos nocaute para biglican apresentaram maior reabsorção óssea em relação aos não nocaute, devido a um aumento na diferenciação de osteoclastos. Os experimentos *in vitro* demonstraram que o aumento na diferenciação dos osteoclastos é decorrência dos defeitos na

proliferação e diferenciação dos osteoblastos e seus precursores deficientes em biglican.

Modolo (2006), após estudar a distribuição de biglican e decorin na matriz extracelular de tumores odontogênicos - entre eles o ameloblastoma e o tumor odontogênico cístico calcificante -, concluiu que ambos os proteoglicanos foram identificados, principalmente, nos tecidos mesenquimais, sejam eles participantes (caso do ectomesênquima neoplásico do tumor odontogênico cístico calcificante) ou apenas componentes (caso do estroma dos ameloblastomas) das neoplasias.

3 PROPOSIÇÃO

Diante do exposto, neste trabalho a proposição é estudar a distribuição dos componentes não-colágenos - biglican e decorin – na matriz extracelular da polpa e da dentina de dentes decíduos hígidos, em diferentes fases do processo fisiológico de rizólise.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FOUSP em outubro de 2004 (Protocolo 177/04 - Anexo A).

4.2 Grupo Amostral

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados 30 dentes decíduos humanos, livres de lesões de cárie de pacientes de ambos os sexos, submetidos a tratamento odontológico. Os dentes analisados foram provenientes de extrações indicadas por motivos ortodônticos ou por apresentarem retenções prolongadas; após exodontia foram imediatamente colocados em formol 10%. Para autorizar participação de crianças no presente estudo, os responsáveis, previamente esclarecidos pelos pesquisadores, assinaram o Consentimento Livre e o instrumento de doação do dente (Apêndices A e B).

Os dentes extraídos foram divididos em três grupos, cada um deles com 10 dentes decíduos:

- Grupo I : apresentaram $\frac{2}{3}$ ou mais do comprimento radicular médio;
- Grupo II : apresentaram $\frac{1}{3}$ ou mais do comprimento radicular médio;
- Grupo III : apresentaram menos de $\frac{1}{3}$ do comprimento radicular médio.

O critério utilizado para classificação foi a mensuração individual e comparação com a tabela de médias de comprimento radicular específica para dentes decíduos (SERRA; FERREIRA, 1981).

A mensuração foi realizada com o auxílio de um compasso de ponta seca e uma régua milimetrada. Uma ponta do compasso foi colocada exatamente sobre a linha amelo cementária da porção vestibular do dente, enquanto a outra ponta foi posicionada exatamente na porção mais proeminente da porção radicular reabsorvida. Uma vez estabelecida a distância entre estes dois pontos anatômicos, através da abertura do compasso, com o auxílio de uma régua milimetrada, foi possível mensurar com precisão o comprimento radicular do dente em estudo e classificá-lo de acordo com os grupos estabelecidos.

Os dentes extraídos, depois de fixados em formol 10%, foram submetidos à descalcificação, emblocamento, seccionamento, corados em hematoxilina e eosina e posterior evidenciação imunoistoquímica.

4.3 Descalcificação

Com o intuito de diminuir o tempo gasto na descalcificação, o esmalte dos dentes foi previamente removido com o auxílio de uma ponta diamantada cilíndrica em alta rotação. Em seguida, todos os dentes foram descalcificados simultaneamente, com o uso da solução de EDTA 10% (ácido tetracético etilenodiamino) em pH 7,8.

Cada um dos três grupos (I, II e III) foi acondicionado individualmente em um recipiente de plástico perfurado. Os três recipientes foram colocados conjuntamente no interior de um béquer de vidro de 200ml contendo EDTA.

A fim de otimizar a ação do EDTA, o béquer foi colocado no interior de um forno de microondas específico (Amana® modelo RFS12MPS) associado a um aparelho tipo *cooler* (Pelco 3420 – Microwave load cooler®) que promove borbulhamento do EDTA, por meio de uma cânula plástica mergulhada no líquido, ao mesmo tempo em que o EDTA está sob o efeito da ação do microondas (BONAFE-OLIVEIRA; FALTIN; ARANA-CHAVEZ, 2003).

Outro béquer de vidro contendo água destilada também foi levado ao microondas, que recebeu um termômetro conectado ao aparelho *cooler* para monitorar a temperatura do processo de descalcificação em no máximo 30°C.

Numa cuba grande de vidro, preenchida por gelo picado, foi colocado o béquer com os dentes mergulhados em EDTA agitado por borbulhamento e também o béquer com água destilada banhando o termômetro. A cada ciclo de 15 minutos foi necessário trocar o gelo picado derretido e a cada dois ciclos de 15 minutos foi necessário trocar a solução de EDTA.

No período de tempo em que não estavam sofrendo a ação de descalcificação no aparelho de microondas, os dentes, separados por grupo, foram acondicionados em frascos que continham EDTA.

O controle da descalcificação foi realizado por meio de tomadas radiográficas e da tentativa de corte superficial do elemento dentário com o uso de uma lâmina de micrótomo.

4.4 Hematoxilina e Eosina

Imediatamente após a descalcificação, os dentes foram desidratados em bateria progressiva de álcool e incluídos em parafina.

Para a análise da morfologia celular e estruturas dentárias foram feitos cortes histológicos de 5 μ m e corados com hematoxilina e eosina (H&E).

Após análise histológica de cada elemento, os dentes foram novamente seccionados em cortes de 3 μ m para a realização da técnica de imunoistoquímica.

4.5 Imunoistoquímica

Para realização da técnica foi seguido o protocolo estabelecido pelo laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP. A análise foi feita pelo método do complexo estreptoavidina-biotina (SABC-Streptavidin-Biotin Complex). Foram realizadas reações imunoistoquímicas utilizando os anticorpos policlonais desenvolvidos em coelho contra biglican humano (LF51), decorin humano (LF136), gentilmente cedidos pelo Dr Larry W. Fisher, Matrix

Biochemistry Unit, Craniofacial and Skeletal Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA. Os clones, titulação e temperatura de incubação dos anticorpos estudados, bem como o eventual tratamento enzimático realizado, estão indicados no quadro 4.1.

Anticorpo	Clone	Título	Tempo de Incubação	Tratamento enzimático
Decorin ^(a)	(policlonal)	1:750	40 min.	Condroitinase ABC, 37°C, 60 min
Biglican ^(a)	(policlonal)	1:750	40 min.	Condroitinase ABC, 37°C, 60 min

^(a)Larry W. Fischer, Matrix Biochemistry Unit/NIH, Bethesda, MD, USA.

Quadro 4.1 – Clone, título e tempo de incubação dos anticorpos primários e tratamento enzimático utilizado

Os cortes de 3 µm foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo a base de 3-aminopropyltriethoxy-silano 25% (Sigma Chemical CO., St Louis, MO, EUA). Amostras de rim foram utilizadas como controle positivo. Para controle negativo o anticorpo primário foi substituído por albumina de soro bovino (BSA – bovin serum albumin) e soro fetal bovino em tampão tris (hidroximetil)aminometano-(Tris).

Os cortes foram desparafinados em xilol, sendo o primeiro banho realizado a 60°C durante 30 minutos e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos. Após a secagem foi realizada a reidratação dos cortes em uma série de etanol em concentrações decrescentes: três passagens, de 5 minutos cada uma, em etanol absoluto, seguidas por etanol 95% e 85%. Com a finalidade de remover o pigmento formólico dos tecidos, as lâminas foram imersas, durante 10 minutos, em solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol a 95%. Posteriormente foram lavadas em água corrente por 10 minutos e em água destilada por 5 minutos.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio a 6% em metanol na proporção de 1:1, em dois banhos de 20 minutos cada.

A lavagem em água corrente foi repetida por 10 minutos, passando para água destilada duas vezes e depois para a solução de TRIS-HCL (hidroximetil-amino-metano) a 0,5M, pH 7,4; dois banhos para os espécimes que não passariam pelo tratamento com a enzima condroitinase e dois banhos em solução tampão de TRIS-HCL (hidroximetil-amino-metano) a 20mM, pH 8,0 para os espécimes que passariam pelo tratamento com a enzima, sendo cada imersão de 5 minutos.

Prosseguiu-se com o tratamento com a enzima condroitinase ABC (Seikagaku®, Japan) para quebrar a ligação dos proteoglicanos com os glicosaminoglicanos e permitir o acesso dos anticorpos aos epítomos, quando necessário (quadro 4.1). Para tanto, essas amostras foram incubadas em uma solução tampão TRIS-HCL (hidroximetil-amino-metano) a 20mM, pH 8,0, contendo 0,2 U/mL de condroitinase ABC, durante 1 hora a 37°C, em câmara úmida.

A seguir os cortes passaram por dois banhos em solução tampão de TRIS-HCL (hidroximetil-amino-metano) a 0,5M, pH 7,4, 5 minutos cada imersão.

Para bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos, foi realizada incubação com soro suíno normal (Dako Corp.®, Carpinteria, CA), em câmara úmida, por 60 minutos, seguida por três banhos em TRIS-HCL (hidroximetil-amino-metano) a 0,5M, pH 7,4 por 5 minutos cada imersão.

Após essas etapas, todos os cortes seguiram para o equipamento DAKO Autostainer Universal Staining System (DAKO Corp.®, Carpinteria, CA, USA), onde a reação foi concluída com o seguinte protocolo:

1. Incubação dos anticorpos primários sob temperatura controlada a 37°C.

2. Incubação com o complexo terciário estreptavidina-biotina (Kit LSAB Peroxidase K0690 – Dako Corp.[®], Carpinteria, CA, USA).
3. Revelação da reação com DAKO Liquid DAB plus (cód. K3468) (Dako Corp.[®], Carpinteria, CA, USA).
4. Contra-coloração com hematoxilina de Mayer.
5. Entre cada uma das reações realizadas automaticamente, os cortes foram lavados duas vezes em TBST.

A seguir, todos os cortes foram desidratados numa série de etanol em concentrações crescentes (80%, 95% e três vezes em álcool absoluto) por 5 minutos cada e, em seguida, diafanizados em xilol, seguindo para montagem em resina Permunt (Fisher Scientific[®], New Jersey, NY, USA).

4.6 Análise do Material

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz, por dois observadores calibrados, para identificar a presença ou ausência de marcação para cada proteoglicano e seu padrão de expressão nos tecidos dentários.

A imunorreatividade foi determinada na matriz dentinária (dentina, metadentina e pré-dentina), polpa (camada de odontoblastos, região central da polpa e áreas de hialinização) e área de reabsorção (tecidos em processo de reabsorção e zona adjacente ao processo de reabsorção). As localizações e a intensidade da marcação foram determinadas pela observação do autor e comparação dentro da amostra.

Os resultados foram analisados de acordo com os três grupos pré-estabelecidos, relacionando o estágio de reabsorção radicular e a imunoexpressão das proteínas estudadas, conforme os critérios utilizados por Bönecker et al. (2003), Garcia et al. (2003), Modolo, (2006) e Modolo et al. (2004). As marcações foram consideradas negativas (-), fracamente positivas (+), positivas (++) ou fortemente positivas (+++), de acordo com a intensidade de impregnação da substância cromógena.

5 RESULTADOS

5.1 Análise dos cortes histológicos em hematoxilina e eosina

A polpa, nos cortes histológicos em hematoxilina e eosina dos dentes decíduos estudados, era constituída por tecido conjuntivo frouxo, moderadamente celularizado, no qual foram notados vasos sanguíneos pouco calibrosos e feixes de fibras nervosas. Ocasionalmente foram encontrados cálculos pulpares na matriz extracelular da polpa dentária.

Na região subjacente à pré-dentina localizavam-se os odontoblastos dispostos em paliçada, constituindo uma camada única de células blásticas, que contornavam a periferia da polpa dentária e apresentavam-se altamente polarizadas, com seu núcleo localizado no pólo proximal adjacente à região subodontoblástica.

Nesta, mais evidente na porção coronária da polpa dentária, foram observadas a zona pobre em células, atravessada por numerosos prolongamentos de células subjacentes e a zona rica, constituída pelos corpos dos fibroblastos, células indiferenciadas e capilares sanguíneos.

As modificações observadas neste tecido conjuntivo pulpar, de acordo com o grau de rizólise do dente decíduo, estão descritas a seguir:

5.2 Rizólise dos dentes decíduos

5.2.1 Grupo I

Nas lâminas coradas por hematoxilina e eosina foram observadas alterações morfológicas e estruturais no tecido pulpar dos dentes decíduos que se apresentavam em fase inicial do processo de rizólise (2/3 ou mais do comprimento radicular médio). Essas alterações variaram de acordo com a região observada. Na porção coronária, tanto os tecidos mineralizados quanto os não-mineralizados apresentaram-se bastante organizados com características de normalidade como descrito acima, não apresentando infiltrado inflamatório (Figura 5.1A). Entretanto, com a proximidade da região apical, essa organização foi gradativamente diminuindo, sendo constantemente observadas células clásticas. Os odontoblastos, tornaram-se menos numerosos e organizados à medida que se aproximavam da área radicular que estava sofrendo reabsorção. Na região da polpa radicular, as fibrilas colágenas apresentavam-se dispostas de maneira mais densa do que na região da polpa coronária, onde eram mais esparsas (Figura 5.1B).

5.2.2 Grupo II

Nas lâminas coradas por hematoxilina e eosina que se encontravam na fase intermediária do processo de rizólise – e, portanto, possuíam 1/3 ou mais do comprimento radicular médio - observou-se que o tecido conjuntivo pulpar apresentava-se mais denso e com ausência de infiltrado inflamatório. A camada de

odontoblastos, localizada mais próxima à porção coronária da polpa, revelava aspecto de pseudo-estratificação enquanto que os odontoblastos passaram a apresentar forma cúbica e mostraram-se menos organizados ao longo da interface dentina e polpa na porção intermediária da raiz. Na região mais próxima à área de reabsorção, observou-se que os corpos dos odontoblastos apresentavam-se menos alongados, assumindo morfologia cúbica; estas células perderam sua disposição e organização celular em paliçada. Neste grupo e no grupo I foram observadas lacunas de reabsorção em grande extensão na dentina e pré-dentina, com presença de células clásticas (Figura 5.1C).

5.2.3 Grupo III

Nos dentes decíduos do grupo III, que se encontravam em fase final do processo de rizólise – e, portanto, possuíam menos de 1/3 do comprimento radicular médio -, observou-se a camada de odontoblastos desorganizada e escassa. O tecido pulpar apresentou-se permeado por infiltrado inflamatório mononuclear; que variou de discreto a intenso em algumas áreas (Figura 5.1D).

5.3 Expressão dos proteoglicanos de acordo com as fases de rizólise

5.3.1 Biglican

O proteoglicano biglican apresentou expressão fracamente positiva na dentina, negativa na metadentina e fortemente positiva na pré-dentina nos três grupos estudados. Na matriz extracelular da polpa, os odontoblastos apresentaram marcação negativa; as ramificações dos fibroblastos apresentaram marcação fracamente positiva; as fibras colágenas, marcação positiva e as áreas de hialinização marcação fortemente positiva nos três grupos estudados (Figura 5.2 A,C,D). Na área de reabsorção não houve diferença no padrão de expressão entre três grupos: houve uma expressão mais intensa nos tecidos em processo de reabsorção (positiva) e uma diminuição gradativa em direção a polpa coronária, sendo que a zona adjacente ao processo de reabsorção apresentou expressão fracamente positiva (Figura 5.2 B,D,F). Foi observada marcação positiva ao redor de vasos sanguíneos e feixes nervosos e negativa em odontoclastos.

5.3.2 Decorin

O proteoglicano decorin apresentou expressão negativa na dentina, fracamente positiva na metadentina e na pré-dentina nos três grupos estudados (Figura 5.3 A,C,D). Na matriz extracelular da polpa, os odontoblastos apresentaram expressão negativa; as ramificações dos fibroblastos, expressão fracamente positiva; as fibras colágenas apresentaram marcação positiva e as áreas de hialinização marcação fortemente positiva nos três grupos. Na área de reabsorção

foi possível observar uma marcação mais intensa na zona adjacente ao processo de reabsorção (positiva) e fracamente positiva nos tecidos em processo de reabsorção. Este padrão manteve-se nos dois primeiros grupos estudados. No grupo III, a zona adjacente ao processo de reabsorção apresentou-se com marcação fracamente positiva e os tecidos em processo de reabsorção tiveram uma expressão mais intensa (marcação positiva) (Figura 5.3 B,D,F). Além disso, foi observada marcação positiva ao redor de vasos sanguíneos e feixes nervosos e negativa em odontoclastos.

Os resultados dos três grupos estudados podem ser observados nas figuras 5.1, 5.2 e 5.3 e nas tabelas 5.1 e 5.2.

Figura 5.1 - Fotomicrografias dos cortes de dentes decíduos corados em H/E utilizados como referência para visualização da morfologia celular e estruturas dentárias. Em A observa-se a região da dentina, pré-dentina, camada de odontoblastos e porção coronária da polpa de dente decíduo. Em B observa-se uma maior concentração de fibras colágenas na polpa coronária em dente do grupo I. Em C observa-se lacunas de reabsorção dentinária com presença de células clásticas em dente do grupo II. Em D, é observada a presença de infiltrado inflamatório no tecido pulpar em dente do grupo III. Abreviações: d, dentina; pd, pré dentina; p, polpa; fc, fibras colágenas; cc, células clásticas. Aumento original de 20 x em A e 40 x em B, C, D

Tabela 5.1 - Perfil imunoistoquímico apresentado pelo proteoglicano biglican nos grupos I, II e III

		Grupo I	Grupo II	Grupo III
Matriz dentinária	Dentina	+	+	+
	Metadentina	-	-	-
	Pré-dentina	+++	+++	+++
Polpa	Odontoblastos	-	-	-
	Tecido conjuntivo	++	++	++
	Áreas de hialinização	+++	+++	+++
Área de reabsorção	Zona adjacente ao processo de reabsorção	+	+	+
	Tecidos em processo de reabsorção	++	++	++

- ausência de marcação

+ marcação fracamente positiva

++ marcação positiva

+++ marcação fortemente positiva

Figura 5.2 - Fotomicrografias dos cortes de dentes decíduos após reação imunoistoquímica para o biglican. A e B - grupo I, C e D - grupo II e E e F - grupo III. Em A, C e E observa-se marcação fracamente positiva na dentina, negativa na metadentina, fortemente positiva na pré-dentina e positiva na polpa. Em B, D e F observa-se : marcação positiva nos tecidos em processo de reabsorção representados por * e marcação fracamente positiva na zona adjacente ao processo de reabsorção, representada por **. Abreviações: d: dentina; pd: pré-dentina; p: polpa. Aumento original de 20 x em A a F

Tabela 5.2 - Perfil imunoistoquímico apresentado pelo proteoglicano decorin nos grupos I, II e III

		Grupo I	Grupo II	Grupo III
Matriz dentinária	Dentina	-	-	-
	Metadentina	+	+	+
	Pré-dentina	+	+	+
Polpa	Odontoblastos	-	-	-
	Tecido conjuntivo	++	++	++
	Áreas de hialinização	+++	+++	+++
Área de reabsorção	Zona adjacente ao processo de reabsorção	++	++	+
	Tecidos em processo de reabsorção	+	+	++

- ausência de marcação

+ marcação fracamente positiva

++ marcação positiva

+++ marcação fortemente positiva

Figura 5.3 - Fotomicrografias dos cortes de dentes decíduos após reação imunoistoquímica para o decorin. A e B - grupo I, C e D - grupo II e E e F - grupo III. Em A, C e E observa-se marcação negativa na dentina, fracamente positiva na metadentina e pré-dentina e positiva na polpa. Em B e D observa-se marcação fracamente positiva nos tecidos em processo de reabsorção representados por * e positiva na zona adjacente ao processo de reabsorção representada por **. Em F observa-se marcação positiva nos tecidos em processo de reabsorção (*) e fracamente positiva na zona adjacente ao processo de reabsorção (**). Abreviações: d: dentina; mt: metadentina; pd: pré-dentina; p: polpa

6 DISCUSSÃO

O presente estudo verificou que os proteoglicanos biglican e decorin apresentaram imunorreatividade nos tecidos dentários em todas as fases do processo de rizólise, evidenciando sua atividade mesmo em fases avançadas do ciclo biológico do dente decíduo.

Para instituição do tratamento endodôntico, adequado às condições de resposta da polpa, torna-se fundamental o conhecimento da dinâmica histológica do tecido pulpar nas diversas fases de rizólise; por isso, a necessidade de conhecer melhor a expressão e ação de algumas proteínas. Poucos são os trabalhos encontrados na literatura a respeito dos efeitos da reabsorção fisiológica no potencial de reparação da polpa de dentes decíduos (BÖNECKER et al., 2003; SARI; ARAS; GUNHAN, 1999).

Os proteoglicanos analisados nesta pesquisa foram escolhidos por representarem as principais proteínas não-colágenas da MEC dos tecidos dentários (WADDINGTON et al., 2003) e por não terem sido estudados anteriormente em dentes decíduos. Com o objetivo de investigar possíveis papéis destas proteínas nos tecidos dentários, outras proteínas da matriz extracelular da dentina e polpa já foram estudadas em dentes decíduos - como colágeno I e III, fibronectina, tenascina, osteonectina e BMP4 - proteína morfogenética do osso (BÖNECKER et al., 2003) -, e em dentes permanentes - osteopontina e sialoproteína óssea (LEE et al., 2004). com o objetivo de investigar possíveis papéis destas proteínas nos tecidos dentários.

Biglican e decorin já tiveram suas expressões observadas na polpa e germes dentários em desenvolvimento tanto de humanos como de outras espécies de

animais (GARCIA et al., 2003; GOLDBERG et al., 2003; GOLDBERG et al., 2005; HARLAMB; MESSER, 1996; MATSUURA et al., 2001; SARI; ARAS; GUNHAN, 1999; SEPTIER et al., 2001; TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003; WADDINGTON et al., 2003; WADDINGTON et al., 2004; YOSHIBA et al., 1996). Porém, não há relatos a respeito de imunoexpressão destes proteoglicanos na matriz extracelular de dentes decíduos.

Além disso, estes componentes já foram estudados em tecido periodontal humano inflamado (OKSALA et al., 1997; WADDINGTON et al., 1998) e em tumores odontogênicos (MODOLO, 2006). Na área médica são bastante estudados em vários tecidos como renal (SCHAEFER et al., 2004), na angiogênese (NELIMARKKA et al., 2001; SCHÖNHERR et al., 2004) e principalmente na matriz extracelular óssea (BI et al., 2006; BIANCO et al., 1990; EMBERY, 1991; FISHER; TERMINE; YOUNG, 1989; WADDINGTON et al., 2003; WADDINGTON, REES et al., 2001; YOUNG et al., 2003).

Foi possível observar uma diferença na expressão do decorin na dentina da camada mais próxima a pré-dentina para a camada mais externa. Será utilizada na discussão do trabalho a denominação de metadentina, adotada por Goldberg e Septier (1996) e utilizada, posteriormente também por Septier et al. (2001) para a zona de transição entre a pré-dentina e a dentina, com dimensão variando de 0.5 a 5 μm .

Por ter apresentado diferenças na intensidade de marcação tanto para o biglican como para o decorin, a área de reabsorção foi dividida em duas regiões para facilitar o entendimento da distribuição dos proteoglicanos. A porção onde ocorre a reabsorção foi denominada de tecidos em processo de reabsorção e a região imediatamente próxima, de zona adjacente ao processo de reabsorção.

6.1 Biglican

Os resultados obtidos pela pesquisa do biglican na matriz extracelular da dentina e polpa demonstraram uma uniformidade no padrão de marcação imunoistoquímica entre os grupos de dentes estudados, com exceção da área de reabsorção.

Independente do estágio de reabsorção, foi encontrada expressão fracamente positiva na dentina, expressão negativa do biglican na metadentina e fortemente positiva na pré-dentina. Já na pré-dentina, ambos os proteoglicanos apresentaram expressão; porém, houve variação na intensidade da mesma. Os resultados diferem do estudo de Goldberg e Septier (1996) que encontraram ausência de marcação de proteoglicanos na pré-dentina e maior expressão na metadentina em incisivos de ratos.

Septier et al. (2001) ao pesquisarem a expressão do biglican em incisivos de ratos por meio de microscopia imunoeletrônica, demonstraram uma marcação bastante homogênea na pré-dentina, metadentina e dentina, o que não foi observado no presente estudo, à medida que não se observou expressão do biglican na metadentina e houve variação na intensidade de marcação na dentina e pré-dentina. Goldberg et al. (2003) também encontraram expressão uniforme do biglican na pré-dentina, após avaliarem dentes de ratos pela técnica de imunoistoquímica. Os autores avaliaram a expressão do biglican em ratos nocaute para biglican com um dia de vida e, após análise imunoistoquímica dos molares inferiores, concluíram que a metadentina apresentou-se mais larga e porosa; a dentina mais porosa, a dentina do manto, próxima à junção amelodentinária

apresentou-se menos mineralizada e mais heterogênea, quando comparados aos resultados obtidos com ratos não nocaute. Estas alterações lembram o fenótipo semelhante à osteoporose observados em ratos nocaute para biglican por Xu et al. (1998) e Young et al. (2003). Os dados sugerem um importante papel do biglican na formação de dentina e mineralização dos tecidos (WADDINGTON et al., 2003).

Tenório, Santos e Zorn (2003), após estudarem a distribuição de proteoglicanos em germes dentários de ratos com 5, 7, 9 e 11 dias e 2 meses de idade, pela técnica de imunoistoquímica, concluíram que o biglican foi expresso na pré-dentina durante todo o período do estudo, sugerindo um papel estrutural deste proteoglicano pela interação com fibras colágenas. Os trabalhos realizados em animais por Tenório, Santos e Zorn (2003) e Waddington et al. (2003) mostraram que o biglican está presente na pré-dentina e, de acordo com os resultados do presente trabalho, o biglican foi expresso na pré-dentina nos dentes decíduos nas três fases de rizólise, sugerindo que o mesmo participa da mineralização não só na fase de desenvolvimento dos tecidos dentários, mas durante todo o ciclo biológico do dente decíduo.

Nos trabalhos realizados com ratos nocaute para o biglican (BGC KO) Goldberg et al. (2002, 2003, 2005) encontraram formação de dentina porosa e pobremente mineralizada, o que indica que o biglican promove a formação e mineralização de dentina, agindo como um regulador da organização da matriz extracelular.

Em relação à camada de odontoblastos, Matsuura et al. (2001) relataram expressão negativa para o biglican nos odontoblastos secretores, o que está de acordo com o resultado apresentado na presente pesquisa.

Nos três grupos estudados foi encontrada marcação positiva do proteoglicano biglican no tecido pulpar, sendo mais intensa nas áreas de hialinização próximas aos capilares, conforme verificado por Modolo (2006) que, após estudar a expressão do biglican no estroma dos ameloblastomas e ectomesênquima neoplásico dos tumores odontogênicos císticos calcificantes, encontrou expressão do biglican nas áreas próximas ao epitélio neoplásico e áreas de hialinização. Esse resultado pode ser explicado pelo fato do biglican exercer papel estrutural devido a sua interação com fibras colágenas do tipo I e VI (TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003; ZANOTI et al., 2005) e papel de regulador da organização da MEC (GOLDBERG et al., 2002).

Nos três grupos foi encontrada marcação positiva na zona adjacente ao processo de reabsorção e uma diminuição desta expressão nos tecidos em processo de reabsorção (marcação fracamente positiva). Até este momento não é possível realizar comparações de resultados, pois não há pesquisas a respeito da expressão dos proteoglicanos estudados envolvendo dentes decíduos em processo de reabsorção. De acordo com Hammarstrom e Lindskog (1992), as células que reabsorvem os tecidos mineralizados dos dentes são do mesmo tipo que os osteoclastos. Em pesquisas envolvendo camundongos nocaute para biglican, Bi et al. (2006) relataram que estes ratos apresentaram maior reabsorção óssea em comparação aos animais controle, devido ao aumento na diferenciação dos osteoclastos. Xu et al. (1998) também associaram a ausência de biglican ao desenvolvimento de fenótipo semelhante à osteoporose. A presença deste componente nas áreas próximas à reabsorção dos dentes decíduos pode sugerir sua participação neste processo intermitente. Assim, o biglican pode ainda regular as fases de reabsorção e deposição dentinária.

6.2 Decorin

Os resultados obtidos pela pesquisa do decorin na matriz extracelular da dentina e polpa de dentes decíduos demonstraram uniformidade no padrão de marcação imunoistoquímica entre os grupos de dentes estudados.

Independente do estágio de reabsorção foi encontrada expressão negativa do decorin na dentina; porém na metadentina e na pré-dentina, os resultados mostraram marcação fracamente positiva. Goldberg e Septier (1996) relataram que a mineralização da dentina não ocorre ao longo da interface pré-dentina/dentina, e sim por meio da metadentina. A expressão do decorin nessa zona indica sua participação ativa no processo de mineralização da dentina, independente da fase de rizólise do dente decíduo, implicando assim no potencial de reparação dos mesmos.

Septier et al. (2001), pesquisando a expressão do decorin em incisivos de ratos por meio de microscopia imunoelétrica, demonstraram que esse proteoglicano apresentou marcação mais expressiva na porção distal da pré-dentina (mais próxima à dentina) em relação às porções central e proximal (mais próximas a camada de odontoblastos). A maior expressão do decorin próximo ao início de mineralização sugere também uma relação entre o proteoglicano e a mineralização da dentina (GOLDBERG et al., 2003). O decorin também foi expresso na metadentina e na dentina, porém em concentrações menores. Os resultados da presente pesquisa reforçam a marcação na metadentina e na pré-dentina, embora a mesma tenha sido homogênea na pré-dentina. Fanchon et al. (2004) também relataram maior expressão do decorin na pré-dentina, e concordam com Armstrong,

Barrach e Ehrlich (2002) que os proteoglicanos intactos inibem a mineralização; portanto, é necessário haver uma degradação dos mesmos pelas metaloproteinases antes da mineralização dos tecidos dentários. Ainda segundo esses autores, a metaloproteinase MMP-3 tem um papel importante no início de mineralização do germe dentário.

Apesar de não haver até este momento estudos envolvendo análise imunoistoquímica do proteoglicano decorin em dentes decíduos, após uma análise comparativa com pesquisas envolvendo dentes permanentes humanos e dentes de animais, pode-se relatar que os dados encontrados diferem dos resultados obtidos por Yoshida et al. (1996). Em trabalho realizado com terceiros molares não-irrompidos e parcialmente desenvolvidos, pré-molares irrompidos e terceiros molares com ápices fechados, esses autores observaram ausência de marcação para o decorin na pré-dentina e dentina do manto. Na dentina circumpulpar foi encontrada intensa positividade nos túbulos dentinários e na junção pré-dentina/dentina, região denominada de início de mineralização.

Na presente pesquisa não houve expressão do decorin nos odontoblastos, o que reforça os resultados encontrados por Tenório, Santos e Zorn (2003) e em desacordo com os achados de Matsuura et al. (2001) e Yoshida et al. (1996).

Na matriz extracelular da polpa foi encontrada marcação positiva e fortemente positiva em áreas de hialinização, ao redor de vasos sanguíneos, feixes nervosos e áreas de maior acúmulo de fibras colágenas. Porém, as células endoteliais dos vasos sanguíneos não apresentaram marcação positiva, em desacordo com os achados de Yoshida et al. (1996). Em pesquisa com germes dentários de ratos com idades de 5, 7, 9 e 11 dias e 2 meses, Tenório, Santos e Zorn (2003) afirmaram que, durante todo o período do estudo, o decorin foi exclusivamente expresso na pré-

dentina. Nos ratos com dois meses de idade, também encontraram positividade para o decorin na matriz extracelular da polpa, concentrado principalmente na periferia da mesma. Apesar de terem sido utilizados dentes decíduos já em processo de reabsorção e, portanto, a polpa não apresentar nessa fase função de formação, como em germes dentários, os resultados da presente pesquisa estão de acordo com as constatações de Tenório, Santos e Zorn (2003). Isso pode ter relação a possível contribuição da expressão do decorin na polpa de dentes em fases de reabsorção para a manutenção de algumas células indiferenciadas e do estado de não mineralização do tecido pulpar. Já foi relatado um possível papel para o decorin como inibidor de mineralização. Esse proteoglicano parece ocupar sítios bloqueando a interação entre o colágeno e as moléculas que iniciariam esse processo e, conseqüentemente, regula o padrão de mineralização pelo colágeno (EMBERY et al., 2001).

Waddington et al. (2003), após purificarem proteoglicanos extraídos de dentes decíduos de bezerros com três semanas de vida, identificaram decorin nos extratos da interface pré-dentina/dentina e na dentina, da mesma forma que o constatado na presente pesquisa. Porém, pela análise dos glicosaminoglicanos constituintes dos proteoglicanos, foi observada diferença destes em cada fração, ou seja, na pré-dentina foi encontrada maior proporção de dermatan sulfato, seguido de ácido hialurônico e condroitino sulfato. Na interface pré-dentina/dentina a proporção de condroitino sulfato aumentou, enquanto diminuiu a proporção de dermatan sulfato e ácido hialurônico. Na matriz dentinária apenas condroitino sulfato foi identificado. Considerando as modificações estruturais dos proteoglicanos estudados - biglican e decorin -, particularmente no início da mineralização, os autores também sugeriram um envolvimento ativo destas macromoléculas nesse processo.

Goldberg et al. (2005), após análise imunistoquímica de germes dentários de ratos com um dia de vida, encontraram expressão de decorin na pré-dentina de incisivos e molares, de acordo com os resultados deste trabalho em dentes decíduos humanos. Após caracterizarem os fenótipos dentários de ratos nocaute para decorin (DCN KO) e biglican (BGN KO) e compará-los com ratos não nocaute, os autores relataram ausência de formação de esmalte nos molares dos ratos nocaute para decorin e presença de dentina porosa e pobremente mineralizada. A metadentina apresentou-se mais larga do que nos ratos não nocaute.

Nos três grupos estudados foi encontrada marcação positiva mais intensa do proteoglicano decorin nas áreas de hialinização. Como grande parte dos trabalhos encontrados na literatura analisaram a expressão de decorin em germes dentários ou em dentes em estágios iniciais de desenvolvimento, não é possível comparar os resultados obtidos; porém, esta distribuição do decorin suporta sua postulada função de regulação da reunião e crescimento das fibras colágenas (BIANCO et al., 1990).

Na área de reabsorção também foi encontrada marcação positiva na zona adjacente ao processo de reabsorção e uma diminuição desta expressão nos tecidos em processo de reabsorção (marcação fracamente positiva) nos grupos I e II, ou seja, em dentes com 1/3 ou mais do comprimento radicular. Já no grupo III este padrão inverteu-se, ou seja, nos dentes que se apresentavam em fase final de reabsorção, a expressão foi mais intensa nos tecidos em processo de reabsorção (marcação positiva) do que na zona adjacente ao processo de reabsorção (marcação fracamente positiva). A expressão destes proteoglicanos nesta região ainda não foi estudada por outros autores, porém consideradas as diferenças na distribuição do decorin nos três grupos estudados, o mesmo foi expresso em todos

os dentes avaliados, o que sugere a importância de sua função até o final do ciclo biológico do dente decíduo.

O proteoglicano decorin foi expresso em áreas inflamadas do tecido conjuntivo pulpar dos dentes pertencentes ao grupo III (que apresentavam menos de 1/3 de comprimento radicular). Para ocorrer a reabsorção radicular dos dentes decíduos, é necessário um dano à camada de cementoblastos em combinação com necrose, inflamação ou reposição dos cementoblastos por osteoblastos (HAMMARSTRON; LINDSKOG, 1992), o que justifica a inflamação presente nestes dentes hígidos.

Por se apresentarem em processo avançado de rizólise, muitas vezes o tecido pulpar destes dentes hígidos entra em contato com o tecido periodontal e, na presença de microorganismos constituintes da flora oral, podem desencadear um processo inflamatório no tecido pulpar. A própria mobilidade do dente também pode ser um fator para desencadeamento de um processo inflamatório (BÖNECKER et al., 2003).

Na literatura médica o decorin também tem sido associado à angiogênese principalmente nos casos de inflamação (NELIMARKKA et al., 2001; SCHÖNHERR et al., 2004). Esses autores identificaram a expressão do proteoglicano em células endoteliais de capilares neoformados, durante a angiogênese, em córnea de camundongos. Não foi objetivo desta pesquisa identificar vasos neoformados no tecido pulpar; porém, em estudos posteriores a identificação destas estruturas contribuirá para um melhor entendimento da dinâmica pulpar dos dentes decíduos.

Na presente pesquisa a expressão do decorin em áreas de hialinização próximas a capilares do tecido pulpar foi identificada nos três grupos estudados. Tal observação reforça pesquisas em outros órgãos, como por exemplo a córnea, onde

Schönherr et al. (2004) também identificaram a presença de decorin ao redor de vasos sanguíneos na córnea de camundongos sem presença de inflamação.

6.3 Considerações clínicas

O conhecimento da dinâmica histológica do tecido pulpar é importante para a instituição do tratamento nos dentes decíduos. Considerando que o biglican e o decorin participam do processo de mineralização e foram expressos nos tecidos dentários nas três fases de rizólise, pode – se supor que estes proteoglicanos participam do processo de reparação durante todo o ciclo biológico desses dentes. Extrapolando os resultados para a prática clínica, pode-se sugerir a instituição de tratamentos mais conservadores como o tratamento pulpar indireto ou capeamento pulpar direto mesmo em estágios mais avançados de rizólise, devido à expressão isolada dos proteoglicanos relatada. Contudo, não se observa na prática clínica taxas altas de sucesso quando da instituição de tratamentos mais conservadores em dentes em fases avançadas de rizólise. Isso ocorre, provavelmente, porque o conjunto de inúmeras proteínas, assim como outros constituintes da polpa, contribuem para a resposta pulpar em dentes com estágios avançados de rizólise. Por outro lado, como o biglican e o decorin foram observados na área de reabsorção nos três grupos de dentes estudados, parece que estes desempenham um papel importante no processo intermitente de reabsorção dentinária.

Estudos adicionais são necessários para que se obtenha melhor entendimento da função destes proteoglicanos nas várias fases de rizólise dos dentes decíduos.

7 CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, é possível concluir que:

1. Os proteoglicanos biglican e decorin foram expressos na matriz dentinária, na polpa dentária e na área de reabsorção dos dentes decíduos hígidos nas três fases de rizólise.

2. Considerando as diversas fases de rizólise, apenas na área de reabsorção houve diferença na distribuição e no padrão de expressão do biglican e decorin.

REFERÊNCIAS¹

Alimohamad H, Habijanac T, Larjava H, Hakkinen L. Colocalization of the collagen-binding proteoglycans decorin, biglycan, fibromodulin and lumican with different cells in human gingiva. *J Periodontal Res* 2005;40(1):73-86.

Araujo FBD. Estudo morfológico, histométrico e histoquímico da polpa de molares decíduos em diferentes fases de reabsorção radicular [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1982.

Armstrong AL, Barrach HJ, Ehrlich MG. Identification of the metalloproteinase stromelysin in the physis. *J Orthop Res* 2002;20(2):289-94.

Bi Y, Nielsen KL, Kilts TM, Yoon A, A Karsdal M, Wimer HF, et al. Biglycan deficiency increases osteoclast differentiation and activity due to defective osteoblasts. *Bone* 2006;38(6):778-86.

Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 1990;38(11):1549-63.

Bonafe-Oliveira L, Faltin RM, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and histochemical examination of alveolar bone at the pressure areas of rat molars submitted to continuous orthodontic force. *Eur J Oral Sci* 2003;111(5):410-6.

Bönecker M, Mantesso A, Araújo VC, Araújo NS. Imunoexpressão de proteínas da matriz extracelular da polpa de dentes decíduos durante o processo de rizólise [resumo Pa053]. *Pesq Odontol Bras* 2003;17 Supl:114.

Chakravarti S, Paul J, Roberts L, Chervoneva I, Oldberg A, Birk DE. Ocular and scleral alterations in gene-targeted lumican-fibromodulin double-null mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(6):2422-32.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo bases de Dados MEDLINE.

Chen XD, Bian X, Teslovich TM, Stephan DA, Young MF. Dissection of the sets of genes that control the behavior of biglycan-deficient pre-osteoblasts using oligonucleotide microarrays. *Bone* 2005;37(2):192-203.

Chiquet-Ehrismann R, Tannheimer M, Koch M, Brunner A, Spring J, Martin D, et al. Tenascin-C expression by fibroblasts is elevated in stressed collagen gels. *J Cell Biol* 1994;127(6 Pt 2):2093-101.

Di Nicolo R, Guedes-Pinto AC, Carvalho YR. Histopathology of the pulp of primary molars with active and arrested dentinal caries. *J Clin Pediatr Dent* 2000;25(1):47-9.

Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12(4):331-49.

Fanchon S, Bourd K, Septier D, Everts V, Beertsen W, Menashi S, et al. Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. *Eur J Oral Sci* 2004;112(2):171-6.

Fisher LW, Termine JD, Young MF. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem* 1989;264(8):4571-6.

Garcia JM, Martins MD, Jaeger RG, Marques MM. Immunolocalization of bone extracellular matrix proteins (type I collagen, osteonectin and bone sialoprotein) in human dental pulp and cultured pulp cells. *Int Endod J* 2003;36(6):404-10.

Goldberg M, Lasfargues JJ. Pulpo-dentinal complex revisited. *J Dent* 1995;23(1):15-20.

Goldberg M, Septier D. A comparative study of the transition between predentin and dentin, using various preparative procedures in the rat. *Eur J Oral Sci* 1996;104(3):269-77.

Goldberg M, Takagi M. Dentine proteoglycans: composition, ultrastructure and functions. *Histochem J* 1993;25(11):781-806.

Goldberg M, Septier D, Rapoport O, Young M, Ameye L. Biglycan is a repressor of amelogenin expression and enamel formation: an emerging hypothesis. *J Dent Res* 2002;81(8):520-4.

Goldberg M, Septier D, Rapoport O, Iozzo RV, Young MF, Ameye LG. Targeted disruption of two small leucine-rich proteoglycans, biglycan and decorin, exerts divergent effects on enamel and dentin formation. *Calcif Tissue Int* 2005;77(5):297-310.

Goldberg M, Rapoport O, Septier D, Palmier K, Hall R, Embery G, et al. Proteoglycans in predentin: the last 15 micrometers before mineralization. *Connect Tissue Res* 2003;44 Suppl 1:184-8.

Hall RC, Embery G. The use of immunohistochemistry in understanding the structure and function of the extracellular matrix of dental tissues. *Adv Dent Res* 1997;11(4):478-86.

Hammarstrom L, Lindskog S. Factors regulating and modifying dental root resorption. *Proc Finn Dent Soc* 1992;88 Suppl 1:115-23.

Harlamb SC, Messer HH. The identification of proteoglycan-associated mRNAs in human dental pulp cells. *Arch Oral Biol* 1996;41(11):1097-100.

Hillmann G, Geurtsen W. Light-microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. *Cell Tissue Res* 1997;289(1):145-54.

Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998;67:609-52.

Katchburian E, Arana-Chavez VE. *Histologia e embriologia oral : texto-atlas-correlações clínicas* 2ed. Rio de Janeiro Guanabara-Koogan; 2004.

Lee A, Schneider G, Finkelstein M, Southard T. Root resorption: the possible role of extracellular matrix proteins. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;126(2):173-7.

Lewandowska K, Choi HU, Rosenberg LC, Zardi L, Culp LA. Fibronectin-mediated adhesion of fibroblasts: inhibition by dermatan sulfate proteoglycan and evidence for a cryptic glycosaminoglycan-binding domain. *J Cell Biol* 1987;105(3):1443-54.

Martinez EF, Araujo VC. In vitro immunoexpression of extracellular matrix proteins in dental pulpal and gingival human fibroblasts. *Int Endod J* 2004;37(11):749-55.

Matsuura T, Duarte WR, Cheng H, Uzawa K, Yamauchi M. Differential expression of decorin and biglycan genes during mouse tooth development. *Matrix Biol* 2001;20(5-6):367-73.

Mattuella LG. Expressão do VEGFR-2 em polpas de dentes decíduos e permanentes jovens humanos [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.

Modolo F. Distribuição dos componentes não colágenos da matriz extracelular em tumores odontogênicos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

Modolo F, Martins MT, Loducca SV, de Araujo VC. Expression of integrin subunits alpha2, alpha3, alpha5, alphav, beta1, beta3 and beta4 in different histological types of ameloblastoma compared with dental germ, dental lamina and adult lining epithelium. *Oral Dis* 2004;10(5):277-82.

Nelimarkka L, Salminen H, Kuopio T, Nikkari S, Ekfors T, Laine J, et al. Decorin is produced by capillary endothelial cells in inflammation-associated angiogenesis. *Am J Pathol* 2001;158(2):345-53.

Oksala O, Haapasalmi K, Hakkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Expression of heparan sulphate and small dermatan/chondroitin sulphate proteoglycans in chronically inflamed human periodontium. *J Dent Res* 1997;76(6):1250-9.

Oksala O, Salo T, Tammi R, Hakkinen L, Jalkanen M, Inki P, et al. Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J Histochem Cytochem* 1995;43(2):125-35.

Perussolo B. Estudo histopatológico da polpa de dentes decíduos, no início da rizólise, com cárie de dentina [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1984.

Pimenta FJ, Sa AR, Gomez RS. Lymphangiogenesis in human dental pulp. *Int Endod J* 2003;36(12):853-6.

Purvis JA, Embery G, Oliver WM. Molecular size distribution of proteoglycans in human inflamed gingival tissue. *Arch Oral Biol* 1984;29(7):513-9.

Rahemtulla F. Proteoglycans of oral tissues. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992;3(1-2):135-62.

Rees SG, Hughes Wassell DT, Waddington RJ, Embery G. Interaction of bone proteoglycans and proteoglycan components with hydroxyapatite. *Biochim Biophys Acta* 2001;1568(2):118-28.

Ruoslahti E. Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 1988;4:229-55.

Santos EM. Ação da pasta Guedes-Pinto e do hidróxido de cálcio: avaliação histopatológica da reação do subcutâneo de ratos e da atividade quimiotática in vitro de macrófagos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2002.

Santos EM. Análise da citotoxicidade in vitro de fármacos utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos: estudo comparativo da ação da pasta Guedes-Pinto, formocresol, glutaraldeído e ácido fosfórico sobre cultura de fibroblastos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1998.

Sari S, Aras S, Gunhan O. The effect of physiological root resorption on repair potential of primary tooth pulp. *J Clin Pediatr Dent* 1999;23(3):227-33.

Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest* 2005;115(8):2223-33.

Schaefer L, Mihalik D, Babelova A, Krzyzankova M, Grone HJ, Iozzo RV, et al. Regulation of fibrillin-1 by biglycan and decorin is important for tissue preservation in the kidney during pressure-induced injury. *Am J Pathol* 2004;165(2):383-96.

Schönherr E, Sunderkotter C, Schaefer L, Thanos S, Grassel S, Oldberg A, et al. Decorin deficiency leads to impaired angiogenesis in injured mouse cornea. *J Vasc Res* 2004;41(6):499-508.

Scott JE. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J* 1988;252(2):313-23.

Septier D, Hall RC, Embery G, Goldberg M. Immunoelectron microscopic visualization of pro- and secreted forms of decorin and biglycan in the predentin and during dentin formation in the rat incisor. *Calcif Tissue Int* 2001;69(1):38-45.

Serra O, Ferreira F. Anatomia dental. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas; 1981.

Siquara-Da-Rocha MC, Nicolau J. Metabolic activity of deciduous porcine dental pulp in different phases of root development. *J Dent Res* 1980;59(5):762-5.

Strazynski M, Eble J, Kresse H, Schönherr E. Interleukin (IL)-6 and IL-10 induce decorin mRNA in endothelial cells, but interaction with fibrillar collagen is essential for its translation. *J Biol Chem* 2004;279(14):21266-70.

Svensson L, Närlid I, Oldberg A. Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils. *FEBS Lett* 2000;470(2):178-82.

Tenório D, Santos M, Zorn T. Distribution of biglycan and decorin in rat dental tissue *Braz J Med Biol Res* 2003;36(8):1061-5.

Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J* 1984;223(3):587-97.

Waddington RJ, Embery G. Structural characterization of human alveolar bone proteoglycans. *Arch Oral Biol* 1991;36(12):859-66.

Waddington RJ, Embery G, Smith AJ. Immunochemical detection of the proteoglycans decorin and biglycan in human gingival crevicular fluid from sites of advanced periodontitis. *Arch Oral Biol* 1998;43(4):287-95.

Waddington RJ, Roberts HC, Sugars RV, Schonherr E. Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *Eur Cell Mater* 2003;6:12-21; discussion

Waddington RJ, Moseley R, Smith AJ, Sloan AJ, Embery G. Fluoride-induced changes to proteoglycan structure synthesised within the dentine-pulp complex in vitro. *Biochim Biophys Acta* 2004;1689(2):142-51.

Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, et al. Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet* 1998;20(1):78-82.

Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 1990;346(6281):281-4.

Yamaguchi Y, Ruoslahti E. Expression of human proteoglycan in Chinese hamster ovary cells inhibits cell proliferation. *Nature* 1988;336(6196):244-6.

Yoshida N, Yoshida K, Iwaku M, Ozawa H. Immunolocalization of the small proteoglycan decorin in human teeth. *Arch Oral Biol* 1996;41(4):351-7.

Young MF, Bi Y, Ameye L, Chen X. Biglycan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases. *Glycoconjugate J* 2003;19:257-62.

Zanotti S, Negri T, Cappelletti C, Bernasconi P, Canioni E, Di Blasi C, et al. Decorin and biglycan expression is differentially altered in several muscular dystrophies. *Brain* 2005;128(Pt 11):2546-55.

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido para pesquisa clínica

Eu, _____ responsável pelo (a) menor _____ autorizo que a Cirurgiã Dentista **Monique S. De Benedetto** utilize o (os) dentes extraídos em decorrência do tratamento cirúrgico que meu (minha) filho(a) será submetido (a), e que eventualmente seriam descartados, permitindo o seu uso para a elaboração da pesquisa intitulada **“Estudo da Imunoexpressão de Proteoglicanos, Calreticulina e CD34 na Matriz Extracelular na Polpa de Dentes Decíduos Humanos durante o Processo de Rizólise.”**, que tem como objetivo análise exclusiva do tecido pulpar.

Declaro estar ciente que isto não apresentará quaisquer implicações ou riscos, e que todas as informações obtidas serão estritamente confidenciais, mantendo a identidade em sigilo.

Sendo assim, autorizo a participação voluntária de meu (minha) filho (a) no projeto, sabendo que posso desistir, mesmo depois de ter consentido a participação e que esta decisão não acarretará nenhum prejuízo no andamento do tratamento odontológico do (a) menor.

Nome _____

Assinatura _____ Data: _____

APÊNDICE B - Modelo de instrumento de doação de dentes

Identificação do Doador

Nome:.....

Data de Nascimento:.....

Local de Nascimento: UF:.....

RG nº:.....

CPF nº:.....

Endereço:.....

Cidade :..... UF:..... CEP:.....

Telefones para contato:.....

DECLARAÇÃO

Declaro ter sido esclarecido sobre quais os motivos que levaram a necessidade de remoção do(s) dente(s) – por razões

- e concordo que os mesmos sejam utilizados na pesquisa de título “Estudo da Imunoexpressão de Proteoglicanos, Calreticulina e CD34 na Matriz Extracelular na Polpa de Dentes Decíduos Humanos durante o Processo de Rizólise.”-que objetiva estudar a distribuição de proteínas na matriz extracelular de tecido conjuntivo normal de dentes decíduos em três fases distintas de reabsorção radicular: início, meio e final, associando os resultados obtidos com as diferenças estruturais da polpa. Fui ainda esclarecido pelo pesquisador que minha identidade não será divulgada por qualquer meio e que o material recolhido será utilizado unicamente para a presente pesquisa.

São Paulo,.....de.....de 200...

Assinatura

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 177/04

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa *"Estudo da imunoexpressão de Proteoglicanos, Calreticulina e CD-34 na matriz extracelular na polpa de dentes decíduos humanos durante o processo de Rizólise"*, de responsabilidade da Pesquisadora **Monique S. de Benedetto Mascaro**, sob orientação do Prof. Dr. **Marcelo Bönecker**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 20 de outubro de 2004

Profª Drª **ROSA HELENA MIRANDA GRANDE**
Coordenadora do CEP-FOUSP