

Imunodeteção de marcadores envolvidos no processo de reabsorção dentinária em resposta a lipopolissacarídeo bacteriano e ácido lipoteicoico em ratos wistar.

Eveline De Bona Johann¹, Andréa Fredrich, Eraldo Luiz Batista Júnior¹ (orientador)

¹ Faculdade de Odontologia, PUCRS

Resumo

Introdução

A estrutura dentária é alvo de bactérias intra-orais que iniciam o processo cariioso através da desmineralização do esmalte dentário. Os microorganismos atingem o complexo dentino-pulpar e liberam seus subprodutos chegando até a polpa, estimulando os odontoblastos a desenvolverem respostas imune/inflamatórias a estes estímulos (1). As células imunes estão presentes tanto em polpa sadia quanto inflamada, e podem contribuir no processo de resolução da inflamação pulpar (5, 6, 7, 8). O complexo dentino-pulpar reconhece antígenos bacterianos através de imunoglobulinas presentes no fluido dentinário, de odontoblastos, neuropeptídeos inflamatórios, células dendríticas, “natural killers”, células T, citocinas e quimiocinas (4). O ligante do receptor NFκB (RANKL) e as citocinas pró-inflamatórias possuem papel importante na osteoclastogênese de doenças periodontais (9,11). Numa desordem de homeostase tecidual os linfócitos T ativados produzem RANKL, levando à indução da osteoclastogênese (10). A reabsorção dentária interna permanece como um mistério na Endodontia, onde autores preconizam trauma prévio (12, 13, 14, 15) ou sendo decorrente de resposta inflamatória crônica. Como os odontoblastos são as primeiras células em contato com produtos bacterianos (1, 2, 3), sugere-se que os mesmos têm papel importante na expressão de sinais bioquímicos, capazes de desencadear uma resposta protetora por parte dos tecidos pulpare, através de citocinas e outros produtos celulares. Não há relatos sobre os efeitos destes componentes diretamente sobre a expressão e modulação destes mecanismos que levam a ativação e diferenciação de odontoblastos (16). O presente projeto busca compreender melhor os mecanismos de ativação de processos de reabsorção da dentina

mediados por células odontoblásticas, caracterizando o papel das mesmas na modulação reabsortiva.

Metodologia

A amostra contempla um total de 18 ratos Wistar machos serão utilizados: 6 controles (solução salina estéril), e 12 experimentais (6 recebendo lipopolissacarídeo bacteriano e 6 recebendo ácido lipoteicóico). Os procedimentos experimentais serão realizados sob anestesia com mistura de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), administrada por via intraperitoneal. Após anestesia, serão realizados preparos cavitários pelo mesmo operador para exposição pulpar na face oclusal do primeiro molar inferior esquerdo com broca carbide esférica ¼ a 1.500 rpm em motor elétrico de baixa rotação sob irrigação (BLM 600, Driller, São Paulo, SP, Brasil). Os preparos terão como referência de profundidade para a exposição pulpar a parte ativa da broca (uma vez e meia). Durante o procedimento, será feita irrigação com soro fisiológico e aspiração com a finalidade de remover raspas dentinárias produzidas e evitar aquecimento excessivo da polpa. O LPS e LTAC serão aplicados com *pellet*, ambos na concentração de 1 mg/ml, diluídos em solução salina estéril, diretamente nas cavidades, que serão seladas com amálgama de prata. Ao final dos procedimentos, os animais passarão por um período de recuperação no laboratório (24 h), onde serão observados em relação a qualquer alteração comportamental antes de retornarem ao vivário. Após 72 horas os animais serão submetidos à eutanásia, através de indução por anestesia profunda com isoflurano e as mandíbulas serão removidas e fixadas em formalina tamponada 4% por 48 horas. As peças serão a seguir descalcificadas em EDTA 15% pH 7.5 por 30 dias e processadas para inclusão em parafina. Secções seriadas de 5 µm serão cortadas e montadas em lâminas sialinizadas; após desparafinização as mesmas serão submetidas a bloqueio de peroxidase endógena (H₂O₂) e incubadas com soro normal para reduzir o background. A seguir, as lâminas serão incubadas com anticorpos primários para detecção de RANK, RANKL, CCL5 e CCR5 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) por 12 horas a 4°C e após a remoção do excedente de anticorpos não ligados, as secções serão incubadas com anticorpos secundários conjugados com biotina. Após nova lavagem com tampão para remoção de anticorpos secundários não ligados, as secções serão incubadas com streptavidina conjugada com peroxidase e a seguir com substrato colorimétrico diaminobenzidina (DAB). As lâminas serão contra-coradas com hematoxilina e analisadas sob microscopia de luz para estudo quantitativo da presença de células inflamatórias na região do conjuntivo gengival em microcampos num total de 1 mm² sob a região da perfuração. Além disso, serão rastreadas células positivas para os marcadores

de interesse em toda a extensão da polpa. A presença de lacunas de reabsorção presentes na dentina adjacente à polpa serão também quantificadas, bem como a presença de células multinucleadas. As imagens serão capturadas e analisadas através de software apropriado (ImagePro® 8, Media Cybernetics). Os resultados obtidos serão analisados por meio de estatística descritiva das variáveis e serão apresentados sob a forma de tabelas e gráficos. Os dados referentes ao número de células positivas para cada marcador e número de lacunas de reabsorção serão analisados pelo teste paramétrico ANOVA (one-way), seguido de Post-hoc Bonferroni ou não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido de Post-hoc de Dunn, a depender dos resultados da análise de distribuição gerada pelo teste de Shapiro-Wilke. Os dados serão analisados através de software (GraphPad 5 for Mac Stat Pack) e diferenças consideradas significantes se $P < 0.05$.

Referências Bibliográficas

1. Farges JC, Keller JF, Carrouel F, Durand SH, Romeas A, Bleicher F, Lebecque S, Staquet MJ. Odontoblasts in the Dental Pulp Immune Response. **J Exp Zool (Mol Dev Evol)** 312B:425–436;2009.
2. Durand SH, Flacher V, Romeas A, Carrouel F, Colomb E, Vincent C, Magloire H, Couble M-L, Bleicher F, Staquet M-J, Lebecque S, Farges J-C. Lipoteichoic acid increases TLR, functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. **J Immunol** 176:2880–2887;2006.
3. Veerayutthwilai O, Byers MR, Pham TT, Darveau RP, Dale BA. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. **Oral Microbiol Immunol** 22:5–13;2007.
4. Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. **J Endod** 33(6):643–651;2007.
5. Jontell M, Gunraj MN, Bergenholtz G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. **J Dent Res** 66:1149–1153;1987.
6. Jontell M, Bergenholtz G, Scheynius A, Ambrose W. Dendritic cells and macrophages expressing class II antigens in the normal rat incisor pulp. **J Dent Res** 67:1263–1266;1988.
7. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. **Crit Rev Oral Biol Med** 9:179–200;1998.
8. Nishikawa S, Sasaki F. Apoptosis of dental pulp cells and their elimination by macrophages and MHC class II-expressing dendritic cells. **J Histochem Cytochem** 47:303–311;1999.
9. Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. **Endocrinol** 142:1419–1426;2001.
10. Wysga N, Varghese S, Wikel S. *et al*. Effects of activated T cells on osteoclastogenesis depend on how they are activated. **Bone** 35(3):614–620;2004.
11. Chu CQ, Field M, Allard S, Abney E, Feldmann M, Maini RN. Detection of cytokines at the cartilage/pannus junction in patients with rheumatoid arthritis: implications for the role of cytokines in cartilage destruction and repair. **Br J Rheumatol** 31:653–661;1992.
12. Hasselgren G, Strömberg T. Histochemical demonstration of acid hydrolase activity in internal dentinal resorption. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 42(3):381–385;1976.
13. Barker BC, Lockett BC. Histology of external and internal resorption. **Aust Dent J** 22(5):360–370;1977.
14. Mandor RB. A tooth with internal resorption treated with a hydrophylic plastic material: a case report. **J Endod** 7(9):430–432;1981.
15. Al-Nazhan SA, Spangberg LW. Light and SEM observation of internal root resorption of a traumatized permanent central incisor. **Int Endod J** 28(3):133–136;1995.
16. Staquet K, Kwok D, Ryczyn MA, Petley T, Lacy ER, Powers G, Giles-Komar J. [A rapid method for generating and characterizing anti-variable region monoclonal antibodies](#). **Hum Antibodies** 15(4):155–62;2006.