ESTUDO SOBRE O POTENCIAL IMUNOGÊNICO DA DENTINA

Contribuição para a etiopatogenia da reabsorção dentária

MIRIAN MARUBAYASHI HIDALGO

**Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Odontologia de Bauru,
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para a obtenção do título
de Doutor em Odontologia, área de
Patologia Bucal.**

(Edição Revisada)

BAURU

2001

ESTUDO SOBRE O POTENCIAL IMUNOGÊNICO DA DENTINA

Contribuição para a etiopatogenia da reabsorção dentária

MIRIAN MARUBAYASHI HIDALGO

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Consolaro

(Edição Revisada)

BAURU

2001

Ficha Técnica

Mirian Marubayashi Hidalgo: concepção, experimentos, redação, digitação e formatação

Alberto Consolaro: concepção original, orientação geral e revisão final

Eiko Nakagawa Itano: orientação na metodologia e revisão

Frank Toshio Hoshi: colaboração nos experimentos

Marcia Maria Magro: colaboração nos experimentos

Mári Sumigawa Kaminame: colaboração nos experimentos

Nilson de Jesus Carlos: colaboração nos experimentos

Suzana Emiko Hoshino: colaboração nos experimentos

Eliete Marubayashi: ilustrações

Marco Antonio Silvestre Maia: ilustrações

Davi Marubayashi Hidalgo: ilustrações e colaboração na digitação

Isolde Terezinha dos Santos Previdelli: estatística

André Marubayashi Hidalgo: tabulação dos dados

Any de Fátima Fachin Mendes Sloniak: fotografia

Carlos Alexandre Venancio: digitalização e tratamento de imagens

Maria Christina da Rocha Moliterno: revisão do inglês

Valdir João Afonso: revisão final e vernáculo

Cybelle de Assumpção Fontes: normalização

Marcus Thame e Gráfica da Universidade Estadual de Maringá: serviços gráficos

Hidalgo, Mirian Marubayashi

H53e   Estudo sobre o potencial imunogênico da dentina; contribuição para a etiopatogenia da reabsorção dentária / Mirian Marubayashi Hidalgo - - Bauru, 2001.
104p. : il. ; 28cm.

Tese. (Doutorado) - - Faculdade de Odontologia de Bauru. USP.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Consolaro

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmico e científico, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Bauru, 26 de novembro de 2001.

Projeto de Pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru na reunião do dia 25 de fevereiro de 1999.

Mirian Marubayashi Hidalgo

09 de maio de 1959 São Paulo – SP	Nascimento
Filiação	Mitsuo Marubayashi Ruth Kishimoto Marubayashi
1978-1981	Curso de Graduação em Odontologia, na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, SP
1982	Curso de Especialização em Endodontia, no Instituto de Endo-metaendodonzia Dr. Yury Kuttler, cidade do México, DF
1983-1988	Clínica Privada
1989-1992	Estágio na Unidade de Imunologia do Hospital Reina Sofia, Córdoba, Espanha
1993	Professora de Histologia e Embriologia do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá, PR
1994-1996	Curso de Mestrado em Microbiologia, no Departamento de Patologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, PR
1995	Professora de Imunologia do Departamento de Patologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, PR
1995-2001	Professora de Endodontia do Curso de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá, PR
1997-2001	Curso de Doutorado em Patologia Bucal, na Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, SP
Associações	Associação Brasileira de Odontologia Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas Grupo Brasileiro de Microbiologia Oral Sociedade Brasileira de Pesquisadores Nikkeys Associação de Pós-Graduandos FOB-USP Associação Maringaense de Odontologia

Dedico este trabalho,

A Eliete e Mitsuo,

Ao Osvaldo, André e Davi.

É necessário apenas saber, e haverá asas...

Leonardo da Vinci

Ao meu orientador

Prof. Dr. Alberto Consolaro,

agradeço pela participação decisiva para que eu me tornasse

um “ser” professor.

Sob seu estímulo constante, o senso crítico, a reflexão e a análise têm sido

cultivados, resultando no meu amadurecimento intelectual.

À

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano,

agradeço por sempre compartilhar dos meus

desafios e conquistas,

sendo exemplo de dinamismo e determinação.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Este título, passível de ser obtido, será fruto de nossa convivência e de sua participação.

Meu reconhecimento e gratidão!

Aos da FOB/USP:

Ademir Padilha
Alica Carolina Torres Rédon
Aline Carvalho Batista
Ana Paula Bertonha
André Luis da Silva
André Luis Nadeo
Aurélio Tsuguio Sakuma
Bernadete Aparecida Alves Camargo
Brás Campos Durso
Cássio Roberto Rocha dos Santos
Clóvis Monteiro Bramante
Colegas pós-graduandos dos demais departamentos
Cybelle de Assumpção Fontes
Denise Tostes Oliveira
Douglas de Oliveira Tavano
Eliane de Freitas Soares
Eloi Dezan Junior
Evelyn Almeida Lucas Gonçalves
Fátima Aparecida Silveira
Fernanda Costa Grizzo Sampaio Goes
Francisco Carlos Ribeiro
Funcionários da biblioteca
Funcionários da manutenção

Funcionários da portaria
Funcionários do restaurante
Giane Tenório Quintela
Ivaldo Gomes de Moraes
Jane Pimentel Nogueira
Jazzmina Lorreine Cadena Torres
José Marta
Josieli Travoli Farinha
Juracy do Nascimento
Jussara Peixoto Ennes
Laurindo Zanco Furquim
Lídia Maria Viana Possas
Lídia Izabel Thomé Sanchez
Lílian R. Neuvald
Liliana Pimenta de Barros
Luciana Azevedo
Luís Antônio de Assis Taveira
Marcelo Cardoso F. Gonçalves
Marcelo Momesso
Márcia Barbosa S. A. Spetic
Maria Cristina Carrara Felipe
Maria Renata S. Nogueira Costa
Mariane Spalding
Mariza Akemi Matsumoto
Mônica Leal Alcurri
Nádia La ges Lima
Nilce Santos Melo
Norberti Bernardineli
Odila Pereira da Silva Rosa
Osvaldo Pereira da Silva
Regina Garcia Dorta
Renata Calestini

Rita de Cássia Paglione
Rosa Maria Lourenço Carlos Maia
Rosário de Arruda Moura Zedébski
Salvador Cruz Felix
Sandra Alberti
Sérgio Aparecido Torres
Sérgio Fumio Yoneyama
Simone Cristina Martins Lorena
Simone Queiroz C. Lourenço
Tânia Regina Grão Velloso
Tarcília Aparecida da Silva
Telma Regina Gobbi Francischoni
Thereza João Werle
Valdir João Afonso
Valdomiro Rebellato Junior
Valeria Cristina Trindade Ferraz
Valéria Lopes de Godoy
Vanessa Soares Lara
Vera Regina Casari Boccato
Washington Rodrigues Camargo
Zelma Batista Borges Rodrigues

Aos da UEL:

Alunos do Curso de Especialização em Ortodontia
Ana Ida Gorki Cândido
Audrey de Souza Marques
Berenice Figueiredo
Berenice Tomoko Tatibana
Celso Magri
Cesar C. Andrei
Christine G. Faustino

Claudenir Rossato
Cristina Sayuri Nishimura Miura
Daliria do Prado
Donizete R. Belitardo
Ediel C. da Costa
Estagiários do Laboratório de Imunologia
Fernanda Akemi Nakanishi
Frank Toshio Hoshi
Funcionários do Departamento de Ciências Patológicas
Ingrith B. Kisses
Kerlei C. Medici
Márcia Maria Magro
Mári Sumigawa Kaminami
Maria Emilia Favero
Marilda Carlos Vidotto
Mario Augusto Ono
Nilson de Jesus Carlos
Osmar Ferreira
Paulo E. Baggio
Pós-graduandos do Departamento de Ciências Patológicas
Professores do Departamento de Ciências Patológicas
Ricardo A. da Silva
Rita de Cássia Simões
Roberto Issamu Nakagawa
Suzana Emiko Hoshino
Thaciana Gomes Cassasanta
Valéria Helena Guazeli-Amin
Vanderlisio Beraldo

Aos da UEM:

Alfredo Franco Queiroz

Alunos do Curso de Odontologia

Carlos Alberto Herrero de Moraes

Cláudio Scapinello

Ellen Cristiane da Silva

Fabiano Cavalcanti de Melo

Funcionários do Departamento de Odontologia

Isolde Terezinha dos Santos Previdelli

Liogi Iwaki Filho

Nair Narumi Orita Pavan

Professores do Departamento de Odontologia

E, ainda, à:

Adriana C. Magro

Aiko Marubayashi

Any de Fátima Fachin Mendes Sloniak

Carlos Alexandre Venancio

Conceição Rodrigues da Silva Almeida

Eduardo Yoshida Marubayashi

Funcionários dos setores de informação, finanças e importação da FAPESP

José Aparecido Soares

Marco Antonio Silvestre Maia

Marcos A. F. Cunha

Marcus Thame

Maria Christina da Rocha Moliterno

Maristela Tzung

Mary Yoshida Marubayashi

Roseli Suguino

Tutomu Marubayashi

Todos os doadores voluntários deste estudo

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À FAPESP, pelo apoio integral a esta pesquisa com seu auxílio financeiro e logístico (processo no. 98/11690-6);

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa do Diretor, Professor Doutor Aymar Pavarini, e em especial à Disciplina de Patologia desta Faculdade;

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do Presidente, Professor Doutor Luiz Fernando Pegoraro;

Ao Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, na pessoa do Chefe, Professor Doutor Dirceu Estevão;

À Pró-reitoria de Pós-graduação da Universidade Estadual de Maringá, na pessoa do Pró-reitor Professor Doutor Gilberto Cezar Pavanelli;

Ao Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá, na pessoa do Chefe, Professor Doutor Carlos Alberto Conrado;

À CAPES, pelo auxílio pecuniário.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xix
RESUMO	xxiii
1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	2
1.1 Reabsorção dentária e a remodelação óssea	2
1.2 Reabsorção dentária, odontogênese e a manutenção da integridade dos tecidos dentários	4
1.3 A composição orgânica da dentina e a reabsorção dentária	7
1.3.1 Proteínas dentinárias em humanos	10
1.4 Reabsorção dentária e as respostas imunológica e imunopatológica	13
1.5 Auto-imunidade e a reabsorção dentária	14
2 PROPOSIÇÃO	20
3 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Obtenção do extrato dentinário humano	22
3.2 Eletroforese de gel de poliacrilamida em gradiente com SDS (SDS-PAGE)	23
3.3 Obtenção de soro imune ao extrato dentinário humano	24
3.4 <i>Dot blotting</i>	24
3.5 Imunodifusão radial dupla (IDRD – Ouchterlony)	25
3.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos	25
3.7 Seleção de pacientes e indivíduos saudáveis	26
3.8 Obtenção de amostras de soro e células mononucleares	29
3.9 <i>Western blotting</i>	29
3.10 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	30
3.11 Ensaio de proliferação linfoblástica	31

3.12 ELISA para detecção de citocinas	32
3.13 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	35
4.1 Obtenção do extrato dentinário humano e análise por eletroforese de gel de poliacrilamida	35
4.2 Verificação da produção de anticorpos pelos coelhos imunizados através de ensaio <i>Dot blotting</i>	37
4.3. Titulação de anticorpos em amostras de soros de coelhos imunizados e análise das linhas de precipitação através de IDRD – Ouchterlony	39
4.4 Titulação de anticorpos em amostras de soros de coelhos imunizados por meio de ELISA	41
4.5. Análise das frações do extrato dentinário humano reconhecidas pelos soros de coelhos imunizados em ensaios <i>Western blotting</i>	43
4.6 Análise das amostras de soros de pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa e de controles por meio de ensaios <i>Western blotting</i> utilizando extrato dentinário humano	46
4.7 Cromatograma representativo dos tempos de retenção da amostra de extrato dentinário humano	49
4.8 Análise de IgG e IgM antiextrato dentinário humano em amostras de soros de pacientes com reabsorção radicular e de controles por ELISA	51
4.9 Análise de IgG e IgM antifrações do extrato dentinário humano em amostras de soros de pacientes com reabsorção radicular e de controles por ELISA	53
4.10 Comparação entre os níveis séricos de IgG antiextrato dentinário humano e suas diferentes frações de pacientes apresentando reabsorção radicular e de controles em função do tempo	55
4.11 Resposta linfoproliferativa ao estímulo antigênico com extrato dentinário humano total ou suas diferentes frações em cultura de células oriundas de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles	57

4.12 Níveis séricos de IL-1 α e β , IL-6, TGF β e TNF α de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles	59
4.13 IL-1 (α e β) em sobrenadantes de cultura de células mononucleares provenientes de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles	61
4.14 IL-6 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares provenientes de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles	63
4.15 TGF β em sobrenadantes de cultura de células mononucleares provenientes de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles	65
4.16 TNF α em sobrenadantes de cultura de células mononucleares provenientes de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles	67
 5 DISCUSSÃO	 70
5.1 Da concepção do trabalho	70
5.2 Da metodologia	71
5.3 Dos resultados	74
5.4 Aplicações clínico-terapêuticas e perspectivas	85
 6 CONCLUSÕES	 87
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 91
ABSTRACT	103
GLOSSÁRIO	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Caracterização radiográfica da reabsorção radicular inflamatória apical ativa em um paciente apresentando arredondamento apical	27
FIGURA 2 - Caracterização radiográfica da reabsorção radicular por substituição em um paciente	28
FIGURA 3 – Perfil eletroforético do extrato dentinário humano	36
FIGURA 4 – Resultado de <i>Dot blotting</i> de amostras séricas de coelhos imunizados	38
FIGURA 5 – Titulação de anticorpos em amostras de soros de coelhos imunizados e análise das linhas de precipitação por meio de IDRD – Ouchterlony	40
FIGURA 6 – Titulação de anticorpos em amostras de soros de coelhos imunizados por meio de ELISA	42
FIGURA 7 - Frações do extrato dentinário humano reconhecidas pelos soros de coelhos imunizados em ensaios <i>Western blotting</i>	44
FIGURA 8 - Frações do extrato dentinário humano reconhecidas de forma estaticamente semelhante pelos soros de pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa e de controles em ensaios <i>Western blotting</i>	47
FIGURA 9 – Frações do extrato dentinário humano reconhecidas de forma estaticamente diferente pelos soros de pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa e de controles em ensaios <i>Western blotting</i>	48
FIGURA 10 – Cromatograma representativo dos tempos de retenção da amostra do extrato dentinário humano	50
FIGURA 11 – Anticorpos séricos antiextrato dentinário humano de pacientes com reabsorção radicular e de controles detectados por ELISA	52

FIGURA 12 – Anticorpos séricos antifrações do extrato dentinário humano de pacientes com reabsorção radicular e de controles detectados por ELISA	54
FIGURA 13 – Resposta linfoproliferativa ao estímulo antigênico com extrato dentinário humano ou suas diferentes frações em cultura de células oriundas de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles	58
FIGURA 14 - IL-1 em sobrenadantes de cultura celular de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles detectados por ELISA	62
FIGURA 15 - IL-6 em sobrenadantes de cultura celular de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles detectados por ELISA	64
FIGURA 16 - TGF β em sobrenadantes de cultura celular de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles detectados por ELISA	66
FIGURA 17 - TNF α em sobrenadantes de cultura celular de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles detectados por ELISA	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Proteínas não colagênicas da dentina e do osso	08
TABELA 2 - Frações do extrato dentinário humano reconhecidas pelos soros de coelhos imunizados em ensaios <i>Western blotting</i>	45
TABELA 3 - Comparação entre os níveis séricos de IgG antiextrato dentinário humano e suas diferentes frações de pacientes apresentando reabsorção radicular e de controles em função do tempo, detectados por ELISA	56
TABELA 4 – Níveis séricos de IL-1 α e β , IL-6, TGF β e TNF α de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles detectados por ELISA	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

@ aproximadamente
% por cento
°C graus Celsius
a alfa
a₂HS-GP glicoproteína sulfidrato α_2
b beta
mCi microcuries
mg microgramas
mL microlitros
mm micrometros
Ac anticorpo
Ag antígeno
B (linfócito) bursa dependente
BAG-75 glicoproteína ácida óssea-75
BGP proteína GLA óssea
BMP proteína osteomorfogenética
BMU unidade osteorremodeladora
BSP sialoproteína óssea
cdNA ácido desoxiribonucléico complementar
CIA atividade condrogênica-indutora
Co *company* ou *corporation*
CO₂ dióxido de carbono ou gás carbônico
Com comércio
ConA concanavalina A
cpm contagem por minuto
CSF fator estimulador de colônia
DAB diaminobenzidina

DEAE dietilaminoetil
Dmp-1 proteína da matriz dentinária-1
DNA ácido desoxiribonucléico
DO densidade óptica
DP, DQ, DR moléculas MHC classe II
DPP fosfoproteína dentinária ou fosfoforina
DSP sialoproteína dentinária
DSPP sialofosfoproteína dentinária
ECM matriz extracelular
EDTA etileno diamino tetra-acetato
ELISA ensaio imunossorvente ligado a enzima (ensaio imunoenzimático)
FAPESP Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FGF fator de crescimento para fibroblasto
FOB Faculdade de Odontologia de Bauru
g força centrífuga
g gramas
GLA ácido γ -carboxiglutâmico
h horas
HCl ácido clorídrico
H₂O₂ peróxido de hidrogênio ou água oxigenada
HP altamente fosforilada
HPLC cromatografia líquida de alta eficiência
H₂SO₄ ácido sulfúrico
IADR associação internacional de pesquisa odontológica
IDRD imunodifusão radial dupla
Ig imunoglobulina
IGF fator de crescimento semelhante à insulina
Inc *incorporated*
Ind indústria
IL interleucina

kDa quilodalton
kg quilogramas
Lab *laboratories*
LP levemente fosforilada
Ltda limitada
M molar
mg miligramas
MGP proteínas da matriz GLA
MHC complexo de histocompatibilidade principal
min minutos
mL mililitros
MM massa molecular
mm milímetros
MP medianamente fosforilada
mRNA ácido ribonucleico mensageiro
N normal
NaCl cloreto de sódio
NCP proteína não colagênica
ng nanogramas
NK *natural killer*
nm nanômetros
OC osteocalcina
OPD *o*-fenilediamino dihidroclorato
OPN osteopontina
OS osteonectina
PBS tampão salina-fosfato
PBST tampão salina-fosfato com *Tween* 20
PDGF fator de crescimento derivado de plaquetas
pg picogramas
pH pressão hidrogeniônica
PHA fitohemaglutinina

PTH paratormônio

PVDF difluoreto de polivinilideno

RGD seqüência de tripeptídeos: arginina; glicina e ácido aspártico

RPMI *Roswell Park Memorial Institute*

s segundos

SA Sociedade Anônima

SDS duodecil sulfato de sódio

SPARC proteína ácida e rica em cisteína secretada

T (linfócitos) timo dependente

TEMED tetrametila tilendiamina

TGF fator de crescimento transformador

Th2 subpopulação de linfócitos auxiliares ou *helper*

Thy-1 primeiro marcador de superfície glicoprotéico da linhagem de linfócitos T

TNF fator de necrose tumoral

UEL Universidade Estadual de Londrina

UEM Universidade Estadual de Maringá

USA Estados Unidos da América

USP Universidade de São Paulo

v volts

X vezes

x por

RESUMO

As reabsorções dentárias são inflamatórias e/ou substitutivas e representam o fenômeno principal que impede o sucesso dos transplantes e reimplantes dentários. Sua ocorrência pode ser consequência de traumatismos, periapicopatias e movimentação dentária induzida. Na odontogênese, a dentina fica sempre “escondida” do sistema imunológico e posteriormente protegida pelo esmalte, cemento e cementoblastos no lado externo e pela camada de odontoblastos internamente. Duas proteínas não colagênicas são específicas da dentina: a fosfoforina e a sialoproteína dentinária. Construiu-se a seguinte hipótese: a dentina, como antígeno seqüestrado, pode induzir fenômenos auto-ímmunes e participar da etiopatogenia das reabsorções dentárias. A partir de dentes humanos, obteve-se um extrato dentinário inoculado em coelhos para análise dos soros ímmunes. O extrato dentinário humano apresentou capacidade de indução à resposta imunológica e reagiu com anticorpos de coelho. Foram selecionados 12 pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa, 12 indivíduos saudáveis sem quaisquer evidências de reabsorção radicular e quatro pacientes com reabsorção radicular por substituição. Através da metodologia *Western blotting*, verificou-se que a maioria das frações do extrato dentinário humano foi reconhecida de forma semelhante por pacientes com reabsorção dentária e controles, mas seis delas foram reconhecidas de forma estatisticamente diferente, não sendo reconhecidas como próprias pelo sistema imunológico. O extrato dentinário humano foi fracionado e os subprodutos coletados por intervalo de tempo com a utilização de HPLC. Resultados de ELISA demonstraram que os soros de pacientes com reabsorção dentária apresentaram quantidades maiores de IgG antiextrato dentinário humano e antifrações que indivíduos controles, sendo possível traçar um perfil sorológico próprio e possivelmente identificador do processo. IgM sérica antiextrato dentinário humano e antifrações dos pacientes com reabsorção inflamatória estavam em quantidades maiores ou iguais aos demais grupos estudados. Os perfis séricos de IgG e IgM permitem identificar especificidades dentro do próprio grupo de reabsorções dentárias, dividindo-as em inflamatória e por substituição. Há heterogeneidade na imunogenicidade das frações do extrato dentinário. As culturas de células provenientes de pacientes com reabsorção dentária mostraram índices de proliferação menores que os controles quando estimulados com o extrato dentinário ou suas frações, mas normais

quando estimulados com mitógenos. O extrato dentinário humano e suas frações apresentaram capacidade de induzir à liberação de todas as citocinas relacionadas com a reabsorção dentária em maior ou igual concentração nas células de pacientes com reabsorção inflamatória se comparados com os controles sem reabsorção. Isto não foi observado nas células de pacientes com reabsorção por substituição, permitindo identificar os grupos com reabsorção dentária. Os resultados obtidos confirmam a hipótese que a dentina apresenta imunogenicidade e que o perfil sorológico dos pacientes com reabsorção dentária pode ser identificado por análise bioquímica sanguínea. O seu delineamento preciso pode levar ao diagnóstico precoce da reabsorção dentária antes que se manifeste radiograficamente.

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

A reabsorção das estruturas dentárias foi descrita inicialmente por Michael Blum em um pequeno volume ilustrado publicado em Leipzig, no ano de 1530, provavelmente o primeiro livro escrito sobre a “ciência e arte da cirurgia dentária”⁴¹. Por séculos, os trabalhos confundiram cárie radicular, reabsorção externa e reabsorção interna associada às alterações pulpares. Ao se fazer descrições clínicas dos processos reabsortivos tratavam também de transplantes e reimplantes dentários.

As reabsorções dentárias apresentam-se como um problema clínico freqüente em consequência de processos inflamatórios e lesões traumáticas promotoras da anquilose alveolodentária. As reabsorções representam sempre processos patológicos. Somente a rizólise dos dentes decíduos, anterior à esfoliação, pode ser considerada fisiológica.

O controle absoluto do processo de reabsorção não é possível, pois não são conhecidos, plena e detalhadamente, os mecanismos reguladores e seu modo de indução. Avanços neste sentido trariam uma contribuição com repercussão clínica imediata, em todos os campos da Odontologia, ao estabelecer protocolos para sua detecção precoce e tratamento.

1.1 Reabsorção dentária e a remodelação óssea

O osso é uma fonte de reserva de cálcio, fósforo e outros íons que participam dos mecanismos biológicos do corpo humano. Para a mobilização desses componentes, continuamente e em vários pontos do esqueleto, se observam repetidos ciclos de destruição e reconstrução, a remodelação óssea. Em adultos saudáveis, a quantidade de osso formado corresponde à reabsorvida, mantendo constante a massa óssea. A remodelação ocorre de forma ampla e algumas estimativas ditaram que o esqueleto humano se remodela completamente a cada dez anos⁶¹, o que deve variar conforme a idade.

A remodelação óssea se faz à custa da atividade integrada dos osteoblastos, responsáveis pela produção do osso; clastos, que o destroem; e macrófagos. Este conjunto de células denomina-se unidade osteorremodeladora, sendo conhecido como BMU⁷⁸. Apesar do aparente controle cruzado entre as funções de destruição e produção, em casos experimentais de bloqueio da neoformação óssea, a reabsorção continuou inabalada^{20, 22}. A remodelação óssea pode ter ocorrência simultânea em vários pontos do esqueleto, demonstrando a regulação por fatores locais, através de mecanismos autócrinos e parácrinos e hormonais.

Os fatores locais sintetizados pelas células incluem os fatores de crescimento (semelhante à insulina, IGF I e II; transformador, TGF β ; para fibroblasto, FGF; derivados de plaquetas, PDGF; e proteínas osteomorfogenéticas, BMPs), citocinas (interleucinas, IL-1, IL-6; fator de necrose tumoral, TNF; e fatores estimuladores de colônia, CSF) e produtos do ácido araquidônico como as prostaglandinas.

O controle hormonal da remodelação óssea ocorre através do paratormônio (PTH), da calcitonina, da forma biologicamente ativa da vitamina D₃ e dos esteróides sexuais. DUCY et al.²³, apresentaram a leptina sintetizada pelos adipócitos, como um hormônio que pode regular a formação óssea via hipotálamo e assim, a massa óssea, o peso corporal e a reprodução humana.

Em revisão incluída em seu livro texto editado em 1955, KRONFELD; BOYLE⁴⁸ afirmaram não se justificar a suposição dos dentes como uma fonte de reserva de cálcio, dos quais pudesse ser retirado, demonstrando o não envolvimento dos dentes no turnover ósseo. O cálcio, uma vez depositado em suas matrizes, não mais será retirado mesmo em condições de extrema necessidade como na desnutrição, gravidez ou nos casos de hiperparatireoidismo. Nesta breve revisão descrevem que: a) GIES³⁰ injetou azul de Tripán intraperitonealmente em diferentes estádios de desenvolvimento dentário que incorporaram o corante ao esmalte mantendo-o retido indefinidamente, embora este tenha sido gradativamente eliminado de todos os outros tecidos; b) FISH²⁴ manteve uma cadela grávida com uma dieta muito pobre em cálcio e no final da investigação, os ossos não eram facilmente visíveis ao exame radiográfico e podiam ser cortados com uma faca enquanto os dentes mantinham a mesma densidade radiográfica e teor de cálcio; c) ALBRIGHT; ASH; BAUER¹ evidenciaram em radiografias de 17 pacientes com hiperparatireoidismo que os dentes estavam bem calcificados em contraste com os maxilares

muito pobres em cálcio; d) HATTON³⁵ verificou que os dentes de cães gastrectomizados permaneciam tão bem calcificados quanto antes da operação que produziu porosidade óssea e diminuição do peso do esqueleto.

Em trabalhos utilizando comparativamente cementoblastos e osteoblastos, LINDSKOG; BLOMLÖF; HAMMARSTRÖM⁵⁷ demonstraram que os primeiros não apresentam receptores para o PTH, justificando bioquimicamente porque não participam da remodelação óssea. A barreira celular interposta entre a dentina e os clastos pode ser considerada como um fator de resistência à reabsorção: a camada de cementoblastos protege pelo lado externo enquanto os odontoblastos evitam a reabsorção internamente^{2,43}.

1.2 Reabsorção dentária, odontogênese e a manutenção da integridade dos tecidos dentários

A dentição decídua inicia sua formação entre a sexta e oitava semana de desenvolvimento embrionário e os sucessores e molares permanentes entre a 20^a. semana *in utero* e décima semana pós-natal, exceto os terceiros molares que se formam aproximadamente a partir do 15^o. ano de vida⁹².

Especificamente, a amelogênese e a dentinogênese têm início na fase de campânula da odontogênese. Segundo TEN CATE⁹² e ARANA-CHAVEZ³, estabelecida a forma da coroa, as células do epitélio interno do órgão do esmalte alongam-se, tornando-se cilíndricas altas e invertendo sua polaridade, denominando-se pré-ameloblastos. Estes estimulam as células ectomesenquimais presentes na periferia da papila dentária, que param de se dividir e diferenciam-se em odontoblastos. Apoiados na camada de fibronectina que se concentra na margem próxima ao epitélio interno, os odontoblastos se organizam, polarizam e passam a secretar a primeira camada de matriz orgânica da dentina⁹⁶. A presença da matriz dentinária e dos contatos entre odontoblastos e pré-ameloblastos desencadeiam a diferenciação final destes últimos em ameloblastos, os quais sintetizam e secretam a matriz orgânica do esmalte que começa a ser depositada sobre a camada de dentina previamente formada. Diversos produtos

como fatores de crescimento, moléculas de adesão, elementos da matriz extracelular (ECM), entre outros, participam das várias interações epitélio-ectomesênquima, que juntas, constituem o fenômeno conhecido como indução recíproca, que caracteriza a fase de campânula.

Durante a odontogênese a dentina coronária fica protegida pelo esmalte recém-formado na sua superfície externa, além da presença do epitélio externo, retículo estrelado, estrato intermediário e ameloblastos. O esmalte permanece coberto por uma camada de epitélio reduzido até que este seja incorporado por fusão ao epitélio bucal e os ameloblastos perdidos por apoptose⁵⁸ durante a emergência da coroa. Pela superfície interna, a dentina fica protegida pela camada de odontoblastos dispostos como células justapostas.

Os odontoblastos formam uma única camada contínua, mas parecem dispostos em um arranjo estratificado de três a cinco células na porção coronária, aspecto apenas visual pelo grande número de células por área correspondentes aos túbulos dentinários presentes. Na porção cervical assumem um aspecto cubóide e na radicular, escamoso. Estão unidos por complexos juncionais e junções tipo *gap* ou *nexo*. O complexo juncional consiste de desmossoma, *zonula adherens* e *zonula occludens* e associado a ele, uma rede terminal de elementos do citoesqueleto irradiam ao redor da porção periférica da célula. Inúmeras junções tipo *gap* estão presentes entre os odontoblastos adjacentes e as células da camada subodontoblástica^{19,92}.

A camada odontoblástica firmemente aderida entre si confere um papel isolado para a dentina. As *zonulas occludens* impedem que macromoléculas ganhem acesso direto aos espaços intercelulares, sejam incorporadas pela dentina, ou sejam perdidas como resultado da passagem inversa. As junções tipo *gap*, por sua vez, permitem que íons e pequenas moléculas, inclusive aminoácidos, açúcares, nucleotídeos e esteróides, passem diretamente de uma célula para outra. Moléculas hidrossolúveis com massas moleculares (MM) de até 1kDa podem passar livremente ao passo que ácidos nucléicos, proteínas e outras macromoléculas não podem fazê-lo¹⁹. Durante a intensa síntese dentinária pelos odontoblastos, algumas citocinas, fatores de crescimento, produtos do ácido araquidônico e proteínas plasmáticas podem ser incorporadas. As proteínas presentes na dentina são produtos da síntese dos odontoblastos.

Os epitélios interno e externo do órgão do esmalte continuam proliferando e na altura da alça cervical dá origem à bainha epitelial de Hertwig, coincidindo com o início da erupção dentária. Suas células estão envolvidas na formação de uma camada de matriz a ser posteriormente mineralizada com aproximadamente 10µm de espessura, semelhante ao esmalte, e descrita como “camada hialina de Hopewell-Smith”, cemento afibrilar ou cemento intermediário. Como o colágeno do manto dentinário, esta camada é depositada ao longo da membrana basal suportada pela bainha epitelial, deixando lacunas preenchidas com ECM e um delgado material fibrilar. A membrana basal se fragmenta e as células da bainha epitelial ativamente secretam proteínas relacionadas com a família das amelogeninas nas lacunas. A mineralização do manto dentinário não envolve esta camada que se mineraliza posterior e separadamente devido à natureza distinta da matriz. Assim, a dentina da superfície radicular está coberta por um produto epitelial das células da bainha de Hertwig^{56, 86, 92, 94}.

Com a formação da dentina radicular e da camada hialina, a bainha epitelial vai se desintegrando, tendo sido evidenciado a apoptose como um dos mecanismos desencadeadores deste evento⁵⁸. Os fragmentos da bainha epitelial formam uma rede que permite que as células foliculares passem através dela e sofram aposição na superfície radicular neoformada. Uma vez posicionadas, as células se diferenciam em cementoblastos e sintetizam a matriz orgânica. A mineralização dessa matriz ocorre de forma similar que na dentina^{92, 94}.

Se a camada odontoblástica atua como um isolante entre a dentina e a polpa pelo lado interno, o cemento e cementoblastos exercem a mesma função pelo lado externo. Durante a odontogênese, a dentina radicular está sempre protegida pela bainha epitelial de Hertwig, pelo cemento intermediário e após a fragmentação da bainha, pelos cementoblastos e cemento.

Além das camadas celulares, a presença da pré-dentina e do pré-cemento são elementos importantes no mecanismo de resistência às reabsorções. As células clásticas não são capazes de aderir a suas superfícies¹⁰¹ e são atraídas quimiotaticamente apenas pelos tecidos mineralizados⁷⁸.

1.3 A composição orgânica da dentina e a reabsorção dentária

A dentina é composta por 65% de material inorgânico por peso, sendo a maioria na forma de hidroxiapatita. O colágeno, principalmente do tipo I e menor quantidade dos demais, participa em aproximadamente 20%, a água em 13% e o restante 2% é formado por citrato, lactato, lipídios e proteínas não colagênicas (NCPs). Estas incluem proteínas, proteoglicanas, fatores de crescimento e proteínas derivadas do soro, muitas delas de natureza semelhante àquelas do osso e que compreendem aproximadamente 9,5% da ECM da dentina.

As proteínas dentinárias não colagênicas estão apresentadas na TABELA 1. A proteína osteomorfogenética (BMP) foi descrita por URIST⁹⁸, em 1965, e detalhada por URIST; STRATES⁹⁹. Ela apresenta variações de MM segundo o espécime animal (entre 17-22kDa no boi, 18,5 no homem e 21,5 no coelho) ou tecido utilizado (25 na dentina e 17-22kDa em osso de boi, 20 em dentina e 18,5kDa em osso humano e 23-25 em dentina e 21,5kDa em osso de coelho) em relato de MIZUTANI et al.⁶⁹.

A sialoproteína óssea (BSP) foi uma das primeiras proteínas ósseas a ser identificada como glicoproteína rica em ácido siálico, com MM de 23kDa em ratos³⁷ que posteriormente mostrou ser apenas um fragmento da molécula de 70-80kDa²⁵.

A osteopontina (OPN), que possui 44kDa em ratos, foi inicialmente descoberta como uma fosfoproteína secretada por células transformadas⁸⁵ podendo ser encontrada na matriz óssea mineralizada ou no tecido osteóide⁶².

A osteonectina (OS) apresenta aproximadamente 43kDa em camundongos sendo sintetizada por osteoblastos e odontoblastos. Seu mRNA foi detectado em diversos tecidos não mineralizados como a membrana basal e as glândulas produtoras de esteróides. Com a maturação dentária, há uma diminuição de sua quantidade total²⁷. HOLLAND et al.⁴⁰ demonstraram altos níveis da proteína SPARC (proteína ácida e rica em ácido siálico secretada), primeiro identificada em células parietais do endoderma, nos osteoblastos, odontoblastos e outros tipos celulares e que

TABELA 1. Proteínas não colagênicas da dentina e do osso*

	MM (kDa)	Descrição	Observações
Glicoproteínas/Sialoproteínas			
Proteína osteomorfogenética (BMP)	21,5 coelho / 17-22 boi / 18,5 homem	URIST (1965) ⁹⁸	Apresenta capacidade de osteoindução sendo considerada fator de crescimento
Sialoproteína óssea (BSP)	23 rato	HERRING (1972) ³⁷	Anteriormente denominada sialoproteína óssea II
Osteopontina (OPN)	44 rato	SENGER; WIRT; HYNES (1979) ⁸⁵	Anteriormente denominada sialoproteína óssea I
Sialoproteína dentinária (DSP)	53 rato	BUTLER et al. (1981) ¹²	Específica da dentina, só caracterizada em 1992
Osteonectina/SPARC	43 camundongo	HOLLAND et al. (1987) ⁴⁰	Glicoproteína óssea que se liga ao cálcio
Glicoproteína ácida óssea-75 (BAG-75)	75 rato	GORSKI; SHIMIZU (1988) ³²	Faz parte da família das sialoproteínas ósseas
Fosfoproteínas			
Fosfoforinas	155 boi /140homem/ 90-95 rato 72 camundongo	VEIS; SCHLUETER (1964) ¹⁰⁰	NCP específica e mais abundante da dentina
Proteína da matriz dentinária-1 (Dmp-1)	60 rato	GEORGE et al. (1993) ²⁹	Inicialmente considerada específica da dentina, foi encontrada em outros tecidos
Proteínas GLA			
Osteocalcina (OC – anteriormente BGP)	5 rato	HAUSCHKA; LIAN; GALLOP (1975) ³⁶	Específica de osso e dentina, mais abundante NCP óssea
Proteína da matriz GLA (MGP)	15 rato	PRICE; WILLIAMSON (1985) ⁷⁴	Insolúvel na matriz óssea

*Também são encontradas proteoglicanas como a decorina e biglicana; fatores de crescimento como o TGF β , atividade condrogênica-indutora (CIA), FGF, IGF; e proteínas derivadas do soro como a glicoproteína α_2 HS (α_2 HS-GP), albumina e imunoglobulina G (IgG)

mostrou cDNA e mRNA idêntico a OS, sendo consideradas desde então como entidade única.

A glicoproteína ácida óssea 75 (BAG-75) recebe este nome por possuir MM de 75kDa em ratos, tendo sido descrita em 1988 por GORSKI; SHIMIZU³². Juntamente com a OPN, BSP e sialoproteína dentinária, faz parte da família das sialoproteínas ósseas por compartilharem uma composição semelhante⁸.

A proteína da matriz dentinária-1 (Dmp-1), originalmente, pensou-se ser encontrada apenas na dentina²⁹, mas já foi identificada também no osso²¹ e em outros tecidos como esmalte e cimento⁶⁰. Apresenta 60 kDa em ratos.

A osteocalcina (OC) era anteriormente conhecida como BGP, proteína óssea que contém ácido γ -carboxiglutâmico (GLA) o que lhe confere alta afinidade com minerais. Foi descrita primeiramente em ossos de galinha por HAUSCHKA; LIAN; GALLOP³⁶, possui aproximadamente 5kDa em ratos, sendo facilmente extraída dos tecidos após desmineralização⁵⁵. Pode atuar como agente quimiotático para precursores de osteoclastos¹¹.

Proteína da matriz GLA (MGP) é uma proteína insolúvel da matriz óssea com aproximadamente 15kDa em ratos. Além da dentina e osso, foi também detectada em cartilagem, pulmão, coração⁹ e descrita inicialmente por PRICE; WILLIAMSON⁷⁴ em 1985.

Há apenas duas proteínas (ou famílias protéicas) isoladas unicamente da ECM dentinária e consideradas específicas da dentina: a fosfoproteína dentinária (DPP, também chamada fosfoforina) e a sialoproteína dentinária (DSP). Ambas são sintetizadas e secretadas tanto pelos odontoblastos jovens polarizados como pelos maduros e, transitoriamente, por pré-ameloblastos^{5, 76}. A DSP e DPP representam produtos de clivagem da sialofosfoproteína dentinária (DSPP) nascente³³.

A DPP é a NCP mais abundante, ao redor de 50%, e foi descoberta por VEIS; SCHLUETER¹⁰⁰ ao estudar o colágeno na dentina de boi. Seu tamanho varia de acordo com as espécies, sendo relatadas MM de 155kDa para boi⁸⁷; 90-95kDa para ratos¹³; 72kDa para camundongos⁵⁹; e 140kDa para humanos¹⁵, mas todas se compõem de grande quantidade de ácido aspártico (cerca de 35%) e de fosfoserina (45-50%). Esta marcante conservação de sua

composição sugere realmente ser a mesma entidade molecular e possuir a mesma função nestas espécies¹¹.

A DSP, uma glicoproteína rica em ácido siálico, foi isolada por BUTLER et al.¹² em 1981 e caracterizada pelo mesmo grupo¹⁴ em 1992. Corresponde a 5-8% do peso das NCPs de rato e possui MM de 53kDa, sendo rica em serina, glicina e ácidos siálico (10%), aspártico e glutâmico, contendo, de forma semelhante às BSPs, cerca de 30% de carboidrato¹⁰. Pode ser utilizada como marcador para linhagens de células odontoblásticas⁸⁸.

Vale ressaltar que até o presente, a grande maioria dos trabalhos com proteínas dentinárias é desenvolvida com exemplares animais, em especial, bovinos ou ratos, sendo escassos aqueles utilizando humanos.

1.3.1 Proteínas dentinárias em humanos

Sobre as proteínas dentinárias humanas, JONES; LEAVER⁴², em 1974, relataram que o único componente entre as NCPs positivamente identificado até aquele momento era o sulfato de condroitina. Em seu estudo utilizando desmineralização com EDTA e digestão com collagenase, a eletroforese de gel e foco iso-elétrico, distinguiu 20 componentes das NCPs dentinária e óssea que se diferenciavam apenas pela distribuição de suas bandas.

Em 1983, MASTERS⁶⁴ discutia a dificuldade de se isolar as DPPs em humanos apesar de já purificadas em ratos e bovinos, devido à degradação observada durante a técnica preparatória e alertava que, frente aos seus resultados, não se deveria descartar a possibilidade da ocorrência de reações diagenéticas. Estas reações, que afetam metabolicamente proteínas estáveis *in vivo*, poderiam interferir no processo de purificação. Enquanto a racemização do ácido aspártico, por exemplo, não traria problemas para um mamífero de vida curta como o rato, poderia ser parcialmente responsável pelas dificuldades de purificação da dentina humana.

Em 1984, TAKAGI; VEIS⁸⁹ 20 anos após isolarem a DPP bovina, conseguiram provar que a dentina humana contém a fosfoforina como componente mais abundante entre as NCPs, de forma similar que o rato, hamster, coelho, porco e boi. Esta se apresentou como uma banda difusa de aproximadamente 70kDa em eletroforese de gel de poliacrilamida em gradiente 5-15% e em separação por coluna DEAE-celulose mostrou outra fração que tanto poderia ser produto de degradação ou entidade independente. Ainda no mesmo ano, LINDE⁵⁴ em seu livro sobre dentina e dentinogênese, ressaltava que não se deveria pressupor que a dentina fosse quimicamente idêntica nas diferentes espécies, apesar de considerar que a diferença maior seria encontrada entre os tipos de dentes: um incisivo de roedor com crescimento contínuo comparado a um dente definitivamente formado como o bovino ou humano. Apontava a existência da fosfoproteína altamente fosforilada (HP) ainda sem qualquer estudo sistemático; das proteoglicanas, especificamente do sulfato de condroitina; e de proteínas plasmáticas como albumina, transferrina, IgG, IgM e IgA que poderiam estar presentes por contaminação durante o processo de preparo tissular.

LINDE⁵⁵, em 1989, reportava a evidência imunocitoquímica da presença da glicoproteína sulfidrato α_2 (α_2 HS-GP), ainda que a importância do achado desta proteína sérica não estivesse clara.

Em 1990, FISHER et al.²⁶ sequenciaram a BSP humana que apresentou mais de 70% de identidade entre os aminoácidos, incluindo a região RGD, com a BSP de ratos. Indicaram também que seu gene está localizado no cromossomo 4. No mesmo ano, RABINOWITZ; SYFTESTAD; CAPLAN⁷⁵ demonstraram que o extrato dentinário humano continha atividade condrogênica, mas que provavelmente não se relacionava com TGF β .

BESSHO et al.⁶, em 1991, extraíram e purificaram BMP da dentina. Esta apresentava 20kDa em gel de poliacrilamida 10-20% com SDS, induzia neoformação óssea após três semanas implantadas no músculo de ratos e se não era idêntica, poderia ser considerada similar à BMP obtida a partir do osso.

Em 1992, BUTLER⁹ fez uma revisão da ECM dentinária e dentinogênese descrevendo a MM da DPP humana como sendo de 90kDa e que só a HP DPP havia sido detectada,

diferentemente de ratos nos quais eram encontradas as DPPs medianamente e levemente fosforiladas (MP e LP). Revelou que a DPP estava ausente ou em quantidades muito pequenas no manto dentinário, dentina secundária ou terciária. No mesmo artigo, relatou que a sequência do cDNA para BSP contém 301 resíduos de aminoácidos. MC CURDY; CLARKSON; FEAGIN⁶⁶, no mesmo ano, não encontraram diferenças qualitativas e quantitativas nos cromatogramas obtidos quando do uso de EDTA 10% + inibidores de proteases ou 0,05M tris-HCl, 1M NaCl e collagenases mas sim entre raízes maduras e imaturas para obtenção do extrato dentinário. Os cromatogramas utilizando as raízes maduras apresentavam picos protéicos mais largos e menos fósforo orgânico que as imaturas e estas resultavam em menos fosfoproteínas, serina e ácido aspártico. As fosfoproteínas isoladas apresentavam 150 ou 96kDa segundo a corrida de eletroforese fosse em gel com 7,5 ou 12% de poliacrilamida com SDS, respectivamente.

Em 1996, CHANG; CHIEGO JUNIOR; CLARKSON¹⁵ identificaram e caracterizaram a DPP humana. Relataram que em eletroforese de gel de poliacrilamida 7,5% com SDS, encontraram bandas de 140, 60, 50 e 34kDa e não utilizando agente redutor, as bandas de 60, 50 e 34kDa estavam ausentes, sugerindo que poderiam ser subunidades de uma proteína maior, a de 140kDa. Comentaram ser o primeiro relato de isolamento, identificação e caracterização parcial de DPP humana e discutiram a escassez e o baixo rendimento do material obtido a partir de dentes humanos como fatores que dificultam o desenvolvimento do trabalho.

LEAVER; THOMAS; HOLBROOK⁵³, em 1997, ao descrever as glicoproteínas dentinárias humanas, se referiam ainda como frações, tendo em vista que não estavam isoladas nem caracterizadas.

Em 1998, CLARKSON; CHANG; HOLLAND¹⁶ extraíram a DPP humana que apresentou 140kDa em SDS-PAGE 7,5%. Em extrações sequenciais observaram que a MM variava em decorrência, provavelmente, de degradação.

No ano 2000, THOTAKURA et al.⁹³ apontaram que a mesma região 4q21-23 do cromossomo 4 que codifica a DPP era a responsável pela dentinogênese imperfeita tipo II, uma forma localizada de displasia do mesoderma que afeta tanto a dentição decídua como permanente. Também GU et al.³³ demonstraram que as duas NCPs específicas da dentina, DPP e

DSP, são codificadas por um mesmo gene, DSPP, de forma similar que em camundongos e ratos indicando sua conservação durante a evolução.

1.4 Reabsorção dentária e as respostas imunológica e imunopatológica

O sistema imunológico de um vertebrado é capaz de construir memória e reconhecer as substâncias químicas próprias do organismo, aquelas que estiveram em contato com o mesmo durante a vida intra-uterina, sendo tolerante para com elas sem desenvolver resposta imunológica. Uma molécula estranha, um microrganismo ou uma célula mutante do próprio hospedeiro pode apresentar substâncias que o organismo reconhece como estranhas e que induzirão uma resposta imunológica humoral e/ou celular, com a conseqüente reação do anticorpo e/ou linfócito sensibilizado.

Imunógeno é toda substância (solúvel, celular ou particulada) que possui a capacidade de induzir resposta imunológica específica. Todo imunógeno é também antígeno, por possuir a capacidade de interagir com os anticorpos ou linfócitos T sensibilizados. O sistema imunológico não reconhece a estrutura global dos antígenos, geralmente proteínas ou polissacarídeos, mas sim sítios discretos, os determinantes antigênicos ou epítomos, observando que há de se ter contato.

Certas substâncias são capazes de induzir respostas imunológicas mais potentes que outras. Dada a necessidade da molécula ser reconhecida como não própria pelo organismo, quanto maior a distância filogenética entre o antígeno e o receptor, de modo geral, maior será a resposta. Uma molécula grande, com mais de 10kDa, apresenta maior número de epítomos, aumentando a probabilidade de existirem receptores para alguns desses determinantes nos linfócitos. Se compostos por três ou mais aminoácidos, melhor ainda se possuir anel aromático, esta complexidade molecular aumenta seu grau de antigenicidade. A natureza química da molécula também influencia: as substâncias inorgânicas nunca ativam linfócitos enquanto as orgânicas possuem grau variado de antigenicidade. Proteínas são consideradas bons antígenos; polissacarídeos raramente o são quando purificados, mas há exceções; os lipídeos e ácidos

nucléicos não atuam como antígenos, a menos que complexados com proteínas ou polissacarídeos. Em especial, a configuração espacial e a acessibilidade dos determinantes antigênicos para a reação são fatores importantes para o desencadeamento da resposta imunológica. Esta resposta protetora, subclínica, acontece a todo momento em alguma parte de organismo, dando conta de eliminar o antígeno sem danos teciduais ao hospedeiro e isto denomina-se resposta imunológica; se esta resposta lesar os tecidos passará a ser identificada como imunopatológica.

Alguns antígenos existentes em nosso organismo são classificados como seqüestrados. Pelas localizações especiais ou formação tardia, não são apresentados ao sistema imunológico durante o desenvolvimento da tolerância natural ou “construção da memória”. Quando expostos ao sistema imunológico já em atividade, desencadeam respostas imunopatológicas. Este é o caso do cristalino e dos espermatozóides.

A resposta do sistema imunológico contra componentes próprios do organismo, lesando as estruturas caracteriza a auto-imunidade, uma das formas de reação imunopatológica. Todos os indivíduos possuem alguns linfócitos auto-reativos maduros circulantes, mas que se encontram reprimidos pela anergia ou supressão clonal. Uma quebra no sistema regulatório, modificações do antígeno por exposições a processos físicos, mimetismo molecular levando a reações cruzadas, alterações no sistema imunitário com uma expressão imprópria de moléculas MHC classe II e liberação dos antígenos seqüestrados podem conduzir a uma ativação dos clones auto-reativos de linfócitos T ou B, gerando resposta humoral ou celular contra antígenos próprios, com o surgimento de uma resposta imunopatológica clinicamente detectável, de efeitos deletérios e com danos aos tecidos do hospedeiro.

1.5 Auto-imunidade e a reabsorção dentária

As proteínas dentinárias estão, desde a odontogênese, escondidas e isoladas tanto pelo lado interno como externo. Como antígenos seqüestrados, poderiam induzir fenômenos auto-

imunes e participar da etiopatogenia das reabsorções dentárias.

Discutindo transplantes dentários experimentais na Reunião Geral da IADR, ainda nos idos de 1964, COBURN; HENRIQUES¹⁷ comentavam a necessidade de se encontrar um método que detectasse a presença de anticorpos ou sensibilização no hospedeiro já que a rejeição clinicamente observável não podia ser distinguida da reabsorção, reação de corpo estranho ou simples esfoliação. Mais que isto, a partir de 1965, quando URIST⁹⁸ descreveu a possibilidade de induzir a formação óssea através da implantação de proteínas alogênicas de tecidos mineralizados como o osso e a dentina em animais experimentais, muito se tem discutido sobre o possível potencial imunogênico das estruturas dentárias. Há poucos trabalhos da literatura sobre o envolvimento imunopatológico na reabsorção dentária e o tema suscita controvérsia.

Em 1967, WHITE; ROGERS¹⁰³ demonstraram o desenvolvimento de uma resposta imunológica celular contra frações alogênicas de dentina através da rejeição acentuada do enxerto ósseo em coelhos. No mesmo ano, HALEY; COSTICH³⁴ mostraram a presença de células linfóides pironinofílicas, consideradas indicação específica da resposta imunológica ao transplante, na córtex dos linfonodos de cobaias submetidos a alotransplantes dentários, sugerindo que o dente, como o osso, seria antigênico. BANG⁴, em 1972, relatou que implantes repetidos de dentina alogênica liofilizada, fosse ela mineralizada ou não, induziam uma resposta imunológica resultando em uma acelerada rejeição do enxerto de pele. KUROYANAGI⁵⁰, no mesmo ano, encontrou antigenicidade, através de segunda exposição a células tumorais e teste de inibição da migração, nos dentes transplantados alogênica ou xenogenicamente após o terceiro dia do nascimento, mas não em embriões de ratos e camundongos. Em 1973, RIVIERE; HANSEN⁷⁷ mostraram que após transplante de polpa e de dentes entre diferentes cepas de ratos, os títulos de hemaglutinação estimulados pelos dentes foram maiores do que os estimulados pela polpa. KARDOS; HESLOP⁴⁵, em 1975, demonstraram que os transplantes dentais orto e heterotópicos estimulavam igualmente a produção de anticorpos em ratos e que os tecidos mineralizados dentários eram imunogênicos. SCHWARTZ⁸⁴, em 1983, relatou que alguns pacientes que tiveram seus alvéolos preenchidos com dentina descalcificada e liofilizada apresentaram reação inibitória da migração leucocitária contra o antígeno, o que poderia estar relacionada com episódios de rejeição.

Em contraposição, em trabalho apresentado em 1964, COBURN; HENRIQUES¹⁷ descreveram que os dentes inteiros ou aqueles livres de fragmentos pulpares implantados no peritônio de hamsters, não eram imunogênicos. Igualmente, MINCER; JENNINGS⁶⁷, em 1970, usando implantes de incisivos em camundongos, não detectaram reações inflamatórias locais nem fenômenos vasculares ao enxerto dental e obtiveram títulos de hemaglutinação similares aos demais enxertos.

Em 1975, SCHONFELD⁸² sugeriu que as proteínas da matriz do esmalte poderiam atuar como antígenos seqüestrados induzindo a reação com o anti-soro visualizada através de microscopia de imunofluorescência e que foi negativa para a dentina. Para a obtenção das proteínas da matriz do esmalte, o autor dissecou a papila dentária e utilizou a ECM com os epitélios do órgão do esmalte aderentes.

Relacionando reabsorção com a técnica de clareação dentária realizada sem o emprego de tamponamento, em 1983, LADO; STANLEY; WEISMAN⁵¹ postularam que esta poderia desnaturar a dentina exposta na linha cervical onde existe um defeito na junção cimento-esmalte. Nela, a dentina fica naturalmente desprovida de cobertura de cimento como demonstraram NEUVALD; CONSOLARO⁷¹. Para estes autores, o defeito na formação da junção amelocementária poderia estar relacionado com a ausência da apoptose em células da bainha epitelial de Hertwig, que impediria a cementogênese logo após encerrada a amelogênese⁵⁸. A dentina pode ser registrada como um tecido imunologicamente diferente, sendo reconhecida como se fosse um antígeno pelos elementos do tecido conjuntivo gengival.

Mais recentemente, os conhecimentos sobre o envolvimento dos mecanismos imunológicos na reabsorção dos tecidos mineralizados^{73, 91} levaram autores como KING; COURTS^{46, 47} e NG; KING; COURTS⁷² a pesquisar a presença de anticorpos durante reabsorção radicular ativa em cães, humanos e camundongos. Foi encontrada uma diminuição reversível dos títulos de anticorpos durante a fase ativa da reabsorção em cães e similar baixa titulação de anticorpos em humanos apresentando extensa reabsorção ativa, retornando aos níveis anteriores a reabsorção após a remoção ou perda das raízes reabsorvidas. Resultados semelhantes foram encontrados em camundongos. Ao discutirem como se originam tais auto-anticorpos, volta à tona a discussão da imunogenicidade da dentina e sua possível atuação como antígeno que estaria

seqüestrado até a rizólise dos dentes decíduos quando seriam expostos, sensibilizariam o sistema imunológico resultando na sua produção. Estes teriam um papel ativo em outra exposição, como no caso de uma reabsorção radicular. Ao mesmo tempo, especularam uma possível participação supressora dos linfócitos T, responsável pelos baixos títulos de anticorpos encontrados.

ROTSTEIN; LEHR; GEDALIA⁷⁹, em 1992, analisaram o efeito de agentes clareadores sobre os componentes inorgânicos da dentina e do cimento humano e observaram que a provável oxidação protéica causada por estes agentes, em especial o peróxido de hidrogênio, poderia ter contribuído para o aumento do material inorgânico encontrado e isto corroboraria a hipótese postulada por LADO; STANLEY; WEISMAN⁵¹, em 1983.

Em 1993, WHEELER; STROUP¹⁰² hiperimunizaram camundongos com extrato de dentina, utilizaram uma criosonda capaz de promover reabsorção radicular traumática e titularam os anticorpos presentes no soro. Quando comparados aos controles, apesar do aumento encontrado na titulação não ser estatisticamente significativo, não foi observada reabsorção radicular nos camundongos hiperimunizados, como se este procedimento os tivesse protegido da reabsorção radicular traumática através de possível mecanismo celular de resposta imunológica.

LARA⁵², em 1997, reportava que os constituintes dentários próprios e outros fatores etiológicos, como os bacterianos e/ou traumáticos, em associação com fenômenos inflamatórios poderiam ter participação na reabsorção dentária e, no mesmo ano, TROPE⁹⁵ comentava que a superfície radicular alterada poderia ser registrada pelo sistema imunológico como um tecido diferente e ser atacado como um corpo estranho.

Em 1998, TAKATA et al.⁹⁰ mostraram que extratos dentinários obtidos com guanidina/EDTA suprimiram a proliferação celular e causaram alterações morfológicas em linhagens celulares osteoblastos-*like* de camundongos. Ainda em 1998, KANNARI et al.⁴⁴ demonstraram a presença de grande quantidade de células expressando moléculas MHC classe II nas proximidades da camada odontoblástica e/ou na pré-dentina dos dentes decíduos durante a rizólise e reabsorção coronária. Discutiram que essas células poderiam liberar citocinas que levariam ao desarranjo e degeneração dos odontoblastos que eram progressivamente encontrados sem seu aspecto pseudoestratificado, tornando-se achatados e perdendo o contato célula-célula.

No ano 2000, NEUVALD; CONSOLARO⁷¹ demonstraram que o perfil anatômico da junção cimento-esmalte indica uma predisposição da área à reabsorção cervical externa. Analisaram 198 dentes humanos permanentes e por microscopia eletrônica de varredura encontraram três tipos de interrelação entre os tecidos: esmalte sobreposto ao cimento; esmalte e cimento topo a topo; e *gap* ao longo da linha cervical, revelando uma faixa de exposição dentinária. Usando microscopia óptica foi observado um quarto tipo de junção, cimento cobrindo esmalte.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Considerando a falta de evidências sobre o potencial imunogênico da dentina e a relevância de sua confirmação em todas as áreas da Odontologia, propusemos a verificar o potencial imunogênico da dentina e associá-lo a um possível mecanismo imunopatológico na reabsorção dentária com os seguintes propósitos específicos:

1. obter o extrato dentinário humano e caracterizá-lo;
2. obter soros imunes ao extrato dentinário humano através de sua inoculação em coelhos;
3. analisar o reconhecimento do extrato dentinário humano pelos soros de pacientes apresentando reabsorção dentária;
4. fracionar o extrato dentinário humano para utilização em ensaios subsequentes;
5. verificar a resposta imunológica humoral específica frente ao extrato dentinário humano e suas diferentes frações nos soros de pacientes apresentando reabsorção radicular;
6. verificar a resposta imunológica celular específica frente ao extrato dentinário humano e suas diferentes frações de pacientes apresentando reabsorção radicular;
7. verificar a presença de citocinas nos soros e sobrenadantes de cultura de células oriundas de pacientes com reabsorção radicular com o extrato dentinário humano e suas diferentes frações.

3 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do extrato dentinário humano

Por metodologia idealizada na Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, 76 molares íntegros foram extraídos por estarem parcial ou totalmente não irrompidos, impactados ou com problemas periodontais de pacientes adultos em clínicas particulares e no Setor de Urgências, e mantidos em solução tampão salina-fosfato (PBS) pH 7,4 a 4°C com trocas diárias, até no máximo 30 dias, para serem submetidos ao desgaste e obtenção de dentina em pó.

Após limpeza e retirada dos tecidos moles remanescentes com o auxílio de uma cureta periodontal, os dentes foram presos manualmente pela raiz e a coroa desgastada com broca cilíndrica diamantada sob alta rotação e irrigação constante com água destilada. O esmalte, de coloração esbranquiçada e a zona de transição amelodentinária foram desprezados, obtendo-se somente o tecido dentinário mais profundo, próximo à cavidade pulpar; sem exposição da mesma. Todo o material desgastado foi depositado em bandejas metálicas mantidas em estufa até que ocorresse a desidratação. Uma vez obtida a dentina na forma de pó ($\approx 38\text{g}$), uma alíquota foi estocada a 4°C até o momento de sua utilização na imunização de um coelho.

O antígeno dentinário humano foi extraído da dentina em pó modificando-se a técnica descrita por WHEELER; STROUP¹⁰², sendo coberto com a solução desmineralizadora guanidina-HCl 5M contendo 10% EDTA pH 5,0. Foi mantido a 4°C até que ao se friccionar duas placas de vidro contendo uma alíquota da solução, não se sentiu criptar. O extrato foi então centrifugado a 1.100g durante 20min a -4°C (Centrífuga *Eppendorf/Brinkmann Instruments Inc.*, USA) e o sobrenadante renaturado por diálise em água ultrapura *Milli-Q* (*Millipore Co.*, USA) por 24h a 4°C sob agitação. O material dialisado foi recolhido e como parecia haver suspensão, foi novamente centrifugado a 1.100g durante 20min a -4°C. O precipitado resultante foi utilizado

para a inoculação em um coelho e o sobrenadante colocado em placas de Pétri que foram mantidas a -20°C durante toda a noite. No dia seguinte, foi feita a liofilização até obter-se pó. Este foi recolhido e ressuspendido em PBS estéril, submetido à dosagem de proteínas totais por meio de teste comercial (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil) que demonstrou a obtenção de um extrato dentinário humano com concentração de aproximadamente 483mg de proteína, aliqotado e armazenado a -80°C (Ind. Refrigeração Londrinense Ltda., Brasil) até o seu uso posterior.

3.2 Eletroforese de gel de poliacrilamida em gradiente com SDS (SDS-PAGE)

Uma solução de acrilamida a 8% e igual quantidade a 16% foram pipetadas separadamente e, tris pH 8,8, água destilada, SDS 10%, persulfato de amônio 2% e TEMED foram adicionados a cada solução que continha um volume final de 4mL. Estas foram colocadas na peça formadora de gradiente com agitador e transferidos para uma miniplaca vertical formando um gradiente linear de gel de poliacrilamida de 8 a 16%. A seguir, o gel foi coberto com uma camada de álcool isoamílico e mantido a 37°C até a polimerização completa. Os resíduos de álcool foram retirados por lavagens exaustivas com água e sobre essa camada de gel foi pipetada mistura deaerada de 4mL de gel de empilhamento. Nessa solução, foi introduzido o molde de acrílico para formar os poços individuais de introdução de 20 μL de extrato dentinário (10 μg) ou mistura de proteínas padrões pré-coradas (*Prestained* – largo espectro, *Bio Labs.*, USA) ou o poço único de introdução de 260 μL de extrato dentinário (130 μg) em tampão de amostra. A corrida eletroforética foi realizada em tampão tris-glicina, pH 8,2 com 40v no gel de empilhamento e 80v até a chegada do corante na extremidade inferior do gradiente.

Quando pertinente, foi realizada a coloração do gel pela prata através da utilização de conjunto comercial *Silver Stain Plus* (*Bio Rad*, USA). A curva de calibração para cada corrida foi obtida relacionando-se os logaritmos das MM das proteínas padrões com as distâncias percorridas e através da equação resultante, foram atribuídas as MM das frações de dentina encontradas utilizando o programa *Excel Microsoft Office*.

3.3 Obtenção de soro imune ao extrato dentinário humano

Inicialmente, foi colhido sangue para obtenção do soro pré-imune de todos os animais a serem imunizados. O extrato dentinário (150µg) foi inoculado em cinco coelhos machos adultos jovens, sadios, com seis meses de idade, da raça Nova Zelândia branco, pesando entre 3 a 3,6kg, provenientes da Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá (UEM), por via subcutânea e utilizando adjuvante completo de Freund. Em outro coelho, com as mesmas especificações, foi inoculado o precipitado resultante da centrifugação do material dialisado, em outro a dentina na forma de pó e em outro, usado como controle, apenas o adjuvante. Com intervalos de 15 dias, foram inoculadas as segunda, terceira e quarta doses de forma similar à primeira, porém utilizando-se adjuvante incompleto de Freund. Dois coelhos inoculados com antígeno dentinário morreram durante o desenvolvimento da pesquisa e a necropsia revelou infecção generalizada não relacionada com o experimento. A sangria de prova foi realizada sete dias após a última imunização e, com base na positividade encontrada para anticorpos, foi feita a sangria branca. Os coelhos foram manuseados de acordo com as normas de bioética vigentes na Instituição.

3.4 Dot blotting

O extrato dentinário (5µg/mL segundo padronização previamente desenvolvida) foi colocado em membrana de nitrocelulose e incubado durante 1h a 37°C para adesão do antígeno. Em seguida, foi realizado o bloqueio com leite em pó desnatado 5% em solução salina fosfato tamponada *Tween* 20 (PBST) e após lavagens com leite em pó desnatado 0,5% em PBS (tampão de lavagem), foram adicionados os soros (puros) a serem testados que permaneceram incubados a 37°C durante 1h. Seguido a lavagens sucessivas, o conjugado peroxidase anti-IgG de coelho (*Sigma Chemical Co.*, USA - diluído 1:5.000) foi também incubado a 37°C durante 1h e posterior

a novas lavagens, foi adicionado diaminobenzidina (DAB) dissolvida em PBS acrescida com H_2O_2 para evidenciar a reação que foi paralisada com água destilada.

3.5 Imunodifusão radial dupla (IDRD - Ouchterlony)

As lâminas de vidro foram cobertas com ágar 1% e recortadas. No orifício central, foi colocado o extrato dentinário ($5\mu\text{g/mL}$) e nos orifícios circundantes, os soros puro e diluídos 1:2 até 1:32. As lâminas assim preparadas foram mantidas em câmara úmida em temperatura ambiente durante 24h. Em seguida, elas foram lavadas durante 24h com solução salina, secas e coradas com negro de amido.

3.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos

Uma alíquota de 0,1mL de extrato dentinário ($0,7\mu\text{g/pocinho}$ para ensaios com soros de coelhos ou 10; 1,5 ou $0,15\mu\text{g/pocinho}$ para soros humanos, segundo padronização previamente realizada) ou de frações do extrato dentinário ($4\mu\text{g/pocinho}$) diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,1M pH 9,6 foi distribuída em cada pocinho da placa de fundo plano e incubada durante 1h a 37°C e 18h a 4°C , para adesão do antígeno. Descartada a solução, foi realizado o bloqueio com 0,1mL de leite em pó desnatado 5% em PBST e após a utilização de tampão de lavagem na Lavadora de Microplacas *Wellwash4* (Labsystems, Finlândia) foi adicionado 0,1mL de cada soro a ser testado em diluição seriada (1:800 até 1:25.600) em tampão de lavagem para soros de coelho ou 1:50 para soros humanos (ambos previamente padronizados) em duplicatas, seguido de incubação a 37°C durante 1h. Após novas lavagens, foi depositado 0,1mL de conjugado peroxidase anti-IgG de coelho (*Sigma Chemical Co.*, USA) na diluição de 1:10.000; humana (*Sigma Chemical Co.*, USA) na diluição de 1:15.000 ou ainda conjugado peroxidase anti-IgM humana (*Sigma Chemical Co.*, USA) na diluição de 1:15.000 e incubado a

37°C durante 1h. Seguido a lavagens sucessivas, foi adicionado 0,1mL de cromógeno *o*-fenilediamino dihidroclorato (OPD) dissolvido em tampão ácido cítrico-fosfato acrescido com 25% H₂O₂. A leitura foi realizada em aparelho *Multiskan (Labsystems, Finlândia)* a 492nm, após a paralisação da reação com 50mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4N. Os ensaios para dosagem de IgG e IgM humana específica para as frações do extrato dentinário foram feitas em duplicatas, com repetição.

3.7 Seleção de pacientes e indivíduos saudáveis

Doze pacientes (idades variando de 15 a 29, média 18,8) das Clínicas de Especialização em Ortodontia do Departamento de Medicina Oral e Odontologia Infantil da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e da Clínica *Dental Press* de Maringá apresentando reabsorção radicular inflamatória apical ativa, tipo arredondamento apical, foram selecionados com base nos dados obtidos após anamnese, exame clínico e radiográfico (FIGURA 1).

Doze indivíduos sadios (idades entre 15 e 25, média 18,7) sem quaisquer evidências de reabsorção radicular foram escolhidos como controles, segundo a idade e gênero semelhantes à população estudada. Adicionalmente, um grupo de quatro pacientes (idades entre 16 e 19, média 17,5) apresentando reabsorção radicular por substituição (FIGURA 2) foram também analisados.

Os indivíduos não estavam em tratamento com antibióticos durante os três meses anteriores à coleta de material e todos (ou seus responsáveis quando menores) consentiram de forma livre e esclarecida na realização do procedimento (Projeto aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP).

FIGURA 1 – Caracterização radiográfica da reabsorção radicular inflamatória apical ativa em um paciente apresentando arredondamento apical. Região de incisivos superiores: a) ao iniciar o tratamento ortodôntico e b) 45 meses após o início do tratamento, na época da coleta inicial de amostras de soro

FIGURA 2 - Caracterização radiográfica da reabsorção radicular por substituição em um paciente. Região de incisivos superiores: a) no início do tratamento ortodôntico e b) 34 meses após o início do tratamento, dez meses antes da coleta inicial de amostras de soro

3.8 Obtenção de amostras de soro e células mononucleares

Para obtenção de amostras de soro dos pacientes apresentando reabsorção radicular e indivíduos saudáveis, o sangue venoso coletado foi incubado a 37°C durante 30min e, posteriormente, a 4°C durante 1h. Submetido à centrifugação, o soro resultante foi aliquotado e armazenado a -80°C até a sua utilização.

Um ano após a primeira coleta, novas amostras de soro foram obtidas, assim como as de células mononucleares. Alguns indivíduos se negaram a participar diminuindo para nove pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa, oito controles sem reabsorção radicular e três pacientes com reabsorção radicular por substituição. O sangue venoso foi assepticamente obtido em tubos heparinizados, centrifugado a 300g durante 15min em temperatura ambiente e a interfase entre eritrócitos e plasma foi colhida, diluída em igual volume de PBS e depositada sobre um gradiente descontínuo de Ficoll com densidade de 1.076. Após nova centrifugação, a camada de mononucleares foi recolhida em tubos, lavada 3X com PBS, ressuspendida em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro bovino fetal inativado e ajustada a uma concentração final de 10^6 células/mL contadas em câmara *Neubauer*.

3.9 Western blotting

Após eletroforese do gel de poliacrilamida em gradiente 8-16% com SDS, foi feita a transferência do extrato dentinário para membrana de PVDF (*Imobilon P*, *Millipore Co.*, USA) por eletroforese a 70v durante 2h, passando a 80v na última meia hora e utilizando tampão tris-glicina metanol 10% pH 8,7 a 4°C. Concluída a transferência, a membrana de PVDF foi deixada 18h a temperatura ambiente para desidratação. Após o corte de tiras individualizadas, cada uma foi incubada com o respectivo soro de coelhos imunizados, pré-imunizados, de pacientes apresentando reabsorção ou controles, todos em titulação previamente estabelecida como ideal

(1:25 soros de coelho e 1:20 soros humanos), durante 1h. Após lavagens sucessivas com o tampão de lavagem, as tiras de PVDF foram incubadas com o conjugado peroxidase anti-IgG de coelho (1:2.500 - *Sigma Chemical Co.*, USA) ou humana (1:3.750 - *Sigma Chemical Co.*, USA) durante 1h, seguida de novas lavagens. A reação foi evidenciada com DAB e paralisada com água destilada. Os controles utilizados foram PBS e os próprios soros de indivíduos saudáveis.

3.10 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Segundo metodologia desenvolvida em conjunto com o departamento técnico da VARIAN (Ind. Com. Ltda., Brasil e Inc., USA), o extrato dentinário ($\approx 20\text{mg/mL}$) dissolvido em tampão acetato de amônia 0,3M pH 6,9 foi filtrado e colocado em frascos apropriados para a utilização no *Autosampler Prostar 400* (*Varian Inc.*, USA). Proteínas com MM conhecidas como IgG e albumina de soro de coelho, ovoalbumina e IgG humana reduzida foram utilizadas como padrões.

A análise das amostras foi efetuada através de uma coluna de exclusão baseada no tamanho molecular de proteínas *Hydropore SEC 10x250mm* com sua respectiva pré-coluna em fluxo constante de 1,8mL/min de tampão acetato de amônia 0,3M pH 6,9 como fase móvel durante 18min. O sistema de cromatografia líquida *Prostar* (*Varian Inc.*, USA) era constituído por uma bomba de baixa pressão com capacidade de realizar gradiente binário, amostrador automático para garantir reprodutibilidade dos resultados, detector ultravioleta a 280nm e estação de trabalho *Star* (*Varian Inc.*, USA) para aquisição de dados e controle do HPLC.

O fracionamento das amostras foi obtido pela injeção do extrato dentinário e coleta dos subprodutos separados por intervalo de tempo que foram recolhidos em 105 tubos pelo Coletor de Frações *Dynamax* (*Varian Inc.*, USA). Para obtenção de quantidade e concentração suficientes de cada fração a ser utilizada nos demais experimentos, foi necessária a injeção repetida 30X do extrato dentinário humano e sua coleta. As frações obtidas em cada tubo foram liofilizadas

durante 16h e posteriormente ressuspensas em água *MilliQ*, aliquotadas e armazenadas a -80°C até o seu uso posterior.

3.11 Ensaio de proliferação linfoblástica

A suspensão celular de linfócitos (0,1mL) de pacientes apresentando reabsorção radicular e de doadores saudáveis foi distribuída nos pocinhos de placas escavadas em fundo U, adicionando-se o extrato dentinário (3µg/pocinho) ou as suas diferentes frações ($\approx 2\mu\text{g/pocinho}$). A cultura de células foi realizada em triplicata em um mesmo volume final e em todos os experimentos foram utilizados como controle negativo, linfócitos sem a presença de estímulo algum e como controles positivos, linfócitos com os mitógenos concanavalina A (ConA - 16µL/pocinho) e fitohemaglutinina (PHA - 4µL/pocinho). As placas de cultura foram incubadas a 37°C durante 72h em ambiente com 5% de CO₂. Oito horas antes de se esgotar o tempo de incubação, cada pocinho foi marcado com 9µL de timidina tritiada (1µCi). Após o período de incubação, os sobrenadantes foram recolhidos e mantidos a -80°C até seu uso posterior e as células foram coletadas semi-automaticamente em filtro de fibra de vidro (*Millipore Co.*, USA) que foi recortado, colocado em frasco de cintilação contendo 2,5mL de líquido de cintilação miscível em água e levado para contagem em aparelho cintilador *LS Analyzer Beckman*. Os resultados foram expressos em índice de proliferação, obtido pela utilização da seguinte fórmula:

ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO: média de leitura das triplicatas da resposta linfoproliferativa estudada / média de leitura das triplicatas da resposta linfoproliferativa na ausência de estímulo, ambas em contagem por minuto (cpm).

3.12 ELISA para detecção de citocinas

Foram utilizados conjuntos comerciais de alta sensibilidade para detecção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TGF β e TNF α (*Biotrak, cellular communication assays, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra*). Um anticorpo específico para a citocina pesquisada estava aderido à placa fornecida pelo fabricante. As amostras (soros puros ou sobrenadantes dos ensaios de proliferação linfoblástica diluídos 1:3) e os padrões com concentrações conhecidas foram pipetados e incubados, sob agitação constante, em temperatura ambiente. Foi adicionado um anticorpo conjugado à biotina e posteriormente um reagente amplificador. Com a utilização do substrato houve o aparecimento de cor até que a solução de parada fosse colocada. Todos os reagentes faziam parte do conjunto comercial (*kit*). A leitura foi realizada em aparelho *Multiskan (Labsystems, Finlândia)* a 450nm e a partir da curva padrão relacionando-se o logaritmo da densidade óptica (DO) com o respectivo logaritmo da concentração obteve-se uma equação, através da qual foram atribuídas as concentrações das citocinas analisadas através do programa *Excel Microsoft Office*.

3.13 Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios ELISA para detecção de anticorpos e proliferação linfoblástica foram submetidos a análise de variância (*ANOVA*) e ao teste *t-Student* para verificação da existência de diferenças entre os grupos, sendo utilizado um nível de significância de 5%.

No ensaio *Western blotting* foi utilizada a estatística não paramétrica, mais especificamente o teste do sinal, sendo a variável x= paciente e a y=controle; atribuídos escores às qualificações +, ++ ou +++; e considerado um nível de significância de 7%.

No ensaio ELISA para detecção de citocinas, os dados não estavam normalmente distribuídos, sendo utilizada a estatística não paramétrica, o teste *Wilcoxon* para a análise dos resultados e considerado um nível de significância de 5%.

As estatísticas foram consideradas significativas para os valores de p-valor menores que 0,05.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção do extrato dentinário humano e análise por eletroforese de gel de poliacrilamida

A partir de 76 dentes humanos recém-extraídos, a dentina foi submetida a diversos procedimentos como desgaste, desidratação, desmineralização, centrifugações, diálise e liofilização que resultaram na obtenção de um extrato dentinário com concentração de $\cong 483\text{mg}$ de proteína. Esse extrato ($10\mu\text{g/mL}$), quando submetido à eletroforese de gel de poliacrilamida em gradiente 8-16% com SDS e posterior coloração pela prata, mostrou ser composto por diversos fragmentos representados por bandas de diferentes intensidades e com MM aproximada de 170; 82; 78; 62; 44; 40; 38; 36; 32,5; 29; 28; 22; 16,5; 10 e 6kDa (FIGURA 3).

FIGURA 3 – Perfil eletroforético do extrato dentinário humano. Resultado de eletroforese do extrato dentinário (10 μ g/mL) em gel de poliacrilamida em gradiente 8-16% com SDS e posterior coloração pela prata. À esquerda, padrão de MM pré-corado e à direita, extrato dentinário humano apresentando bandas de MM aproximada de 170; 82; 78; 62; 44; 40; 38; 36; 32,5; 29; 28; 22; 16,5; 10 e 6kDa

4.2 Verificação da produção de anticorpos pelos coelhos imunizados através de ensaio *Dot Blotting*

A presença de anticorpos policlonais antiextrato dentinário nos soros dos coelhos imunizados foi detectada através de ensaio *Dot Blotting*. Na parte superior da FIGURA 4 (a, b, c, e d) pode ser observada a reação positiva dos soros imunes (puros) em relação aos soros pré-imunes (puros) localizados na parte inferior referentes aos coelhos imunizados com o extrato dentinário humano (5µg/mL) e com o precipitado resultante da centrifugação do material dialisado, demonstrando a produção de anticorpos. Já o soro do coelho imunizado com pó de dentina (e) respondeu de forma menos acentuada, correspondendo a uma pequena produção de anticorpos.

FIGURA 4 - Resultado de *Dot blotting* de amostras séricas de coelhos imunizados. Na parte superior pode ser observada a reação positiva dos soros puros imunes (**I**) em relação aos controles constituídos pelos pré-imunes (**PI**) localizados na parte inferior referentes aos coelhos imunizados respectivamente com **a)**, **b)** e **c)** extrato dentinário humano (5µg/mL); **d)** precipitado resultante da centrifugação do material dialisado e **e)** pó de dentina

4.3 Titulação de anticorpos em amostras de soros de coelhos imunizados e análise das linhas de precipitação através de IDRD – Ouchterlony

Tendo observado anteriormente a produção de anticorpos, foi feita uma titulação preliminar e análise dos possíveis componentes antigênicos presentes no extrato dentinário humano através das linhas de precipitação encontradas na IDRD. Foi utilizado extrato dentinário na concentração de 5µg/mL no orifício central e os soros puro; diluído 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32 respectivamente nos orifícios circundantes, iniciando pelo direito superior. Como se vê na parte superior da FIGURA 5, os coelhos imunizados com extrato dentinário (a, b e c) apresentaram várias linhas de precipitação correspondentes aos componentes antigênicos presentes em diferentes diluições, o que se contrapõe à sua ausência quando utilizado soros pré-ímmunes (parte inferior da FIGURA 5). Os resultados de *Dot Blotting* e IDRD guiaram a realização da subsequente sangria branca.

FIGURA 5 - Titulação de anticorpos em amostras de soros de coelhos imunizados e análise das linhas de precipitação por meio de IDRD - Ouchterlony. Foi utilizado extrato dentinário humano na concentração de $5\mu\text{g/mL}$ no orifício central e os soros puro; diluído 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32 respectivamente nos orifícios circundantes, iniciando pelo direito superior. Os coelhos haviam sido imunizados com extrato dentinário humano (**a, b e c**), precipitado resultante da centrifugação do material dialisado (**d**) e pó de dentina (**e**). Na parte superior, soros imunes (**I**) e na parte inferior, soros pré-imunes (**PI**)

4.4 Titulação de anticorpos em amostras de soros de coelhos imunizados por meio de ELISA

Com a utilização de uma metodologia mais sensível, as médias aritméticas da leitura em DO a 492nm das duplicatas, quando utilizado 0,7µg/pocinho de extrato dentinário humano, demonstraram um nível elevado de IgG antiextrato dentinário nos soros dos coelhos imunizados em todas as diluições analisadas (1/800 a 1/25.600) quando comparados com os soros pré-ímmes (FIGURA 6a). O precipitado resultante da centrifugação extra após a diálise e o pó de dentina apresentaram também perfis semelhantes, apenas com valores respectivamente menores (FIGURA 6b). O resultado do controle de imunização apenas com o adjuvante foi negativo como pode ser observado na FIGURA 6b.

FIGURA 6 - Titulação de anticorpos em amostras de soros de coelhos imunizados por meio de ELISA. Médias aritméticas da leitura em DO a 492nm das duplicatas utilizando extrato dentinário humano ($0,7\mu\text{g/pocinho}$) e soros imunes e pré-imunes em diferentes diluições. Em **a)** resultado dos coelhos imunizados com extrato dentinário e em **b)** resultado dos coelhos imunizados com o precipitado resultante da centrifugação do material dialisado, com o pó de dentina e somente adjuvante

4.5 Análise das frações do extrato dentinário humano reconhecidas pelos soros de coelhos imunizados em ensaios *Western blotting*

A análise das frações antigênicas reconhecidas pelos soros de coelhos imunizados por meio de *Western blotting* (FIGURA 7a) demonstraram reconhecimento de, pelo menos, 12 frações com MM entre 6 e >170kDa presentes no extrato dentinário humano enquanto os respectivos soros pré-ímmes não as reconheceram ou o fizeram em uma pequena concentração (FIGURA 7b).

Em acordo com os dados obtidos por meio de ELISA, os coelhos imunizados com extrato dentinário humano (C1, C2 e C3) apresentaram um maior número de frações reconhecidas do que aqueles imunizados com o precipitado resultante do material dialisado ou com o pó de dentina (TABELA 2). O animal no qual foi inoculado apenas o adjuvante, não apresentou resposta positiva para nenhuma fração do extrato dentinário humano. Digno de menção, o aparecimento de banda não visualizada no perfil eletroforético que aqui se mostrou positiva (MM>170kDa) e outras que apareceram no perfil eletroforético mas não foram reconhecidas como antigênicas pelos soros dos coelhos imunizados (MM 78, 40, 36 e 29kDa).

FIGURA 7 - Frações do extrato dentinário humano reconhecidas pelos soros de coelhos imunizados em ensaios *Western blotting*. O extrato dentinário (130 μ g em poço único) foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente 8-16% com SDS e transferidos para membrana PVDF. Os soros de coelhos foram diluídos 1:25 e as qualificações +, ++ e +++ para a intensidade da banda foram atribuídas de forma subjetiva. Resultado em porcentagem de reconhecimento pelos soros **a)** de coelhos imunizados com extrato dentinário humano (n=3) e **b)** pré-ímmunes

TABELA 2 - Frações do extrato dentinário humano reconhecidas pelos soros de coelhos imunizados em ensaios *Western blotting*. O extrato dentinário (130µg em poço único) foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente 8-16% com SDS e transferidos para membrana PVDF. Os soros de coelhos foram diluídos 1:25 e as qualificações +, ++ e +++ para a intensidade da banda foram atribuídas de forma subjetiva

MM (aproximada)	C1		C2		C3		C4-Prec		C5-Pó		C6-Adj	
	I*	PI	I	PI	I	PI	I	PI	I	PI	I	PI
>170	++	+										
170	+		+		+							
82	+		+		+							
62	+				+				+			
44	+++	+	+++		++		+++	+	++			
38	+											
32,5	+++	+	+++		++		+++	+	++			
28	+				+		+					
22	++	+	++		++		++	+	+			
16,5	+		+				+					
10	+				+		+					
6	+		++	+	+		+		+			

*I: soro imune; PI: soro pré-imune; os espaços vazios significam que não foram reconhecidas pelos soros de coelhos

4.6 Análise das amostras de soros de pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa e de controles por meio de ensaios *Western blotting* utilizando extrato dentinário humano

Foi verificado, através de *Western Blotting*, se os soros de pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa apresentavam anticorpos antifrações do extrato dentinário se comparados com indivíduos saudáveis sem reabsorção. Os resultados demonstraram a presença de anticorpos que reagem de forma estatisticamente semelhante tanto em pacientes como em controles frente a algumas frações do extrato dentinário humano (FIGURA 8a e b) e outros que reagem de forma estatisticamente diferente (FIGURA 9a e b).

De forma similar ao ocorrido com os soros de coelhos imunizados, bandas que não apareciam no perfil eletroforético do extrato dentinário humano se mostraram positivas neste ensaio *Western blotting* (MM>170, 135, 110, 55, 30, 18, <6kDa) e houve apenas uma banda que aparecia no perfil eletroforético e que não foi reconhecida como antigênica por nenhum dos grupos estudados (MM 40kDa).

FIGURA 8 - Frações do extrato dentinário humano reconhecidas de forma estatisticamente semelhante pelos soros de pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa e de controles em ensaios *Western blotting*. O extrato dentinário (130µg em poço único) foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente 8-16% com SDS, transferido para membrana PVDF e tratado com amostras de soros humanos diluídos 1:20. As qualificações +, ++ e +++ para a intensidade da banda foram atribuídas de forma subjetiva. Resultados expressos em porcentagem de reconhecimento pelos soros de **a)** pacientes apresentando reabsorção inflamatória ativa (n=12) e **b)** indivíduos saudáveis sem reabsorção (n=12). Estatística não paramétrica (Teste do sinal)

FIGURA 9 – Frações do extrato dentinário humano reconhecidas de forma estatisticamente diferente pelos soros de pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa e de controles em ensaios *Western blotting*. O extrato dentinário (130µg em poço único) foi submetido à eletroforese em gel de poliácridamida em gradiente 8-16% com SDS, transferidos para membrana PVDF e tratado com amostras de soros humanos diluídos 1:20. As qualificações +, ++ e +++ para a intensidade da banda foram atribuídas de forma subjetiva. Resultados expressos em porcentagem de reconhecimento pelos soros de **a)** pacientes apresentando reabsorção inflamatória ativa (n=12) e **b)** indivíduos saudáveis sem reabsorção (n=12). Estatística não paramétrica (Teste do sinal)

4.7 Cromatograma representativo dos tempos de retenção da amostra de extrato dentinário humano

Tendo encontrado diferenças no reconhecimento dos soros às diversas frações do extrato dentinário separadas eletroforéticamente, buscou-se isolar frações do extrato dentinário humano utilizando-se coluna de exclusão em HPLC. Os subprodutos coletados foram separados por intervalo de tempo e a identificação da MM aproximada da fração se deu através de correlação com os tempos de retenção de padrões com MM conhecidas como mostrado neste cromatograma representativo (FIGURA 10).

Das frações isoladas, foram selecionadas aquelas com MM de aproximadamente 170, 82/78, 62, 55, 44 e 32,5kDa. Para obtenção de quantidade e concentração suficientes de cada uma delas a serem utilizadas nos demais experimentos previstos, foram necessários 30 fracionamentos e coletas do extrato dentinário humano. Para certificar a repetibilidade e reprodutibilidade destes fracionamentos, os cromatogramas foram submetidos à análise pela própria estação de trabalho *Star* que encontrou um desvio-padrão de 0,36% entre eles, confirmando que em um mesmo tempo de retenção, sempre estava sendo coletada a mesma fração do extrato dentinário humano.

FIGURA 10 - Cromatograma representativo dos tempos de retenção da amostra de extrato dentinário humano. O extrato dentinário ($\approx 20\text{mg/mL}$) foi fracionado por HPLC em coluna de exclusão *Hydropore SEC* (10x250mm) com fluxo constante de 1,8mL/min de tampão acetato de amônia 0,3M pH 6,9 durante 18min e a detecção foi realizada a 280nm. As setas indicam os tempos de retenção de padrões como **a)** IgG (150kDa) e **b)** albumina (69kDa) de soro de coelho, **c)** ovoalbumina (44kDa) e **d)** IgG humana reduzida (25kDa)

4.8 Análise de IgG e IgM antiextrato dentinário humano em amostras de soros de pacientes com reabsorção radicular e de controles por ELISA

Foi verificada a presença de IgG sérica frente ao extrato dentinário humano (total, sem fracionamento) em três distintas concentrações. Pode-se observar que a média aritmética da leitura em DO a 492nm foi sempre maior para os grupos de pacientes apresentando reabsorção radicular, seja ela inflamatória apical ativa ou por substituição, em comparação aos indivíduos saudáveis sem reabsorção, porém, essa diferença só foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na concentração de 10µg/pocinho (FIGURA 11a, *).

Para IgM, pode-se constatar que o grupo controle apresentou média aritmética da leitura em DO menor ou igual ao do grupo de pacientes apresentando reabsorção inflamatória ativa e que nos pacientes com reabsorção por substituição, os níveis de IgM foram menores que nos demais grupos estudados, ainda que sem diferença estatisticamente significativa (FIGURA 11b).

FIGURA 11 - Anticorpos séricos antiextrato dentinário humano de pacientes com reabsorção radicular e de controles detectados por ELISA. A barra representa a média aritmética do grupo e cada ponto representa a média de leitura das duplicatas em DO a 492nm, utilizando o extrato dentinário humano em três diferentes concentrações (10; 1,5 e 0,15µg/pocinho) e soros (diluídos 1:50) de pacientes apresentando reabsorção radicular inflamatória apical ativa (n=12), de indivíduos saudáveis sem reabsorção (n=12) e pacientes com reabsorção radicular por substituição (n=4). Em **a)** anticorpos IgG e em **b)** anticorpos IgM. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) pelo Teste *t-Student*

4.9 Análise de IgG e IgM antifrações do extrato dentinário humano em amostras de soros de pacientes com reabsorção radicular e de controles por ELISA

Para investigar a presença de anticorpos nos soros dos diferentes grupos estudados frente a algumas frações selecionadas entre aquelas obtidas por HPLC, foi utilizada uma concentração aproximada de 2µg/pocinho. Para IgG, como anteriormente encontrado frente ao extrato dentinário humano, a média aritmética da leitura a 492nm expressa em DO foi maior para os grupos de pacientes apresentando reabsorção radicular, seja ela inflamatória apical ativa ou por substituição, em comparação aos controles. Exceção foi observada na resposta frente à fração de aproximadamente 44kDa, sendo as diferenças estatisticamente significativas na maioria dos casos (FIGURA 12a, *). Os níveis de IgG específicos às frações com MM aproximada de 170, 55 e 32,5kDa nos soros dos pacientes com reabsorção por substituição foram estatisticamente maiores que aqueles encontrados nos pacientes com reabsorção inflamatória ativa (FIGURA 12a, **).

Para IgM, como também anteriormente encontrado frente ao extrato dentinário humano, o grupo de indivíduos sem reabsorção apresentou uma média aritmética menor ou igual ao do grupo de pacientes apresentando reabsorção radicular inflamatória apical ativa e o grupo de pacientes com reabsorção radicular por substituição, menor ou igual nível que os demais grupos estudados, porém, com diferença estatisticamente significativa apenas para a fração com MM aproximada de 62kDa (FIGURA 12b, *). Os níveis de IgM específicos às frações de MM aproximada de 82/78 e 62kDa presentes nos soros dos pacientes com reabsorção por substituição foram estatisticamente menores que aqueles encontrados nos pacientes com reabsorção inflamatória ativa (FIGURA 12b, **).

De modo geral, a leitura dos ensaios para detecção de IgG apresentaram valores menores que os de IgM (FIGURA 12 a e b).

FIGURA 12 - Anticorpos séricos antifrações do extrato dentinário humano de pacientes com reabsorção radicular e de controles detectados por ELISA. Médias aritméticas $\pm$ desvios padrão de leitura em DO a 492nm utilizando as frações do extrato dentinário humano ($\text{@}2\mu\text{g/pocinho}$) obtidas por HPLC e soros (diluídos 1:50) de pacientes apresentando reabsorção radicular inflamatória apical ativa ($n=12$), de indivíduos saudáveis sem reabsorção ($n=12$) e de pacientes com reabsorção radicular por substituição ($n=4$). Em **a**) anticorpos IgG e em **b**) anticorpos IgM. Ensaio realizado em duplicatas, com repetição e diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação ao grupo controle* ou ao grupo apresentando reabsorção inflamatória** pelo Teste *t-Student*

4.10 Comparação entre os níveis séricos de IgG antiextrato dentinário humano e suas diferentes frações de pacientes apresentando reabsorção radicular e de controles em função do tempo

Como houve um intervalo de um ano entre a coleta de soro inicial e a posterior coleta de células mononucleares para os experimentos de proliferação linfoblástica, decidiu-se que, concomitante a esta, nova amostra de soro seria coletada para confirmação dos resultados. Pode-se observar na TABELA 3 que os resultados de ELISA de todos os grupos para o extrato dentinário humano permaneceram praticamente os mesmos. Para as diferentes frações, no grupo controle, os valores se repetiram ou houve um pequeno incremento enquanto que nos grupos apresentando reabsorção radicular, inflamatória ativa ou por substituição, os resultados se mantiveram ou ocorreu uma diminuição.

TABELA 3 - Comparação entre os níveis séricos de IgG antiextrato dentinário humano e suas diferentes frações de pacientes apresentando reabsorção radicular e de controles em função do tempo, detectados por ELISA. Médias aritméticas $\pm$ desvios padrão de leitura em DO a 492nm, utilizando o extrato dentinário humano (1,5 μ g/pocinho) ou suas diferentes frações (2 μ g/pocinho) e soros de pacientes (diluídos 1:50) apresentando reabsorção radicular inflamatória apical ativa (n=9), de indivíduos saudáveis sem reabsorção (n=8) e de pacientes com reabsorção radicular por substituição (n=3) obtidos em duas coletas distintas, sendo a segunda um ano posterior a primeira e concomitante a obtenção de células mononucleares

MM (aproximada)	R. inflamatória (n=9)		Controle (n=8)		R. substituição (n=3)	
	1	2	1	2	1	2
Ext.total	0,55 $\pm$ 0,25	0,55 $\pm$ 0,16	0,33 $\pm$ 0,15	0,39 $\pm$ 0,11	0,60 $\pm$ 0,25	0,61 $\pm$ 0,13
170	0,14 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,06	0,14 $\pm$ 0,02
82/78	0,24 $\pm$ 0,12	0,17 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,06	0,16 $\pm$ 0,04	0,24 $\pm$ 0,12	0,16 $\pm$ 0,04
62	0,25 $\pm$ 0,11	0,14 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,08	0,12 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,09	0,12 $\pm$ 0,01
55	0,15 $\pm$ 0,07	0,11 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,05	0,12 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,10	0,12 $\pm$ 0,01
44	0,18 $\pm$ 0,09	0,07 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,08	0,08 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,09	0,08 $\pm$ 0,01
32,5	0,23 $\pm$ 0,08	0,22 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,07	0,20 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,11	0,25 $\pm$ 0,04

4.11 Resposta linfoproliferativa ao estímulo antigênico com extrato dentinário humano ou suas diferentes frações em cultura de células oriundas de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles

No geral, os pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa ou por substituição apresentaram uma média do índice de proliferação dos linfócitos, expresso em cpm, menor que os indivíduos saudáveis sem reabsorção, inclusive nos ensaios de controle com mitógenos (FIGURA 13a e b). A diferença foi estatisticamente significativa entre os pacientes com e sem reabsorção quando utilizado frações de MM aproximada de 170, 44 ou 32,5kDa (FIGURA 13a, *). Deve ser observado que os índices de linfoproliferação obtidos frente aos antígenos foram baixos se comparados àqueles alcançados com o uso de mitógenos como a ConA ou a PHA (FIGURA 13b).

FIGURA 13 - Resposta linfoproliferativa ao estímulo antigênico com extrato dentinário humano ou suas diferentes frações em cultura de células oriundas de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles. Médias aritméticas $\pm$ desvios padrão dos índices de proliferação, expressos em cpm, dos linfócitos provenientes de pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa ($n=9$), de indivíduos saudáveis sem reabsorção ($n=8$) e de pacientes apresentando reabsorção por substituição ($n=3$) frente ao estímulo com **a)** extrato dentinário humano ($3\mu\text{g/pocinho}$) ou suas diferentes frações ($\sim 2\mu\text{g/pocinho}$) obtidas por HPLC e **b)** mitógenos como a concanavalina A ($16\mu\text{L/pocinho}$) e fitohemaglutinina ($4\mu\text{L/pocinho}$). Ensaio realizado em triplicatas e diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle* pelo Teste *t-Student*

4.12 Níveis séricos de IL-1a e b, IL-6, TGFb e TNFa de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles

Para verificar o nível das citocinas relacionadas com a reabsorção dentária em soros dos diferentes grupos estudados, foram utilizados conjuntos comerciais de alta sensibilidade, com detecção entre 0,31 e 10pg/mL para IL-1 β e TNF α ; 0,63 e 20pg/mL para IL-1 α e IL-6; e 16 e 1.000pg/mL para TGF β por ELISA.

Como se vê na TABELA 4, os valores de IL-1 α fornecidos pelo fabricante como normais para amostras de soro situam-se entre 0 e 5,4pg/mL e todos os indivíduos estudados se apresentaram nesta faixa, com exceção de um paciente com reabsorção por substituição no qual se detectou 9,5pg/mL.

Para IL-1 β , é considerado normal encontrar-se até 1,5pg/mL segundo o fabricante, e todos os soros estavam dentro deste limite.

Os valores esperados como normais pelo fabricante para IL-6 estão entre 0 e 14,9pg/mL e todos as amostras séricas analisadas preencheram este requisito.

O TGF β pode ser encontrado em uma concentração de até 500pg/mL de soro e os valores encontrados em nossas amostras estavam neste limite.

Finalmente, é considerado normal pelo fabricante detectar-se TNF α até 4,9pg/mL de soro e todos os indivíduos analisados se encontravam dentro deste parâmetro.

TABELA 4 - Níveis séricos de IL-1a e b, IL-6, TGFb e TNFa de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles detectados por ELISA. O respectivo anticorpo estava pré-aderido na microplaca fornecida pela fabricante do conjunto comercial e os soros foram utilizados puros, sem diluição. Leitura a 450nm e concentrações obtidas a partir da equação resultante da curva padrão

Citocinas	Valores normais (descritos pelo fabricante)	Valores encontrados
IL-1a	0 - 5,4*	Normais, exceto um paciente R.rápida com 9,5
IL-1b	0 - 1,5	Normais
IL-6	0 - 14,9	Normais
TGFb	0 - 500	Normais
TNFa	0 - 4,9	Normais

* Resultados expressos em pg/mL

4.13 IL-1 (a e b) em sobrenadantes de cultura de células mononucleares provenientes de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles

Para investigar a presença de citocinas como a IL-1 α e β nos sobrenadantes das culturas de células provenientes dos diferentes grupos estudados estimuladas com o extrato dentinário humano ou com as frações de aproximadamente 82/78 e 55kDa, foram utilizados conjuntos comerciais de alta sensibilidade como descrito anteriormente.

O estímulo com extrato dentinário humano provocou a liberação de IL-1 α de forma estatisticamente mais intensa no grupo com reabsorção inflamatória ativa que nos controles, assim como no grupo com reabsorção por substituição esta liberação foi estatisticamente menos intensa que os grupos controle e de reabsorção inflamatória ativa (FIGURA 14a, * e **). Para o estímulo com as frações do extrato dentinário, houve diferença estatisticamente significativa na liberação de IL-1 α apenas entre os pacientes apresentando reabsorção por substituição e indivíduos saudáveis sem reabsorção com a fração de MM aproximada de 82/78kDa (FIGURA 14a, *). Pode-se observar ainda que os sobrenadantes de cultura celular estimulados com extrato dentinário humano total apresentaram concentrações muito maiores de IL-1 α que aqueles estimulados com suas frações de MM aproximada de 82/78 e 55kDa.

Já as concentrações de IL-1 β nos sobrenadantes de cultura celular com estímulo do extrato dentinário humano total não apresentou grandes diferenças em relação às suas frações, porém, o grupo com reabsorção inflamatória ativa liberou estatisticamente mais IL-1 β que o controle quando estimulada tanto com extrato dentinário como com a fração de aproximadamente 82/78kDa (FIGURA 14b, *). Os pacientes apresentando reabsorção por substituição estimulados com a fração de MM aproximada de 82/78kDa liberaram estatisticamente menos IL-1 β que aqueles com reabsorção inflamatória ativa (FIGURA 14b, **).

FIGURA 14 - IL-1 em sobrenadantes de cultura celular de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles detectados por ELISA. A barra representa a mediana do grupo e cada ponto representa a concentração em pg/mL de IL-1 detectada nos sobrenadantes de cultura celular provenientes de pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa (n=9), controles (n=8) e pacientes com reabsorção radicular por substituição (n=3) estimulados com extrato dentinário humano ou suas frações. Leitura a 450nm e concentrações obtidas a partir da equação resultante da curva padrão. Em **a)** IL-1 α e em **b)** IL-1 β . Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle* e aos pacientes com reabsorção inflamatória** pelo Teste *t-Student*

4.14 IL-6 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares provenientes de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles

Observa-se na FIGURA 15 que nos sobrenadantes de células mononucleares estimuladas com extrato dentinário humano total, o nível de IL-6 detectado por ELISA foi semelhante, com exceção de três valores isolados que se apresentaram elevados.

Estimulados com as frações, foram detectados níveis mais altos de IL-6 sendo que o do grupo com reabsorção inflamatória ativa foi estatisticamente maior que os demais quando estimulada pela fração de MM aproximada de 82/78kDa (FIGURA 15, *, **).

FIGURA 15 - IL-6 em sobrenadantes de cultura celular de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles detectados por ELISA. A barra representa a mediana do grupo e cada ponto representa a concentração em pg/mL de IL-6 detectada nos sobrenadantes de cultura celular provenientes de pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa (n=9), controles (n=8) e pacientes com reabsorção radicular por substituição (n=3) estimulados com extrato dentinário dentinário ou suas frações. Leitura a 450nm e concentrações obtidas a partir da equação resultante da curva padrão. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle* e aos pacientes com reabsorção inflamatória** pelo teste *t-Student*

4.15 TGF- β em sobrenadantes de cultura de células mononucleares provenientes de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles

O resultado do nível de TGF β detectado por ELISA foi semelhante em sobrenadantes de células dos pacientes com reabsorção radicular e indivíduos saudáveis mantidas em cultura e estimuladas com extrato dentinário humano total ou suas frações (FIGURA 16), não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

FIGURA 16 - TGF β em sobrenadantes de cultura celular de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles detectados por ELISA. A barra representa a mediana do grupo e cada ponto representa a concentração em pg/mL de TGF β detectada nos sobrenadantes de cultura celular provenientes de pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa (n=9), controles (n=8) e pacientes com reabsorção radicular por substituição (n=3) estimulados com extrato dentinário humano ou suas frações. Leitura a 450nm e concentrações obtidas a partir da equação resultante da curva padrão

4.16 TNF- α em sobrenadantes de cultura de células mononucleares provenientes de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles

A FIGURA 17 mostra que o nível de TNF α foi menor nos sobrenadantes de cultura de células estimuladas com extrato dentinário humano total nos diferentes grupos estudados.

O grupo com reabsorção por substituição, quando estimulado com extrato dentinário humano ou a fração de aproximadamente 82/78kDa, liberou estatisticamente menos TNF α que o grupo controle e com o estímulo da fração de MM aproximada de 55kDa, estatisticamente menos que os pacientes com reabsorção inflamatória ativa (FIGURA 17, *, **). Este grupo liberou estatisticamente mais TNF α que o grupo controle apenas quando estimulado pela fração com aproximadamente 82/78kDa (FIGURA 17, *).

FIGURA 17 - TNF α em sobrenadantes de cultura celular de pacientes apresentando reabsorção radicular e controles detectados por ELISA. A barra representa a mediana do grupo e cada ponto representa a concentração em pg/mL de TNF α detectada nos sobrenadantes de cultura celular provenientes de pacientes com reabsorção radicular inflamatória apical ativa (n=9), controles (n=8) e pacientes com reabsorção radicular por substituição (n=3) estimulados com extrato dentinário humano ou suas frações. Leitura a 450nm e concentrações obtidas a partir da equação resultante da curva padrão. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle* e aos pacientes com reabsorção inflamatória** pelo Teste *t-Student*

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Da concepção do trabalho

Este trabalho foi concebido e acalentado há pelo menos 17 anos a partir de inquietações e reflexões como: por que não se realizam transplantes e reimplantes dentários como dos demais órgãos e tecidos¹⁸? No homem, os transplantes, uma realidade, possibilitam o prolongamento e a melhor qualidade de vida das pessoas comprometidas com doenças nos rins, coração, fígado, pâncreas, medula óssea, etc. Se há dificuldades em se obter sucesso, por que os estudos não avançam para tentar saná-las como tem ocorrido nas demais especialidades com controle da imunorrejeição por drogas com efeitos colaterais cada vez menores? E os traumatismos dentários, por que os prognósticos são tão desfavoráveis? Todas as respostas convergem para reabsorção dentária¹⁸.

Na imunorrejeição, há mediação por células frente aos aloantígenos presentes nos órgãos e tecidos transplantados pelos mecanismos de citotoxicidade mediada por células e anticorpos e também pela hipersensibilidade tardia. Seria a reabsorção dentária um mecanismo de rejeição aos transplantes e reimplantes? Se ela é um fenômeno limitante, se não a tivéssemos, os transplantes e reimplantes resultariam em sucesso¹⁸?

A leitura inicial dos trabalhos de KING; COURTS^{46, 47} permitiu vislumbrar e questionar o possível envolvimento imunopatológico nas reabsorções dentárias. O passo seguinte foi o aprofundamento no estudo das respostas auto-imunes ao espermatozóide e cristalino, considerados antígenos seqüestrados capazes de induzir respostas citotóxicas quando liberados, de forma análoga ao suposto papel da dentina. A análise minuciosa e criteriosa da odontogênese demonstrou o posicionamento sempre “escondido” da dentina desde o início de sua formação. Para o isolamento da dentina, contribui a deposição do cemento intermediário pelas células da bainha de Hertwig antes de sua fragmentação e precedente à diferenciação das células foliculares em cementoblastos. A pesquisa das particularidades da camada de odontoblastos revelou a

importância da presença das junções celulares que conferem um papel isolante, mas permitem a passagem de íons e pequenas moléculas no lado interno da dentina¹⁹. Esta camada se compara a um “epitélio”.

Como pode ser observado, o que foi vislumbrado como uma possibilidade, aos poucos foi se construindo e delineando através de um raciocínio em que os conhecimentos e pesquisa básicos tiveram papel preponderante para a fundamentação de uma hipótese, cujo resultado terá um valor clínico incomensurável.

Outras perspectivas inquietavam e poderiam mudar a face da Odontologia: haveria um modo mais refinado e precoce de diagnosticar a reabsorção dentária em comparação com a radiografia? Seria possível desenvolver um conjunto comercial (*kit*) para diagnóstico sorológico da reabsorção, de manipulação no próprio consultório odontológico¹⁸? Estas reflexões contagiaram e induziram ao desenvolvimento da metodologia experimental para comprovação da hipótese de que a dentina tem um potencial imunogênico e que na etiopatogenia das reabsorções dentárias ocorrem fenômenos de natureza imunopatológica.

5.2 Da metodologia

O questionamento inicial quanto à metodologia se referiu à escolha de um modelo experimental clínico ou laboratorial. Não se encontrou trabalho algum na literatura com estudos clínicos sobre os aspectos almejados, plenamente justificados pela bioética vigente. Optamos pelo estudo tradicionalmente indicado nos manuais de imunologia: inocular o suposto antígeno em animais, obter soros imunes a serem confrontados com os respectivos pré-imunes e, se houvesse a produção de anticorpos, identificar frente a quais frações do antígeno.

Para obtenção do extrato dentinário humano, dentre as diversas metodologias descritas na literatura, escolheu-se aquela descrita por WHEELER; STROUP¹⁰² introduzindo pequenas modificações, por ser baseada na que foi primeiramente descrita por BUTLER⁷. Este autor, pioneiro no isolamento e caracterização de proteínas dentinárias, indicava a utilização de um

forte agente de dissociação – guanidina HCl/EDTA – capaz de recolher grandes quantidades de material mesmo daqueles já submetidos a outras metodologias⁶⁶. Além disso, WHEELER; STROUP¹⁰² utilizaram o extrato obtido para imunização de camundongos e ratos, de forma similar que a nossa sequência de trabalho. Amostras das etapas intermediárias do processo de obtenção do extrato dentinário (pó de dentina e precipitado resultante do material dialisado) foram testadas para detectar possíveis perdas de material com potencial imunogênico.

Uma dificuldade encontrada foi o baixo rendimento da obtenção de proteínas. A partir de 76 molares humanos, conseguiu-se uma concentração de aproximadamente 483mg de proteína. Utilizaram-se dentes com ápices fechados, mas de pessoas com diferentes idades, dada a necessidade de muitos espécimes com a característica de estarem íntegros.

A análise do extrato dentinário humano foi feita a partir de eletroforese de gel de poliacrilamida em gradiente 8-16% que foi o que melhor separou os fragmentos com MM que variavam desde >170 até <6kDa (FIGURA 3). A coloração pela prata utilizada apresenta maior sensibilidade (ng) que *Coomassie blue* (µg). Foi tentado utilizar nitrato de prata combinado com *Stains all*, conforme recomendado por GOLDBERG; WARNER³¹ para aumentar a sensibilidade de detecção de proteínas ácidas e estabilidade das bandas à incidência de luz sem, contudo, obter melhores resultados.

Dentre os animais passíveis de serem imunizados com o extrato dentinário humano, escolheu-se o coelho por possuir maior quantidade de sangue circulante do qual se extrairia o soro imune que ratos, hamsters ou camundongos. A origem dos animais pôde ser controlada de forma mais adequada e o manuseio facilitado em comparação com cães, outra opção que foi descartada.

A produção de anticorpos pelos coelhos foi verificada através de *Dot blotting* (FIGURA 4), IDR (FIGURA 5) e ELISA (FIGURA 6), gradualmente mais sensíveis e a última de maior custo. O estudo das frações imunogênicas a partir do extrato dentinário humano foi desenvolvido utilizando-se o método de *Western blotting* (FIGURA 7 e TABELA 3), específico para proteínas e com membranas PVDF, de qualidade superior que as de nitrocelulose.

A partir da constatação de que a reabsorção radicular inflamatória apical é um problema comum, mas ocasionalmente crítico entre os pacientes ortodônticos nos quais as forças de compressão mecânica do periodonto levam a reabsorções dentárias localizadas do cimento que expõe a dentina à atividade reabsortiva, foi escolhido um grupo de pacientes apresentando reabsorção radicular inflamatória apical. Estes estariam em processo ativo de reabsorção radicular com agente causal único, diferentemente daquelas reabsorções ocasionadas por infecção pulpar ou traumatismo, por exemplo, onde estariam presentes outras variáveis. Um grupo com reabsorção por substituição foi também analisado, ambos para correlacionar o potencial imunogênico da dentina com reabsorção dentária.

Através de *Western blotting*, foram analisadas as frações do extrato dentinário humano reconhecidas pelos soros dos diferentes grupos (FIGURAS 8 e 9).

Para purificação das frações do extrato dentinário humano, as metodologias encontradas na literatura descreviam colunas de *Sephadex* ou *Sephadex*, mas optamos pelo HPLC (FIGURA 10). Dada a sensibilidade do aparelho, tal escolha possibilitou a separação mesmo com pequenas concentrações de amostra e a utilização dos subprodutos coletados, ainda com atividade biológica, nos experimentos seguintes. Por outro lado, trouxe a dificuldade adicional de se estabelecer um protocolo de trabalho já que não havia precedentes com a utilização de extrato dentinário, mas que foi suplantado com o apoio da equipe técnica do fabricante que se disponibilizou tanto no Brasil como nos Estados Unidos. Apesar da necessidade de fracionamentos repetidos para a obtenção de quantidade e concentração suficientes para os experimentos seguintes, sempre se coletou o mesmo subproduto no mesmo tubo, tendo em vista o desvio-padrão de 0,36% obtido entre os cromatogramas, segundo certificado de repetibilidade e reprodutibilidade oferecido pela estação de trabalho *Star*.

Obtidas as frações do extrato dentinário humano, fez-se a análise da resposta humoral através da detecção de anticorpos séricos IgG e IgM ao extrato dentinário ou suas frações por meio de ELISA (FIGURAS 11, 12 e TABELA 3). A utilização de placas de poliestireno tratadas para maior adesão do antígeno, contribuiu para o melhor desempenho da metodologia adotada. A resposta celular foi estudada através dos modelos clássicos de ensaios de proliferação

linfoblástica com estímulo do extrato dentinário humano ou suas frações e de mitógenos (FIGURA 13).

Para investigar a presença de citocinas nos soros (TABELA 4) e sobrenadantes (FIGURAS 14, 15, 16 e 17) das culturas celulares foram utilizados conjuntos comerciais de alta sensibilidade, com detecção na ordem de picogramas por mL o que seria inviável através de ELISA convencional, além de apresentarem margens de erros muito maiores nas diversas etapas da realização dos experimentos. Selecionaram-se sobrenadantes de cultura celular estimulados com as duas frações reconhecidas de forma estatisticamente diferentes por pacientes com reabsorção radicular e controles, com o extrato dentinário humano e os soros de todos os grupos estudados dada a limitação do número de orifícios disponíveis nos conjuntos comerciais.

Como se observa, buscou-se sempre a diminuição da possibilidade de erros, o desenvolvimento do trabalho mesmo com concentrações muito pequenas de antígenos e detecção de quantidades ínfimas da substância procurada, o que confere maior credibilidade aos resultados obtidos. Porém, isto representa altos custos somente viabilizados pelo financiamento oferecido pela FAPESP (processo no. 98/11690-6).

A metodologia utilizada para dentina requeria parâmetros comparativos que foram resgatados na literatura ou obtidos experimentalmente com os controles sem reabsorção dentária. Quando não havia similar com a própria dentina, o osso foi considerado referencial comparativo.

5.3 Dos resultados

A análise do perfil eletroforético do extrato dentinário humano obtido e corado pela prata mostrou ser composto por 15 fragmentos representados por bandas de diferentes intensidades e MM (FIGURA 3). O perfil se parece muito com aquele apresentado por FUJISAWA et al.²⁸ do extrato dentinário bovino, no qual identificava a fração de 44kDa como OS e a de 16kDa como BGP. CHANG; CHIEGO JUNIOR; CLARKSON¹⁵ encontraram uma banda com MM de 140kDa e três outras respectivamente com 60, 50 e 34kDa em corrida eletroforética de gel de

poliacrilamida 7,5% com SDS, que acreditaram ser subunidades da grande, proteína intacta de 140kDa, a DPP humana. Nesse sentido, TAKAGI; VEIS⁸⁹ discutiram que o aparecimento de bandas difusas poderia refletir a degradação da fosfoforina humana *in situ* e que não era possível distinguir entre a degradação *in vivo* e aquela que acontecia antes da remoção da fosfoforina da matriz dentinária. Segundo FUJISAWA; KUBOKI²⁷, o nível de DPP aumenta com a maturação da dentina e MC CURDY; CARKSON; FEAGIN⁶⁶ mostraram diferenças qualitativas entre a DPP obtida a partir do extrato de dentina madura e imatura. Assim como pode ter ocorrido uma degradação protéica durante o processo de extração e purificação, não deve ser descartada a possibilidade de ocorrência de uma reação diagenética espontânea, a racemização do ácido aspártico presente na DPP que ocorreria ao longo de décadas sob ação da temperatura corporal nos mamíferos. MASTERS⁶⁴ e CHANG; CHIEGO JUNIOR; CLARKSON¹⁵ foram incapazes de isolar a DPP intacta da dentina madura, apesar de surpresos por encontrar uma inesperada banda de aproximadamente 140kDa levemente corada no gel. Eles, como nós, utilizaram dentes com ápices fechados, mas de pessoas com diferentes idades, dada a necessidade de muitos espécimes pelo baixo rendimento apresentado em mg de proteínas.

Pelo processo utilizado, o extrato dentinário estava constituído pelas NCPs; a maior parte do colágeno existente abundantemente na dentina foi descartado no precipitado da primeira centrifugação. Não foram realizados testes para detecção de colágeno residual na amostra.

A resposta dos coelhos frente ao extrato dentinário humano nos induz a inferir que a dentina apresenta potencial imunogênico, sendo reconhecida pelo sistema imunológico. Por meio de *Dot blotting* (FIGURA 4) demonstrou-se que o extrato dentinário humano apresenta imunogenicidade, com a indução da produção de anticorpos, de forma semelhante ao descrito por KARDOS; HESLOP⁴⁵ ainda nos idos de 1975. Pela análise dos soros imunes por IDRD (FIGURA 5), além da positividade da reação foi possível verificar a presença de mais de um componente antigênico. Por ser esta uma metodologia menos sensível, alguns soros não evidenciaram linhas de precipitação. Os resultados de ELISA (FIGURA 6) demonstraram, de forma clara, a produção de IgG antiextrato dentinário humano subsequente à imunização, corroborados pelos dados apresentados por WHEELER; STROUP¹⁰² que também encontraram as maiores titulações de anticorpos produzidos após sete a oito semanas do início das imunizações,

apesar de algumas diferenças entre ambos os esquemas adotados. Ainda, nossos resultados mostraram que tanto o precipitado resultante do material dialisado como o pó de dentina humana, mantêm a capacidade de induzir resposta imunológica humoral, ainda que em graus proporcionalmente menores e, como verificado pelos dados fornecidos pelo coelho imunizado apenas com o adjuvante, não ocorre reação cruzada entre este e os componentes de extrato dentinário humano³⁸.

Outros autores^{46, 47, 72} encontraram um declínio no título de anticorpos séricos contra antígeno dentinário em cães, humanos e camundongos com reabsorção radicular ativa. Comentaram que esta diminuição era reversível, retornando a níveis anteriores após remoção das raízes reabsorvidas. Isto não foi observado em nosso estudo, já que dois dos pacientes com reabsorção radicular por substituição extraíram os remanescentes dentários por ocasião da segunda coleta de sangue e não apresentaram resultados compatíveis com esta afirmação.

A resposta encontrada nos soros imunes, não permitia especificar se era ao extrato dentinário humano como um todo ou a alguns de seus componentes. Fazia-se importante conhecer o extrato dentinário quanto a individualidade de cada um de seus componentes. Os soros imunes de coelho, quando analisados por *Western blotting*, demonstraram reconhecimento de pelo menos 12 frações presentes no extrato dentinário, enquanto os respectivos soros pré-imunes não reconheceram ou o fizeram em uma pequena concentração (FIGURA 7). Em concordância com o anterior resultado de ELISA, foi observado que os animais imunizados com o precipitado resultante do material dialisado e com o pó de dentina, apresentaram um número gradativamente menor de frações reconhecidas (TABELA 2). Verificou-se que a maioria das frações apresentava potencial imunogênico tendo em vista que somente as frações com MM aproximada de 78, 40, 36 e 29kDa, detectadas por eletroforese em gel de poliacrilamida no extrato dentinário, não apresentaram imunogenicidade. O aparecimento de bandas não visualizadas pela coloração com a prata pode ser devido à sua baixa concentração, já que a sensibilidade descrita por SASSE; GALLAGHER⁸⁰ era de 2 a 5ng proteína/banda ou ao fato de serem proteínas ácidas que não possuem poder de resolução em gel de poliacrilamida com esta coloração³¹. No entanto, como dito anteriormente, não obtivemos êxito ao combinar *Stains all* com a coloração de nitrato de prata.

Era de se esperar que os coelhos imunizados apresentassem a produção de anticorpos frente ao extrato dentinário humano e reconhecimento de algumas de suas frações. Mas, haveria correlação com pacientes apresentando reabsorção dentária? Esses pacientes poderiam apresentar alguns fatores séricos ou celulares relacionados com alguns dos componentes do extrato dentinário? Ao estudar o reconhecimento das frações pelos soros, buscou-se encontrar um diferencial entre pacientes e indivíduos saudáveis sem reabsorção radicular. Nesse sentido, UGAR-DILEK-AYNUR; KARACA-INCI⁹⁷ mostraram que a osteonectina está associada ao osso e dentina, mas uma fração neosintetizada é liberada na circulação podendo ser um importante marcador da remodelação óssea em pacientes e controles.

A análise do reconhecimento das frações do extrato dentinário humano pelos soros de pacientes apresentando reabsorção radicular inflamatória e indivíduos saudáveis (FIGURAS 8 e 9), mostrou que a maioria deste reconhecimento ocorreu de forma estatisticamente semelhante, porém, cinco bandas foram reconhecidas de forma estatisticamente diferente³⁸. As frações reconhecidas na mesma intensidade por indivíduos saudáveis e pacientes, não teriam significado para o estudo da etiopatogenia das reabsorções dentárias e sua presença poderia ser explicada pela rede idiotípica, conforme a teoria do network⁴⁹ e/ou pelas reações cruzadas já descritas de proteínas ósseas com antifosforina⁷⁰; α_2 HS-GP com antiOPN⁶⁸ ou antiDSP¹⁴.

Para explicar o reconhecimento do extrato dentinário humano pelos soros dos indivíduos saudáveis, deve-se lembrar ainda que o osso está continuamente em neoformação e reabsorção. Assim, continuamente, proteínas da matriz óssea com capacidade imunogênica estimulam a resposta imunológica. Há, inclusive, inferências que atribuem ao turnover ósseo, características de um processo biológico em que está envolvida a auto-imunidade¹⁸. Outra explicação para esta resposta em indivíduos saudáveis pode ser encontrada na frequência em que as reabsorções dentárias são encontradas nos humanos. Ela é variável e alguns levantamentos relatam ter encontrado reabsorções dentárias em 100% dos casos⁶³. Este índice levaria a constantes, mas curtos momentos de indução imunogênica que explicariam esta imunorreatividade detectada.

Comparando com os resultados dos soros imunes de coelho, nove frações com MM aproximadas de 135, 110, 78, 55, 36, 30, 29, 18 e <6kDa foram reconhecidas pelos soros humanos e digno de menção, a presença de uma banda visualizada no perfil eletroforético e que

não foi reconhecida, nem pelos animais imunizados nem pelos grupos humanos estudados, como antigênica (aproximadamente 40kDa). Totalizando, a quantidade de frações do extrato dentinário humano obtido se torna semelhante àquela descrita por JONES; LEAVER⁴², como sendo de mais de 20 entidades distintas os componentes da matriz não colagênica da dentina revelada por eletroforese de gel.

Dentre as frações reconhecidas de forma estatisticamente significativas, o interesse recai sobre aquela de 55kDa que não foi reconhecida como antigênica pelo grupo controle e sim por aqueles apresentando reabsorção (33,3%+ e 16,6%+++, FIGURA 9). É o seu reconhecimento pelos pacientes que desencadearia a reabsorção dentária ou a sua ausência que protegeria os controles? E o inverso aconteceria com a fração de 78kDa que é reconhecida com maior frequência pelos soros de indivíduos saudáveis³⁸?

Para fracionar o extrato dentinário humano e desenvolver ensaios com as frações purificadas ou semipurificadas, a amostra foi submetida a HPLC. O cromatograma obtido (FIGURA 10) através da injeção em coluna de exclusão *Hydropore SEC* foi bastante semelhante ao mostrado por JONES; LEAVER⁴² em DEAE-celulose e MC CURDY; CARKSON; FEAGIN⁶⁶ em *DEAE-Sepharose*. Apesar da resolução dos picos não estar ideal, o cromatograma foi suficiente para nos basearmos na coleta dos subprodutos e correlacioná-los aos tempos de retenção dos padrões com MM conhecidas³⁹.

Dentre as frações obtidas e coletadas por HPLC, foram selecionadas aquelas apresentando MM aproximadas de 170, 62, 55 e 32,5kDa pois provavelmente trata-se da DPP humana intacta e suas três subunidades¹⁵. Esta inferência, quanto à identificação nominal da proteína ou fração dentinária humana isolada baseada na MM, pode ser feita para facilitar a compreensão etiopatogênica, mas tem limitações, pois não foram desenvolvidos a análise e o sequenciamento de seus componentes. Exceto a DPP citada e a BMP presentes na dentina⁶, não há caracterização das demais NCPs em humanos e seria prematuro nominá-las com base em MM encontradas em outros modelos animais. De acordo com LEAVER; THOMAS; HOLBROOK⁵³ devem ser referidas como frações.

Outro critério de seleção foi que as frações com MM aproximadas de 78 (não foi possível tecnicamente dissociá-la daquela de 82 por apresentarem tempos de retenção muito próximos), 55 e 44kDa foram reconhecidas de forma diferente por pacientes com reabsorção radicular e controles enquanto as de 62 e 32,5kDa, de forma semelhante nos ensaios *Western blotting*.

Estudaram-se as reações induzidas pelo extrato dentinário humano ou suas frações com relação à resposta imunológica humoral e celular. Como a reabsorção tem dois modelos biológicos de mecanismos de ocorrência, procurou-se obter ou detectar respostas a componentes específicos dentro do próprio grupo de reabsorções dentárias, dividindo-as em inflamatória e por substituição.

Em pacientes com reabsorção, parece-nos possível traçar um perfil sorológico próprio e possivelmente identificador do processo. A IgG sérica encontrada, frente ao extrato dentinário humano total sem fracionamento, foi sempre maior para os grupos de pacientes apresentando reabsorção radicular, seja ela inflamatória ou por substituição, em comparação aos indivíduos saudáveis sem reabsorção, porém, só com alta concentração de antígeno (10µg/pocinho) é que essa diferença se mostrou estatisticamente significativa (FIGURA 11). De forma similar, os anticorpos séricos às frações específicas foi significativamente maior nos pacientes com reabsorção radicular quando comparados aos controles, com exceção da resposta frente à fração de aproximadamente 44kDa (FIGURA 12). Uma concentração próxima de 2µg/pocinho de cada fração antigênica foi suficiente para demonstrar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos³⁹.

Os níveis de IgG específicos presentes nos soros dos pacientes com reabsorção por substituição foram estatisticamente maiores que aqueles detectados nos pacientes com reabsorção inflamatória ativa para as frações com MM aproximada de 170, 55 e 32,5kDa. As reabsorções dentárias inflamatórias ocorrem em planos de superfície; as reabsorções dentárias por substituição ocorrem em áreas irregulares, tortuosas que multiplicam a interface de contato do tecido dentinário com as células relacionadas à resposta imunológica e osteoclasia. Logo, as reações presuntivamente são mais exacerbadas.

A IgM representa os anticorpos das respostas imunológicas primárias. Pode-se constatar que a quantidade de IgM antifrações encontrada no grupo de pacientes apresentando reabsorção radicular inflamatória, como também verificado frente ao extrato dentinário humano total, foi maior ou igual ao do grupo de indivíduos sem reabsorção (FIGURA 11 e 12). Isto indica precocidade do processo biológico de curta duração, como se caracteriza a reabsorção dentária inflamatória induzida por aparelhos ortodônticos.

Nos pacientes com reabsorção por substituição, os níveis de IgM foram menores que nos demais grupos estudados, ainda que sem diferença estatisticamente significativa frente ao extrato dentinário humano total e com diferença estatisticamente significativa para as frações com MM aproximada de 82/78 e 62kDa. A reabsorção por substituição representa um processo contínuo e de longa duração; as respostas imunológicas depois do período inicial são notoriamente secundárias e mediadas por IgG³⁹.

Dentre as respostas às frações analisadas, pode-se notar ainda que a IgG detectada frente à fração de MM aproximada de 170kDa nos pacientes com reabsorção radicular (FIGURA 12) é praticamente a metade daquela frente à de MM aproximada de 82/78kDa, demonstrando heterogeneidade na imunogenicidade das frações. Observar ainda, que de modo geral, a leitura dos ensaios para detecção de IgG apresentaram valores menores que os de IgM.

O estudo dos níveis de IgG em função do tempo, com intervalo de um ano, no momento da análise da resposta imunológica celular *in vitro* demonstrou que os níveis de anticorpos permaneceram praticamente os mesmos, com um pequeno incremento para o grupo controle e uma diminuição para os grupos apresentando reabsorção radicular (TABELA 3). Isso se justifica pelo tempo a mais decorrido desde o final do estímulo reabsortivo nos casos de reabsorção por substituição e por variações no estímulo empregado durante o tratamento ortodôntico em curso nos casos de reabsorção inflamatória.

Considerando que a resposta imunológica humoral é dependente de linfócitos T, o nível elevado de IgG ao extrato dentinário humano em pacientes com reabsorção dentária deveria correlacionar com um concomitante aumento na resposta linfoproliferativa. Os resultados obtidos não demonstraram aumento no índice de estimulação de células provenientes de pacientes em

relação aos controles (FIGURA 13). Esta falta de correlação pode ocorrer pelo desenvolvimento de clones de linfócitos denominados Th2 que ativam preferencialmente a resposta imunológica humoral em detrimento da resposta celular ou ainda devido à presença de linfócitos supressores. Os resultados da resposta linfoproliferativa às frações demonstraram diminuição estatisticamente significativa frente às frações de MM aproximada de 170, 44 e 32,5kDa com células de pacientes com reabsorção, concordando com a segunda hipótese de supressão celular específica. No entanto, não se pode descartar que também ocorra o desenvolvimento de clones de linfócitos Th2, principalmente no grupo de reabsorção radicular por substituição. Outra possibilidade seria a atuação das células NK. Elas podem agir diretamente, de forma inespecífica pelo contato com a membrana, ou em um processo específico conhecido como citotoxicidade mediada por células e dependente de anticorpos.

Como esperado, o índice de proliferação celular foi maior com o extrato dentinário humano em relação às frações. Isto porque vários antígenos estão presentes no extrato total, com possibilidade de um maior número de linfócitos responderem. Mas, observado o somatório dos índices de todas as frações, o resultado de proliferação celular com o extrato dentinário deveria ser ainda maior. O resultado obtido pode ser devido à presença de epítomos em comum, compatível com a dissociação de moléculas maiores em frações de MM menor, como já mencionado para o fosforina¹⁵ e pela participação de frações supressoras como a de MM aproximada de 44kDa.

Na resposta linfoproliferativa à mitógenos como a ConA ou a PHA não foi observada alteração (FIGURA 13), demonstrando que o estado de imunodepressão da resposta imunológica celular específica ao extrato dentinário e suas frações não afeta os receptores para os estímulos mitogênicos.

Considerando o reconhecimento de forma estatisticamente diferente entre pacientes e controles frente à fração de MM aproximada de 55kDa por *Western blotting* e o nível sérico estatisticamente elevado de IgG antifração ~55kDa em pacientes com reabsorção radicular em relação aos controles por ELISA, seria esperado que o índice de proliferação da cultura de linfócitos estimulados com a referida fração fosse elevado. No entanto, esta foi similar ao

controle. Este resultado pode ser decorrente do desenvolvimento dos já citados linfócitos Th2, que levariam a diminuição da resposta imunológica celular.

Ao estar imunodeprimida a resposta celular, entende-se os baixos níveis de anticorpos IgG verificados na resposta humoral frente às frações do extrato dentinário humano, uma vez que sua produção é dependente de linfócitos T. KING; COURTS^{46, 47, 72} comentaram sobre um possível efeito supressor dos linfócitos T resultando em baixos títulos de anticorpos. No último trabalho do grupo de SHONFELD a respeito da imunogenicidade do esmalte⁸³, foi mostrado que a resposta proliferativa frente ao extrato de proteínas do esmalte não ocorria em linhagens atímicas ou quando se usava anti-Thy-1, demonstrando que a resposta auto-imune seria T-dependente. Também relacionado, SCHLÜTER et al.⁸¹ apresentaram uma resposta imunológica celular diminuída enquanto a humoral parecia estar menos afetada em pacientes sofrendo de osteomielite crônica pós-traumática. A IgM encontrada em nossos experimentos, sempre em níveis semelhantes, seria proveniente da ativação de linfócitos B independentes da cooperação dos linfócitos T.

Ao interpretar os eventos imunopatológicos nas reabsorções dentárias, deve-se ressaltar que os antígenos seqüestrados, além de “escondidos” na dentina, estão incorporados em uma matriz mineralizada diminuindo sua disponibilidade de exposição aos componentes da resposta imunológica. Isso reduz a sua capacidade indutora direta. A resposta imunológica tem como objetivo essencial eliminar o agressor e como nas reabsorções dentárias, remover da dentina as proteínas estranhas. Para isso, requer-se a mobilização de células clásticas e blásticas envolvidas nos processos reabsortivos e esses fenômenos devem ser mediados por citocinas, fatores de crescimento ou outros mediadores celulares no contexto da resposta imunopatológica representada pela reabsorção dentária.

O nível das citocinas relacionadas com a reabsorção radicular em soros dos diferentes grupos estudados apresentou-se dentro dos padrões considerados de normalidade pelo fabricante, demonstrando a característica local dos mediadores da patogênese da reabsorção dentária. Única exceção pontual foi o valor de 9,5pg/mL de IL-1 α encontrado em um soro de paciente com reabsorção por substituição (TABELA 4).

Nos sobrenadantes dos ensaios de linfoproliferação, observou-se que o extrato dentinário humano se comparado às suas frações, estimulou mais a liberação de IL-1 α , de forma análoga IL-1 β e TGF β , e menos IL-6 e TNF α (FIGURAS 14, 15, 16 e 17). Esta particularidade quanto à presença de antígenos seqüestrados na dentina representa uma característica inerente à própria dentina e provavelmente gera fenômenos em diferentes níveis ou especificamente voltados para este tipo de resposta, que podem não ser detectáveis pela metodologia clássica de avaliação como a utilizada neste trabalho.

A capacidade do extrato dentinário humano e suas frações de induzirem a liberação das citocinas relacionadas com a reabsorção dentária nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares obtidos de pacientes com os dois tipos de reabsorção seguiu padrões que confirmam os diferentes mecanismos de ocorrência. As células dos pacientes com reabsorção inflamatória apical ativa liberaram maior ou igual concentração de todas as citocinas relacionadas com a reabsorção dentária frente a todos os estímulos antigênicos analisados em comparação aos controles. Isto demonstra sua capacidade, em plena fase ativa, da indução dos mediadores locais da reabsorção. Por sua vez, as células dos pacientes com reabsorção por substituição, não apresentavam a mesma capacidade, liberando menor ou igual concentração de todas as citocinas relacionadas com a reabsorção dentária frente a todos os estímulos antigênicos analisados.

A fração de aproximadamente 55kDa não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, quanto à indução de liberação de citocinas pelas células estimuladas, com exceção do TNF α pelos pacientes com reabsorção por substituição que foi menor que aqueles com reabsorção inflamatória. Já com a fração de aproximadamente 82/78kDa houve diferenças estatísticas entre os grupos com relação às citocinas IL-1 α e β , IL-6 e TNF β liberadas pelos sobrenadantes de cultura celular. TAKATA et al.⁹⁰ demonstraram que o extrato dentinário foi capaz de suprimir a proliferação de linhagem celular osteoblastos-*like* de camundongos de modo dose-dependente e causando alterações morfológicas que incluíam a conversão de células cuboidais em fusiformes. Como os estudos de MC CAULEY et al.⁶⁵ indicaram que a presença de TGF β influenciava as células de modo semelhante, TAKATA et al.⁹⁰ determinaram sua presença e atividade, encontrando resultados positivos diferentemente dos nossos.

As citocinas analisadas, em especial a IL-1 α , IL-6 e TNF α , além de relacionadas com a reabsorção dentária poderiam afetar a resposta linfoproliferativa. Mas, a proliferação dos linfócitos com extrato dentinário humano ou com a fração de MM aproximada de 82/78kDa foi similar, mesmo com os níveis diferentes detectados para estas citocinas, sugerindo a participação de outro(s) fator(es) envolvido(s) nesta regulação. Como a atuação das citocinas requerem a ligação das mesmas aos receptores específicos, estes poderiam estar bloqueados ou as células alvo não os estar expressando, ou ainda as proteínas ligantes destas citocinas (receptores solúveis) estarem presentes nos sobrenadantes de cultura mantendo-os complexados. Neste caso, as proteínas ligantes poderiam ser produzidas pelas células em cultura ou já estarem presentes nos extratos dentinários humanos.

Em suma, os resultados reforçam a seguinte hipótese para a etiopatogenia das reabsorções dentárias:

5.4 Aplicações clínico-terapêuticas e perspectivas

Nossos resultados permitem aumentar os conhecimentos do processo de reabsorção dentária. Sabendo que a dentina contém frações que atuam como antígenos sequestrados deve-se evitar a sua exposição, conscientes de prevenir situações de vida e de conduta clínica que impliquem em manipular superfícies desnecessariamente como nas cirurgias bucomaxilofaciais e nos reimplantes dentários, evoluindo nas técnicas de reimplante intencional, de cirurgias periodontais e paraendodônticas, da movimentação dentária induzida e da clareação dentária interna. Deve-se zelar pela junção esmalte-cimento onde a dentina pode estar desprotegida de cobertura⁷¹, em especial nos jovens, nos quais o epitélio juncional se adere ao esmalte e as fibras do ligamento periodontal se inserem cobrindo a região da junção esmalte-cimento. O desencadeamento de uma resposta inflamatória pode desorganizar a ECM e as fibras do ligamento, expondo dentina nos *gaps*, provocando uma reabsorção cervical externa.

Além deste conhecimento *per se*, a partir dele, há possibilidade de desenvolvimento tecnológico para a criação de mecanismos de diagnósticos precoces e precisos da reabsorção em pacientes que sofreram traumatismos, tratamento ortodôntico e clareação dentária. O diagnóstico bioquímico da reabsorção dentária e a sua identificação em estádios anteriores à visualização imagenológica como a radiográfica permitirá a pronta intervenção e terapêutica, prevenindo danos maiores e até a perda do dente, resultando em uma odontologia mais eficaz e benéfica ao paciente. Por exemplo, imaginemos: após três semanas de ativação do aparelho ortodôntico poder-se-ia realizar um exame sorológico para verificar o nível de IgG e IgM frente ao extrato dentinário humano ou suas frações. O perfil de anticorpos obtido orientaria a manutenção de forças utilizadas ou sua modificação, evitando o surgimento das reabsorções dentárias radiculares.

Os conhecimentos obtidos geram novas perspectivas de trabalhos não só na busca do diagnóstico precoce e prevenção, mas também na cura o que possibilitaria transplantes e reimplantes definitivos, reimplantes intencionais viáveis, traumatismos sem perda dentária e movimentos dentários seguros.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados obtidos e considerando as limitações inerentes a qualquer metodologia, pôde-se verificar que:

1. o extrato dentinário humano obtido apresenta 15 frações de massas moleculares distintas (6 a 170 kDa) que interagem com a prata;
2. o extrato dentinário humano apresenta capacidade de reagir com os anticorpos e de induzir resposta imunológica;
3. a imunogenicidade pode ser observada no extrato dentinário humano, no precipitado resultante do material dialisado e no pó de dentina, porém em graus variados;
4. a antigenicidade do extrato dentinário humano foi detectada pelos soros imunes de coelho utilizando *Dot blotting*, IDR, ELISA ou *Western blotting*, sendo os últimos os mais sensíveis;
5. coelhos imunizados com extrato dentinário humano podem produzir anticorpos a, pelo menos, 12 frações antigênicas com massas moleculares variando de 6 a >170kDa;
6. as frações reconhecidas pelos soros de pacientes apresentando reabsorção radicular inflamatória apical ativa e indivíduos saudáveis apresentaram, em sua maioria, distribuição semelhante mas existem seis delas que foram reconhecidas de forma estatisticamente diferente;
7. o extrato dentinário humano pode ser fracionado por HPLC e os subprodutos coletados por intervalo de tempo;
8. existe IgG antiextrato dentinário humano e antifrações em quantidades maiores nos soros de pacientes com reabsorção radicular do que em controles;

-
9. para as frações de MM aproximada de 170, 55 e 32,5kDa, os níveis de IgG reativas nos soros de pacientes com reabsorção por substituição foram estatisticamente maiores que aqueles detectados em pacientes com reabsorção inflamatória;
  10. existe IgM antiextrato dentinário humano e antifrações nos soros de pacientes com reabsorção inflamatória em quantidade maior ou igual aos demais grupos estudados;
  11. para as frações de aproximadamente 82 e 62kDa, a quantidade de IgM reativa nos soros de pacientes com reabsorção por substituição foi estatisticamente menor ou igual aos demais grupos estudados;
  12. há heterogeneidade na imunogenicidade das frações do extrato dentinário humano;
  13. os índices de linfoproliferação frente ao extrato dentinário humano e suas frações foram menores em pacientes com reabsorção que em indivíduos saudáveis, além de serem mais baixos que aqueles obtidos pelo estímulo com mitógenos;
  14. os níveis séricos das citocinas relacionadas com a reabsorção dentária estavam normais nos pacientes com reabsorção e controles saudáveis, sem reabsorção;
  15. as citocinas relacionadas com a reabsorção foram liberadas nos sobrenadantes de culturas celulares sendo a IL-1 α em maior quantidade quando estimulada pelo extrato dentinário humano do que pelas suas frações, a IL-1 β e o TGF β em quantidades similares e a IL-6 e o TNF α em menores quantidades;
  16. o extrato dentinário humano e suas frações apresentaram capacidade de induzir as células dos pacientes com reabsorção inflamatória apical ativa a liberarem maior ou igual concentração de todas as citocinas relacionadas com a reabsorção dentária frente a todos os estímulos antigênicos analisados em comparação aos controles enquanto as células dos pacientes com reabsorção por substituição, a maioria dos quais já havia extraído o remanescente dentário, não apresentaram a mesma capacidade.

A partir dos resultados e interagindo-os com conhecimentos anteriores da literatura, pode-se afirmar que:

1. a dentina não é reconhecida como própria pelo sistema imunológico;
2. em pacientes com reabsorção radicular, é possível traçar um perfil sorológico próprio e possivelmente identificador do processo;
3. o perfil sérico de IgG e IgM reativas ao extrato dentinário humano e suas frações permite identificar especificidades dentro do próprio grupo de reabsorções dentárias, dividindo-as em inflamatória e por substituição;
4. o perfil de liberação de citocinas relacionadas com a reabsorção radicular em culturas celulares estimuladas com o extrato dentinário humano e suas frações permite identificar os grupos com reabsorções dentárias inflamatória e por substituição.

E, por fim, pode-se concluir que:

A dentina apresenta imunogenicidade e o perfil sorológico dos pacientes com reabsorção dentária pode ser identificado por análise bioquímica sangüínea. O seu delineamento preciso pode levar ao diagnóstico precoce da reabsorção dentária antes que radiograficamente se manifeste ou seja diagnosticada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 ALBRIGHT, F.; ASH, J.C.; BAUER, W. Hyperparathyroidism: common and polymorphic conditions as illustrated by seventeen proved cases from one clinic. **Jour. Am. Med. Assn.**, v.102, p.1276, 1934 apud KRONFELD, R.; BOYLE, P.E.⁴⁸ p.40.
- 2 ANDREASEN, J.O.; ANDREASEN, F.M. Root resorption following traumatic dental injuries. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, v.88, p.95-114, 1992. Suppl. 1.
- 3 ARANA-CHAVEZ, V.E. Odontogênese. **Revista da APCD**, v.51, n.4, p.361-6, jul./ago. 1997.
- 4 BANG, G. Induction of heterotopic bone formation by demineralized dentin in guinea pigs: antigenicity of the dentin matrix. **J. Oral Pathol.**, v.1, p.172-85, 1972.
- 5 BÈGUE-KIRN, C. et al. Comparative analysis of mouse DSP and DPP expression in odontoblasts, preameloblasts, and experimentally induced odontoblast-like cells. **Eur. J. Oral Sci.**, v.106, p.254-9, Jan. 1998. Suppl. 1.
- 6 BESSHO, K. et al. Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. **J. Dent. Res.**, v.70, n.3, p.171-5, Mar. 1991.
- 7 BUTLER, W.T. Dentin-specific proteins. **Methods Enzymol.**, v.145, p.290-303, 1987.
- 8 BUTLER, W.T. Sialoproteins of bone and dentin. **J. Biol. Buccale**, v.19, p.83-9, 1991.
- 9 BUTLER, W.T. Dentin extracellular matrix and dentinogenesis. **Oper. Dent.**, v.17, p.18-23, 1992. Suppl.5.
- 10 BUTLER, W.T. Dentin matrix proteins. **Eur. J. Oral Sci.**, v.106, p.204-10, Jan. 1998. Suppl. 1.

---

* Normas recomendadas para uso no âmbito da Universidade de São Paulo, com base no documento "Referências Bibliográficas: exemplos", emanado pelo Conselho Supervisor do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, em reunião de 20 de setembro de 1990

-
- 11 BUTLER, W.T.; RITCHIE, H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. **Int. J. Dev. Biol.**, v.39, p.169-79, 1995.
  - 12 BUTLER, W.T. et al. Noncollagenous proteins of dentin. Isolation and partial characterization of rat dentin proteins and proteoglycans using a three-step preparative method. **Coll. Relat. Res.**, v.1, n.2, p.187-99, Feb. 1981.
  - 13 BUTLER, W.T. et al. Multiple forms of rat dentin phosphoprotein. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.225, n. 1, p.178-86, 1983.
  - 14 BUTLER, W.T. et al. Isolation, characterization and immunolocalization of a 53-kDal dentin sialoprotein (DSP). **Matrix**, v.12, p.343-51, 1992.
  - 15 CHANG, S.R.; CHIEGO JUNIOR, D.; CLARKSON, B.H. Characterization and identification of a human dentin phosphoryn. **Calcif. Tissue Int.**, v.59, n.3, p.149-53, Sept. 1996.
  - 16 CLARKSON, B.H.; CHANG, S.R.; HOLLAND, G.R. Phosphoprotein analysis of sequential extracts of human dentin and the determination of the subsequent remineralization potential of these dentin matrices. **Caries Res.**, v.32, n.5, p.357-64, Sept./Oct. 1998.
  - 17 COBURN, R.J.; HENRIQUES, B.L. Immunological considerations in experimental tooth transplantation. **J. Dent. Res.**, v.43, n.5, p.895, May 1964. / Abstract n.358 /
  - 18 CONSOLARO, A. **Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas**. Maringá, Dental Press. 2001. / no prelo /
  - 19 CORMACK, D.H. Tecido epitelial. In: _____ **Ham histologia**. 9.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p.111-24.
  - 20 CORRAL, D. et al. Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.95, n.23, p.13835-40, Nov. 1998.

-
- 21 D'SOUZA, R.N. et al. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. **J. Bone Miner. Res.**, v.12, n.12, p.2040-9, Dec. 1997.
- 22 DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v.289, n. 5484, p.15001-4, Sept. 2000.
- 23 DUCY, P. et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. **Cell**, v.100, n.2, p.197-207, Jan. 2000.
- 24 FISH, E.W. **An experimental investigation of enamel, dentine and the dental pulp.** London, John Bale, sons and Danielsson, 1932 apud KRONFELD, R.; BOYLE, P.E. ⁴⁸ p.39.
- 25 FISHER, L.W. et al. Matrix sialoprotein of developing bone. **J. Biol. Chem.**, v.258, n.20, p. 12723-7, Oct. 1983.
- 26 FISHER, L.W. et al. Human bone sialoprotein. **J. Biol. Chem.**, v.265, n.4, p.2347-51, Feb. 1990.
- 27 FUJISAWA, R.; KUBOKI, Y. Changes in levels of osteonectin in bovine dentine during tooth development. **Arch. Oral Biol.**, v.34, p.89-92, 1989.
- 28 FUJISAWA, R. et al. Differences in composition of cell-attachment sialoproteins between dentin and bone. **J. Dent. Res.**, v.72, n.8, p.1222-6, Aug. 1993.
- 29 GEORGE, A. et al. A characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. **J. Biol. Chem.**, v.268, n.17, p.12624-30, June, 1993.
- 30 GIES, W.J. Studies of internal secretions in their relation to the development and condition of the teeth. **Jour. Nat. Dent. Assn.** apud KRONFELD, R.; BOYLE, P.E. ⁴⁸ p.39.
- 31 GOLDBERG, H.A.; WARNER, K.J. The staining of acidic proteins on polyacrylamide gels: enhanced sensitivity and stability of "stains all" staining in combination with silver nitrate. **Anal. Biochem.**, v.251, n.2, p.227-33, Sept. 1997.

-
- 32 GORSKI, J.P.; SHIMIZU, K. Isolation of new phosphorylated glycoprotein from mineralized phase of bone that exhibits limited homology to adhesive protein osteopontin. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n.31, p.15938-45, Nov. 1988.
- 33 GU, K. et al. Molecular cloning of a human dentin sialophosphoprotein gene. **Eur. J. Oral Sci.**, v.108, n.1, p.35-42, Feb. 2000.
- 34 HALEY, E.W.; COSTICH, E.R. Lymph node response to allografts of tooth. **J. Dent. Res.**, v.46, n.3, p.628, May/June 1967.
- 35 HATTON, E.H. Jaw bones of gastrectomized dogs. **Jour. Am. College of Dentists**, v.5, p.77, 1938 apud KRONFELD, R.; BOYLE, P.E. ⁴⁸ p.40.
- 36 HAUSCHKA, P.V.; LIAN, J.B.; GALLOP, P.M. Direct identification of the calcium binding amino acid- γ -carboxyglutamate in mineralized tissue. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.72, n.10, p.3925-9, Oct. 1975.
- 37 HERRING, G.M. The organic matrix of bone. In: BOURNE, G.H., ed. **The biochemistry and physiology of bone**. v.I, New York, Academic Press, 1972. P.127-89 apud BUTLER, W.T. Matrix macromolecules of bone and dentin. **Coll. Relat. Res.**, v.4, p.297-307, 1984. p.302.
- 38 HIDALGO, M.M.; ITANO, E.N.; CONSOLARO, A. Recognition of human dentin extract fractions by sera of immunized rabbit and patients showing radicular resorption. **J. Dent. Res.**, v.80, n.4, p.1035, Apr. 2001. / Abstract n.291 /
- 39 HIDALGO, M.M. et al. Purificação dos antígenos dentinários e reatividade a soros de pacientes com reabsorção. **Pesq. odont. bras.**, v.15, p.85, set. 2001. Supl. / Abstract n.A-118 /
- 40 HOLLAND, P.W.H. et al. In vivo expression of mRNA for the Ca^{++} -binding protein SPARC (osteonectin) revealed by in situ hybridization. **J. Cell. Biol.**, v.105, p.473-82, 1987.

-
- 41 HOPEWELL-SMITH, A. The process of osteolysis and odontolysis, or so called "absorption" of calcified tissues: a new original investigation. **Dental Cosmos**, v.72, n.10, p.1036-48, Oct. 1930.
- 42 JONES, I.L.; LEAVER, A.G. Studies on the minor components of the organic matrix of human dentine. **Arch. Oral Biol.**, v.19, n.5, p.371-80, May 1974.
- 43 JONES, S.J.; BOYDE, A. The resorption of dentine and cementum in vivo and in vitro. In: DAVIDOVITCH, Z., ed. **The biological mechanisms of tooth eruption and root resorption**. Birmingham, EBSCO Media, 1988. p.335-54.
- 44 KANNARI, N. et al. Class II MHC antigen-expressing cells in the pulp of human deciduous teeth prior to shedding. **Arch. Histol. Cytol.**, v.61, n.1., p.1-15, Jan. 1998.
- 45 KARDOS, T.B.; HESLOP, B.F. The immunogenicity of tooth allografts in rats. **Transplantation**, v.20, n.5, p.381-4, 1975.
- 46 KING, G.; COURTS, F. Changes in the titer of root antibodies accompanying traumatic root resorption. In: DAVIDOVITCH, Z., ed. **The biological mechanisms of tooth eruption and root resorption**. Birmingham, EBSCO Media, 1988. p.365-70.
- 47 KING, G.; COURTS, F. Humoral immune response to active root resorption. In: NORTON, L.A.; BURSTONE, C.J. **The biology of tooth movement**. Boca Raton, CRC, 1989. p.276-85.
- 48 KRONFELD, R.; BOYLE, P.E. **Histopatologia dos dentes**. 3.ed. Rio de Janeiro, Científica, 1955.
- 49 KUBY, J. **Immunology**. New York, W.H.Freeman, 1997.
- 50 KUROYANAGI, K. Experimental transplantation immunity by tooth. I. Antigenicity of tooth and findings of migration inhibition test. **Bull. Tokyo Dent. Coll.**, v.12, n.4, p.191-203, Nov. 1972.

-
- 51 LADO, E.A.; STANLEY, H.R.; WEISMAN, M.I. Cervical resorption in bleached teeth. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.55, n.1, p.78-80, Jan. 1983.
- 52 LARA, V.S. **O potencial inflamatório dos constituintes dentários humanos: esmalte e dentina. Uma correlação com a reabsorção dentária.** Ribeirão Preto, 1997. 162p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Orientador: Dr. Florêncio Figueiredo.
- 53 LEAVER, A.G.; THOMAS, M.; HOLBROOK, I.B. Glycoproteins of human dentine. **Calcif. Tissue Int.**, v.22, p.347-9, 1997. Suppl. 1.
- 54 LINDE, A. Noncollagenous proteins and proteoglycans in dentinogenesis. In: _____. **Dentin and dentinogenesis.** Boca Raton, CRC, 1984. p.55-91.
- 55 LINDE, A. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. **Anat. Rec.**, v.224, n.2, p.154-66, June 1989.
- 56 LINDSKOG, S.; HAMMARSTRÖM, L. Formation of intermediate cementum III: ^3H -tryptophan and ^3H -proline uptake into the epithelial root sheath of Hertwig in vitro. **J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.**, v.2, p.171-7, 1982.
- 57 LINDSKOG, S.; BLOMLÖF, L.; HAMMARSTRÖM, L. Comparative effects of parathyroid hormone on osteoblasts and cementoblasts. **J. Clin. Periodontol.**, v.14, n.7, p.386-9, Aug. 1987.
- 58 LOURENÇO, S.Q.C. **Apoptose na odontogênese durante a fragmentação da lâmina dentária e da bainha epitelial de Hertwig e no epitélio reduzido do órgão do esmalte.** Bauru, 1997. 133p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Orientador: Dr. Alberto Consolaro.
- 59 MAC DOUGALL, M.; ZEICHNER-DAVID, M.; SLAVKIN, H.C. Production and characterization of antibodies against murine dentin phosphoprotein. **Biochem. J.**, v.232, p.493-500, 1985.

-
- 60 MAC DOUGALL, M. et al. Identification of a novel isoform of mouse dentin matrix protein 1: spatial expression in mineralized tissues. **J. Bone Miner. Res.**, v.13, n.3, p.422-31, Mar. 1998.
- 61 MANOLAGAS, S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocr. Rev.**, v.21, n.2, p.115-37, Apr. 2000.
- 62 MARK, M.P. et al. Developmental expression of 44-kDa bone phosphoprotein (osteopontin) and bone gamma-carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein (osteocalcin) in calcifying tissues of rat. **Differentiation**, v.37, p.123-36, 1988.
- 63 MASSLER, M.; MALONE, A.J. Root resorption in human permanent teeth. **Am. J. Orthod.**, v.40, p.619-33, 1954.
- 64 MASTERS, P.M. Stereochemically altered noncollagenous protein from human dentin. **Calcif. Tissue Int.**, v.35, n.1/4, p.496-501. Jan./Apr. 1983.
- 65 MC CAULEY, L.K. et al. Effects of differentiation and transforming growth factor beta 1 on PTH/PTHrP receptor mRNA levels in MC3T3-E1 cells. **J. Bone Miner. Res.**, v.10, p.1243-55, 1995.
- 66 MC CURDY, S.P.; CARKSON, B.H.; FEAGIN, F.F. Comparison of phosphoprotein isolated from mature and immature human tooth roots. **Arch. Oral Biol.**, v.37, n.12, p.1057-65, Dec. 1992.
- 67 MINCER, H.H.; JENNINGS, B.R. Morphologic and immunologic studies of subcutaneous incisor allografts in mice. **J. Dent. Res.**, v.49, n.2, p.381-8, Mar./Apr. 1970.
- 68 MIZUNO, M. et al. Identification of the rat bone 60K acidic glycoprotein as α 2HS-glycoprotein. **Bone Min.**, v.13, p.1-21, 1991.
- 69 MIZUTANI, H. et al. A study of the bone morphogenetic protein derived from bovine demineralized dentin matrix. **Nagoya J. Med. Sci.**, v. 59, n.1-2, p.37-47, Mar. 1996.

-
- 70 NAKAMA, T. et al. A monoclonal antibody against dentin phosphophoryn recognizes a bone protein(s) appearing at the beginning of ossification. **Calcif. Tissue Int.**, v.43, p.263-7, 1988.
- 71 NEUVALD, L.; CONSOLARO, A. Cementoenamel junction: microscopic analysis and external cervical resorption. **J. Endod.**, v.26, n.9, p.503-8, Sept. 2000.
- 72 NG, K.T.; KING, G.J.; COURTS, F.J. Humoral immune response to active root resorption with a murine model. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v.98, n.5, p.456-62, Nov. 1990.
- 73 NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G.; ZAMBON, J.J. Peridontal disease. In: NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G., ed. **Oral microbiology and immunology**. 2.ed. Philadelphia, W.B.Saunders, 1994. p.360-84.
- 74 PRICE, P.A.; WILLIAMSON, M.K. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. **J. Biol. Chem.**, v.260, n.28, p.14971-5, Dec. 1985.
- 75 RABINOWITZ, T.; SYFTESTAD, G.T.; CAPLAN, A.I. Chondrogenic stimulation of embryonic chick limb mesenchymal cells by factors in bovine and human dentine extracts. **Arch. Oral Biol.**, v.35, n.1, p.49-54, Jan. 1990.
- 76 RITCHIE, H.H. et al. Dentin sialoprotein (DSP) transcripts: developmentally-sustained expression in odontoblasts and transient expression in pre-ameloblasts. **Eur. J. Oral Sci.**, v.105, n. 5-I, p.405-13, Oct. 1997.
- 77 RIVIERE, G.R.; HANSEN, R.W. Alloantibodies induced in histoincompatible rats by single pulp and tooth grafts. **J. Dent. Res.**, v.52, n.6, p.1186-8, Nov./Dec. 1973.
- 78 RODAN, G.A.; MARTIN, T.J. Role of the osteoblasts in hormonal control of bone resorption – a hypothesis. **Calcif. Tissue Res.**, v.33, p.349-51, 1981.
- 79 ROTSTEIN, I.; LEHR, Z.; GEDALIA, I. Effect of bleaching agents on inorganic components of human dentin and cementum. **J. Endod.**, v.18, n.6, p.290-3, June. 1992.

-
- 80 SASSE, J.; GALLAGHER, S.R. Detection of proteins. In: COLIGAN, J.E. et al., ed. **Current protocols in Immunology**. New York, John Wiley, 1991. p.8.9.1-8.
- 81 SCHLÜTER, B. et al. Impairment of specific host defense mechanisms in patients with chronic post traumatic osteomyelitis. **Trauma**, v.31, p.68-73, 1991.
- 82 SCHONFELD, S.E. Demonstration of an alloimmune response to embryonic enamel matrix proteins. **J. Dent. Res.**, v.54, p. C72-77, 1975. Special Issue C.
- 83 SCHONFELD, S.E.; HERLES, S. In vitro and in vivo autoimmune response to enamel matrix proteins. **Immunology**, v.41, n. 2, p.475-81, Oct. 1980.
- 84 SCHWARTZ, O. Cell-mediated and humoral alloimmune reactions after subperiosteal implantation of allogenic demineralized dentin in humans. **Int. J. Oral Surg.**, v.12, n.2, p.95-105, 1983.
- 85 SENGER, D.R.; WIRT, D.F.; HYNES, R.O. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. **Cell**, v.16, n.4, p.885-93, Apr. 1979.
- 86 SLAVKIN, H.C. Towards a cellular and molecular understanding of periodontics. Cementogenesis revisited. **J. Periodontol.**, v.47, n.5, p.249-55, May 1976.
- 87 STETLER-STEVENSON, W.G.; VEIS, A. Bovine dentin phosphophoryn: composition and molecular weight. **Biochemistry**, v.22, n.18, p.4326-35, 1983.
- 88 SUN, Z.L. et al. Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by a new cell line from dental papillae, MDPC-23. **Connect. Tissue Res.**, v.37, n.3/4, p.251-61, 1998.
- 89 TAKAGI, Y.; VEIS, A. Isolation of phosphophoryn from human dentin organic matrix. **Calcif. Tissue Int.**, v.36, n.1, p.259-65, Jan. 1984.
- 90 TAKATA, T. et al. Protein extracts of dentin affect proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in vitro. **J. Periodontol.**, v.69, n.11, p.1247-55, Nov. 1998.

-
- 91 TAUBMAN, M.A. Immunological aspects of periodontal diseases. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M.A. **Contemporary oral microbiology and immunology**. Saint Louis, Mosby, 1992. p.542-54.
- 92 TEN CATE, A.R. **Oral histology: development, structure, and function**. 4.ed. Saint Louis, Mosby, 1994.
- 93 THOTAKURA, S.R. et al. The non-collagenous dentin matrix proteins are involved in dentinogenesis imperfecta type II (DGI-II). **J. Dent. Res.**, v.79, n.3, p.835-9, Mar. 2000.
- 94 TOMAZELA-HERNDL, S.A.; ARANA-CHAVEZ, V.E. Ultrastructure of early mineral deposition during hyaline layer formation in rat molars. **Arch. Oral Biol.**, v.46, n.4, p.305-11, Apr. 2001.
- 95 TROPE, M. Cervical root resorption. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.128, p.56S-59S, Apr. 1997. Special Suppl.
- 96 TZIAFAS, D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentigerous during dental pulp repair. **Int. J. Dev. Biol.**, v.39, n.1, p.281-90, Feb. 1995.
- 97 UGAR-DILEK-AYNUR; KARACA-INCI. Serum osteocalcin as a biochemical bone formation marker. **Biochem. Arch.**, v.15, n.4, p.379-82, Nov. 1999.
- 98 URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v.150, n.3698, p.893-9, July 1965.
- 99 URIST, M.R.; STRATES, B.S. Bone morphogenetic protein. **J. Dent. Res.**, v.50, p.1392-406, Nov./Dec. 1971. Suppl.
- 100 VEIS, A.; SCHLUETER, R.J. The macromolecular organization of dentine matrix collagen. I. Characterization of dentine collagen. **Biochemistry**, v.3, n.11, p.1650-6, Nov. 1964.
- 101 WEDENBERG, C. Evidence for a dentin-derived inhibitor of macrophage spreading. **Scand. J. Dent. Res.**, v.95, n.5, p.381-8, Oct. 1987.

- 102 WHELER, T.T.; STROUP, S.E. Traumatic root resorption in dentine-immunized mice. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v.104, n.4, p.352-7, Apr. 1993.
- 103 WHITE, E.; ROGERS, T.E. Effects of primary allogeneic tooth transplants on rejection of skin allografts in rabbits. **J. Dent. Res.**, v.46, n.3, p.565-70, May/June 1967.

ABSTRACT

STUDY ON THE IMMUNOGENICAL DENTIN POTENTIAL

Contribution for the etiopathogenesis of dental resorption

ABSTRACT

The dental resorptions are inflammatory and/or substitutive and represent the principal phenomenon that prevents the success of transplants and dental reimplants from happening. Its occurrence can be a consequence of traumatism, periapical disease and induced dental movements. During the odontogenesis the dentin is always "hidden" from immune system and later protected by the enamel, cement and cementoblasts on the external side and, by the odontoblasts layer on the internal side. Two non-colagenical proteins phosphophorin and dentinal sialoprotein are specific of dentin. It was constructed the following hypothesis: the dentin, as a "hidden" antigen, can induce auto-immune phenomena and participate in the etiopathogenesis of the dental resorptions. Starting from extracted human teeth, we obtained a human dentinal extract inoculated into rabbits to obtain the immune sera. The human dentinal extract was able to react with the antibodies and to induce immune response in the rabbit. It was selected 12 patients with radicular inflammatory active apical resorption, 12 healthy individuals without signs of radicular resorptions evidences, and 4 patients with substitutive radicular resorption. Western blotting analysis showed that most of the fractions of the human dentinal extract were recognized by patients with resorption and controls in a similar way. Nevertheless, six of the fractions studied were not recognized as autologous by the immunological system of the patients. With the use of HPLC the human dentinal extract was fractioned and the subproducts collected by time interval. Results of ELISA demonstrated that the sera of patients with dental resorption presented larger amounts of IgG anti-total human dentinal extract and anti-fractions than control individuals, allowing a characterization of the sorological profile of the process. IgM anti-total human dentinal extract and anti-fractions in serum of patients with inflammatory resorption are in larger or equal amounts as the other studied groups. The seric profile of IgG and IgM allows to identify specificities inside of its own group of dental resorptions, dividing them into inflammatory and by substitution. There is an heterogenecity in the imunogenicity of the fractions of the dentinal extract. The cell cultures of patients with resorption had a smaller proliferation index than the controls when stimulated with total dentin extract or their fractions, but normal when stimulated

with mitogens. The total human dentinal extract and its fractions presented capacity to induce a larger or equal concentration release of all the cytokines related to resorption in comparison to the controls without it. This was not observed with patients with dental substitution resorption, allowing the characterization of the groups with inflammatory and substitutive dental resorption. The obtained results reinforces an hypothesis that the dentin presents immunogenicity and the serological profile of patients with dental resorption can be identified by blood biochemical analysis. Its precise screening can lead us to early diagnosis of dental resorption before it appears clinically and radiographically.

GLOSSÁRIO

GLOSSÁRIO

Adjuvante – substância que aumenta, de forma inespecífica, a resposta imunológica frente a um antígeno. Ex. alumínio; LPS bacteriano; adjuvante de Freund que pode ser completo, com adição de forma atenuada de *Mycobacterium bovis*; ou incompleto, sem este componente.

Alogênico – referente a membros da mesma espécie, mas que diferem geneticamente.

Aloantígeno – antígeno expressado no órgão ou tecido transplantado entre membros da mesma espécie, mas que diferem geneticamente.

Anergia clonal – mecanismo no qual os linfócitos auto-reativos periféricos se mantêm inativos.

Anti-idiotípico – referente aos anticorpos capazes de reconhecer os idiotipos.

Apoptose – mudanças morfológicas associadas com a morte celular geneticamente programada que incluem a fragmentação nuclear e liberação dos corpos apoptóticos que são fagocitados, sem resultar em danos às células circunvizinhas.

Auto-imunidade – uma resposta imunológica anormal contra antígenos próprios.

Autólogo – derivado do mesmo indivíduo.

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) – técnica analítica usada para separar componentes de uma mistura, ajudando na identificação e quantificação dos mesmos. Baseia-se na partição do soluto entre as fases estacionária (em nosso caso, de exclusão por tamanho molecular) e móvel (em nosso caso, solvente líquido).

Desmossoma – constitui parte do complexo juncional e neste tipo de junção, os tonofilamentos estão ancorados em uma placa de adesão composta de material eletrondenso de cada lado da área justaposta da membrana celular de modo que as forças elásticas transmitidas sejam distribuídas de uma célula para a seguinte. Ao longo da linha média da lacuna intercelular é encontrada uma

linha eletrondensa relativamente larga (30nm) de glicoproteína que representa porções interconectantes de elementos filamentosos denominados ligantes transmembrana, que se dispõem de forma a resistir à separação celular. Encontra-se situada abaixo das *zonulas occludens* e *adherens*.

Dot blotting – ensaio no qual o antígeno é colocado em quantidades mínimas em um ponto da membrana de nitrocelulose, sobre ele o soro com possíveis anticorpos e a interação Ag-Ac será detectada pela adição de um correspondente anticorpo secundário ligado à enzima e o substrato da mesma.

Eletroforese – aplicação de corrente elétrica do polo positivo para o negativo que permite a discriminação dos componentes de uma mistura de antígenos colocada no gel que se deslocarão com maior ou menor rapidez dependendo de sua massa molecular. A eletroforese com a utilização de SDS é conhecida como SDS-PAGE.

Ensaio imunoenzimático (ELISA) – o antígeno é adsorvido à placa de fundo plano e o soro que supostamente contém anticorpos específicos ao antígeno da reação é adicionado. Colocam-se anticorpos anti-IgG procurados ligados a uma enzima, de maneira que, ao ser acrescentado o substrato da enzima à reação, é gerado um produto colorido que pode ser medido por espectrofotometria.

Ensaio de proliferação linfoblástica – os linfócitos para cultura celular são isolados diretamente do sangue e podem ser mantidos em um meio quimicamente denominado como basal (contendo sal, açúcares, aminoácidos, vitaminas, traços de elementos e outros nutrientes) até aquele em que vários suplementos séricos são adicionados. Como requer 10 a 100 vezes menos linfócitos que uma técnica típica *in vivo*, permite análise de suas capacidades e propriedades funcionais frente à estímulos antigênicos e mitogênicos, assim como pode ser utilizada para identificar numerosas citocinas envolvidas na resposta imunológica.

Heterólogo – originário de espécies diferentes.

Idiotípica – determinantes antigênicos presentes na região variável das Igs dos linfócitos B e/ou receptores dos Ags dos linfócitos T.

Imunodifusão radial dupla (IDRD - Ouchterlony) – o antígeno e o anticorpo são colocados em dois pontos diferentes de uma camada de gel e um se difundirá contra o outro, formando um precipitado no local da reação Ag-Ac. A velocidade de difusão é dependente do peso molecular, ou seja, do coeficiente de difusão do Ac e do Ag.

Junção tipo *gap* ou *nexo* – são como passagens intercomunicantes que ligam diretamente os interiores de células contíguas. Em cada membrana celular, as partículas de proteínas apresentam-se como anéis de subunidades que envolvem uma metade do canal central e uma pequena torção das subunidades pode abrir ou fechar o seu lume.

Mitógeno – qualquer substância que inespecificamente induza a síntese de DNA e a divisão celular, especialmente de linfócitos.

Moléculas MHC classe II – proteínas heterodiméricas de membrana codificadas pelo Complexo de Histocompatibilidade Principal expressas pelas células apresentadoras de antígenos cuja função é apresentar o antígeno para os linfócitos T auxiliares (CD4+ ou *helper*). Nos humanos, são nominadas DP, DQ e DR.

Resposta imunológica celular – defesa do hospedeiro mediada por linfócitos T antígeno-específicos e várias células inespecíficas do sistema imunológico.

Resposta imunológica humoral – defesa do hospedeiro mediada por anticorpos presentes no plasma, linfa e fluidos tissulares.

SDS – agente de dissociação utilizado no gel de poliacrilamida para eletroforese.

Tampão de amostra – tampão no qual será diluída a amostra a ser submetida a uma eletroforese e que contém, entre outros elementos, agentes redutores como β -mercaptoetanol.

Teoria do network – Proposta por Niel Jerne, em 1973, conferiu-lhe o Prêmio Nobel de 1984. Uma ou várias redes de reconhecimento idiotipo/anti-idiotipo dependentes que interconectam as distintas subpopulações de linfócitos (T e B).

Título – se refere à última diluição de um soro capaz de resultar em efeitos detectáveis ou mensuráveis em um ensaio.

Xenogênico – denota indivíduos de diferentes espécies.

Western blotting – o antígeno formado por uma mistura de proteínas é eletroforeticamente separado em um gel de poliacrilamida na presença de SDS. As bandas protéicas obtidas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF por eletroforese. O soro teste contendo os possíveis anticorpos são acrescentados e as interações Ag-Ac serão detectadas pela adição do correspondente anticorpo secundário ligado a enzima e substrato da mesma.

Zonula adherens - constitui parte do complexo juncional e estende-se por todo o perímetro, estando situada próximo à borda luminal da célula, logo abaixo da *zonula occludens*. É um sítio principal onde microfilamentos citoplasmáticos contendo actina estão ancorados na membrana citoplasmática. Apresenta uma lacuna intercelular comparativamente larga (20nm) que é preenchida por material filamentoso fino de eletrondensidade moderadamente baixa e de composição indeterminada.

Zonula occludens - constitui parte do complexo juncional. As margens laterais das células contíguas fundem-se ao longo de um sistema de saliências estreitas e longas de superfície, estendendo-se ao redor de todo o perímetro muito próximo à superfície luminal e mantendo uma vedação eficaz. As proteínas das duas membranas celulares justapostas estabelecem contato mútuo e se encaixam como dentes de um zíper.