

**Luciana Villela Rodrigues**

**Apoptose na eliminação pulpar durante a reabsorção  
radicular fisiológica de dentes decíduos humanos**

**Belo Horizonte**

**Faculdade de Medicina**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**2008**

**Luciana Villela Rodrigues**

**Apoptose na eliminação pulpar durante a reabsorção  
radicular fisiológica de dentes decíduos humanos**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Patologia Geral

Orientador: Anilton César Vasconcelos

Co-Orientador: Pedro Alves Campos

**Belo Horizonte**

**Faculdade de Medicina**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**2008**

**Dedico este trabalho a Deus pela força,  
ao meu marido Gustavo pelo amor,  
incentivo e apoio incondicional, aos meus  
Pais, Ari e Cristina, pela amizade e por  
sempre acreditarem em mim.**

## **Agradecimentos**

- A Deus, pela vida, pelo amor, oportunidade e capacitação.
- Ao Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos, por confiar em mim, pelo apoio, dedicação, aprendizado técnico e humano e pela amizade.
- Ao Prof. Dr. Pedro Alves Campos, pela valiosa ajuda, constante presença, por suas preciosas idéias e experiência e pela amizade.
- À Prof.a Dra. Helenice de Andrade Marigo Grandinetti, por ser sempre tão delicada e prestativa quando eu mais precisei.
- Ao Gustavo, pelo amor, incentivo, companheirismo, estímulo e por fazer a minha vida ainda mais feliz.
- Aos meus pais, pela pessoa forte que me fizeram e por sempre acreditarem em mim.
- À minha família, irmãos, avós, tios, primos e amigos por serem a base de tudo.
- À Juliana Massote, pela presença constante, pelo apoio e por dividir comigo todas as angústias, ansiedades e alegrias desde quando tudo começou.
- Aos colegas de laboratório e de curso, pelas dicas, experiências divididas, valiosas ajudas e amizades.
- A todos os professores do curso de pós-graduação em Patologia Geral, pela contribuição na minha formação acadêmica.
- Aos professores de Odontopediatria da PUC/Minas, pela tão valiosa e fundamental ajuda.
- Ao Rubens, técnico do Laboratório do ICBS da PUC/Minas por sua indispensável colaboração.
- À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

## Resumo

Cinquenta amostras de polpas de dentes humanos foram estudadas a fim de avaliar a participação da apoptose na eliminação pulpar durante a reabsorção radicular fisiológica. As amostras foram divididas em dois grupos: um grupo de polpas de dentes decíduos hígidos (n=30), com reabsorção radicular fisiológica e um grupo controle (n=20), formado por amostras pulpares de terceiros molares superiores hígidos. Todos os dentes já tinham exodontia indicada por motivos alheios a este estudo. As células foram coradas em HE e quantificadas através da morfologia. A apoptose foi confirmada pela reação de TUNEL e pela eletroforese do DNA visualizando-se o padrão de fragmentação internucleossômica do genoma. O índice apoptótico foi maior no grupo de dentes decíduos ( $51,01 \pm 0,52$ ) quando comparado ao grupo controle ( $25,32 \pm 0,68$ ) formado por dentes permanentes ( $P < 0,001$ ). Na Reação de TUNEL houve ampla marcação positiva para fragmentação do genoma no grupo de estudo. Na eletroforese do DNA em gel de agarose observou-se, neste mesmo grupo, o padrão de fragmentação internucleossômica do DNA genômico da apoptose. Tais achados foram encontrados de maneira mais discreta nas amostras de dentes permanentes. Considerando o maior índice apoptótico associado à mais ampla marcação positiva *in situ* para a fragmentação do DNA genômico (TUNEL) e à detecção do clássico padrão em escada na eletroforese em gel de agarose nas polpas de dentes decíduos, pode-se inferir que a apoptose exerce um papel importante de eliminação pulpar durante a reabsorção radicular fisiológica dos dentes decíduos humanos.

**Palavras chaves:** Apoptose, reabsorção radicular fisiológica, dente decíduo humano.

## Abstract

Fifty healthy human teeth pulp samples were studied to evaluate the role of apoptosis in pulp elimination during physiological root resorption. The samples were splitted in two groups: a group of deciduous teeth (n=30), with physiological root resorption, and a control group (n=20), with pulps of permanent superior third molar teeth, which do not undergo physiological root resorption. All the teeth already had extraction indicated by other reasons. The pulp samples were processed for routine histological examination and were submitted to morphometrical analysis. Also DNA was extracted and an agarose gel electrophoresis of the genomic DNA was performed. Apoptotic cells were quantified by morphology and confirmed by *in situ* detection of the genomic fragmentation (*TUNEL*) and by the ladder pattern at the DNA electrophoresis. The apoptotic index of the group of deciduous teeth ( $51,01 \pm 0,52$ ) was significantly higher than in the control group ( $25.32 \pm 0,68$ ) ( $P < 0.001$ ). *TUNEL* Reaction showed intense and diffuse labeling in samples of deciduous teeth, which were not present in controls. The ladder pattern at the DNA electrophoresis was evident in samples of deciduous teeth, and not present in controls. These results seem to indicate a role of apoptosis in pulp elimination during the physiological radicular resorption of human deciduous teeth.

Key-words: Apoptosis, physiological radicular resorption, human deciduous teeth.

## Lista de Figuras

FIGURA 1	Determinação do número mínimo representativo de campos para cálculo do índice apoptótico em amostras de polpas de dentes humanos.....	42
FIGURA 2A	Radiografia dentária exibindo dentes decíduos humanos com mais de 1/3 de suas raízes com reabsorção fisiológica.....	42
FIGURA 2B	Radiografia dentária mostrando terceiros molares permanentes com rizogênese incompleta.....	42
FIGURA 3A	Fotomicrografia de tecido pulpar de dente decíduo em HE. Observar várias células em apoptose com condensação do citoplasma e anoiquia.....	43
FIGURA 3B	Fotomicrografia de tecido pulpar de dente decíduo em TG. Observa-se, com freqüência, figuras típicas de células em apoptose com retração, presença de halo claro circundando a célula e núcleos condensados.....	43
FIGURA 3C	Fotomicrografia de tecido pulpar de dente permanente humano corada em HE. Células com morfologia característica de apoptose são menos freqüentes. ....	43
FIGURA 4A	Fotomicrografia de tecido pulpar de dente decíduo humano com reabsorção radicular fisiológica, apresentando intensa marcação difusa para fragmentação do genoma (TUNEL 400x contra-corado com verde de metila).....	44
FIGURA 4B	Fotomicrografia de tecido pulpar de dente permanente apresentando marcação escassa ou insignificante (TUNEL;400x contra corado com verde de metila).....	44
FIGURA 5	Gráfico do Índice Apoptótico obtido de polpas de dentes decíduos com reabsorção radicular fisiológica de polpas de dentes permanentes.....	44
FIGURA 6	Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo e digitalizado sob transiluminação com ultravioleta.....	45

## Lista de Abreviaturas e Siglas

TUNEL	Do inglês <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase Uridine Nick End Labeling</i> – Marcação de extremidade fragmentada do genoma pela enzima transferase terminal de deoxinucleotídeos
DNA	Do inglês <i>DeoxyriboNucleic Acid</i> - Ácido Desoxirribonucléico
BCL 2	Do inglês <i>B cell Lymphoma 2</i> – Gene do Linfoma de células B
P53	Do inglês <i>Protein 53</i> – Proteína 53
TTE	Tris 10mM, Triton X-100 0,25%, EDTA 1mM – Tampão de lise hipotônico
HE	Hematoxilina-eosina
TG	Tricrômico de Gomori
PBS	Do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i> – Tampão Fosfato Salina
TDT	Do inglês <i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase</i> - Transferase terminal de deoxinucleotídeos
UDP	Do inglês <i>Uridine Deoxy Phosphate</i> - Desoxiuridina difosfato
µm	Micrômetros
DAB	Diaminobenzidina
IA	Índice Apoptótico
CV	Coefficiente de variação
ANOVA	Do inglês <i>ANalysis Of VAriance</i> - Análise de Variância
EDTA	Do inglês <i>Ethylene Diamine-Tetraacetic Acid</i> – Ácido Tetra Acético Diamino Etileno
TE	Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM em pH 7.4
TBE	Tris 10mM, ácido bórico 10mM, EDTA 1Mm
Ag-NOR	Do inglês <i>Argyrophillic Nucleolar Organizing Regions</i> - Regiões Organizadoras de Nucléolo coradas pela Prata
µl	Microlitro
µg	Micrograma
M	Molar
mM	Milimolar



°C	Graus Celsius
HCl	Ácido Clorídrico
1x	Uma vez
ng	Nanograma

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1 Reabsorção radicular fisiológica.....	13
2.2 Histologia pulpar.....	15
2.3 Apoptose.....	17
2.4 Apoptose na cavidade bucal .....	19
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 Coleta das polpas de dentes decíduos.....	22
3.2 Coleta das polpas de dentes permanentes.....	22
3.3 Processamento histológico.....	23
3.4 Reação de TUNEL.....	23
3.5 Morfometria.....	25
3.5.1 Determinação do número mínimo representativo de campos.....	25
3.5.2 Análise morfométrica.....	25
3.5.3 Quantificação do índice apoptótico.....	26
3.5.4 Análise estatística.....	26
3.6 Eletroforese em gel de agarose.....	26
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>35</b>
<b>8. FIGURAS E LEGENDAS.....</b>	<b>42</b>

## 1. Introdução

O processo de reabsorção radicular de dentes decíduos humanos corresponde à eliminação fisiológica das raízes deste grupo dentário, o qual perde sustentação no processo alveolar da cavidade bucal dando lugar à dentição permanente <sup>1,2</sup>. Esse fato que elucida uma importante diferença entre dentes decíduos e permanentes <sup>2</sup>.

A polpa dental é constituída por um tecido conjuntivo frouxo formado por fibroblastos, odontoblastos, células endoteliais, colágeno, substância fundamental amorfa, células do sistema imune, além de vasos sanguíneos e nervos <sup>3</sup>. Durante a reabsorção radicular fisiológica nos dentes decíduos, a polpa também é eliminada, porém o mecanismo responsável pela morte fisiológica de suas células ainda não está esclarecido <sup>4</sup>.

A apoptose é um tipo de morte celular fisiológica e programada caracterizada por profundas modificações estruturais e funcionais na célula <sup>5</sup>. Trata-se de uma morte silenciosa, onde a célula é estimulada a acionar mecanismos que resultarão em sua própria morte, sem induzir reações inflamatórias <sup>6,7</sup>.

Portanto, sugere-se a participação da apoptose na eliminação pulpar devido ao caráter programado e ausência de processos inflamatórios na reabsorção fisiológica das raízes dos dentes decíduos humanos <sup>4</sup>.

Este trabalho objetiva detectar, através de alterações morfológicas, a apoptose como mecanismo importante na eliminação das células pulpares durante a reabsorção radicular fisiológica que acomete dentes decíduos humanos, através da evidenciação *in situ* da fragmentação do genoma, via Reação de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase Uridine Nick End*

*Labeling*), e do padrão de fragmentação do DNA (Ácido Desoxirribonucléico) genômico demonstrado via Eletroforese.

## 2. Revisão da literatura

### 2.1 Reabsorção radicular fisiológica

O processo de reabsorção radicular de dentes decíduos humanos ocorre de maneira incontestável. Trata-se da eliminação fisiológica das raízes dos dentes decíduos que perdem sustentação no rebordo alveolar da cavidade bucal e, naturalmente, dão lugar aos dentes permanentes <sup>2</sup>.

A principal diferença entre as dentições decídua e permanente é a eliminação radicular fisiológica que os primeiros sofrem, sendo um fato simples e aparentemente claro, porém que se revela obscuro quando estudado a fundo<sup>8</sup>.

A reabsorção fisiológica das raízes dos dentes decíduos de alguns animais, tais como, ratos, gatos e bovinos, ocorre através da associação de dois processos. Simultaneamente, há a reabsorção da parte externa e interna dos tecidos duros da raiz, o que acelera o processo de reabsorção. Essa reabsorção interna do cemento e da dentina se dá através da participação ativa da polpa. Este fato pode estar relacionado à filogenia dos animais, pois eles necessitam dos dentes permanentes mais precocemente que o homem <sup>8</sup>.

Nos seres humanos verifica-se que a reabsorção radicular fisiológica dos dentes decíduos é mais simples, ou seja, não ocorre reabsorção interna simultânea à externa dos tecidos duros da raiz. Consequentemente, a reabsorção radicular fisiológica dos dentes decíduos é mais lenta e aparentemente exclui a polpa de uma participação ativa neste processo <sup>8</sup>.

A reabsorção do cemento e da dentina das raízes dos dentes decíduos parece ser realizada por osteoclastos, derivados de monócitos, fibroblastos e macrófagos <sup>9</sup> através de um mecanismo similar ao das reabsorções ósseas <sup>10</sup>.

A participação da polpa na reabsorção fisiológica das raízes dos dentes decíduos é controversa, uma vez que este tecido também é eliminado. Alguns estudos demonstraram que o número de células imunocompetentes aumenta proporcionalmente à progressão da reabsorção radicular fisiológica, mantendo assim a vitalidade pulpar mesmo após o início da reabsorção <sup>20, 11, 12</sup>.

Nos humanos a cronologia de reabsorção radicular fisiológica dos dentes decíduos é bastante variável, sendo de três anos para dentes anteriores, quatro anos para molares e de quatro a cinco anos para caninos. Esse tipo de reabsorção não é um processo contínuo, há períodos de parada onde são realizados reparos com deposição de tecido osteóide ou cemento que recobrem em parte a área reabsorvida <sup>8</sup>.

As raízes dos dentes decíduos são reabsorvidas simultaneamente à migração dos dentes permanentes em direção a superfície, porém a falta do germe permanente ou sua posição anômala pode retardar a reabsorção, embora não a impeça totalmente. Tal fato se justifica na presença de reabsorção parcial ou total das raízes dos dentes decíduos, mesmo na ausência do germe do dente permanente <sup>9, 10, 12</sup>.

Alguns estudos mostram o envolvimento do ligamento periodontal na erupção dos dentes permanentes e na reabsorção radicular fisiológica. Os ligamentos recebem estímulos mecânicos através da mastigação, o que modifica a secreção das citocinas produzidas pelos fibroblastos presentes no

ligamento periodontal. Essas substâncias intervêm no remodelamento ósseo e na reabsorção radicular, modificando seus níveis <sup>8</sup>.

O processo fisiológico de reabsorção radicular dos dentes decíduos humanos é bastante complexo, envolve muitas estruturas e depende de um sinergismo perfeito com a erupção do dente permanente. Sendo assim estudos mais detalhados são necessários para um entendimento mais amplo desse fenômeno <sup>8</sup>.

## **2.2 Histologia pulpar**

A polpa dentária é formada por um tecido conjuntivo frouxo, que juntamente com a dentina constitui o complexo dentino-pulpar. Histologicamente a dentina contém células (odontoblastos, fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas, macrófagos e outras células imunocompetentes), vasos sanguíneos e linfáticos, fibras nervosas e matriz extracelular <sup>5,13</sup>.

As células mais distintas da polpa e talvez as mais prontamente reconhecíveis são os odontoblastos, os quais formam uma camada única limitando a periferia da polpa e apresentam um processo que se estende para o interior da dentina. A principal função dos odontoblastos é a formação da dentina <sup>5,13</sup>.

Os fibroblastos são as células que ocorrem em maior número na polpa, e têm como função, formar, manter e remodelar a matriz pulpar, a qual consiste de colágeno e substância fundamental <sup>14,15</sup>. A histologia dos fibroblastos reflete sua atividade funcional. Em polpas jovens, os fibroblastos sintetizam ativamente matriz e por isso exibem citoplasma com abundância de organelas

associadas com a síntese e secreção <sup>5</sup>. Com a idade, a necessidade de síntese diminui e os fibroblastos se tornam fusiformes ou achatados <sup>16</sup>.

As células mesenquimais indiferenciadas constituem a reserva, a partir da qual, as células do tecido conjuntivo pulpar são formadas ou repostas. Dependendo do estímulo, as células mesenquimais indiferenciadas podem dar origem a fibroblastos ou odontoblastos <sup>14,17</sup>.

Há também, três outros tipos celulares considerados residentes normais do tecido pulpar: macrófagos, células dendríticas e ocasionais linfócitos <sup>18</sup>. Os macrófagos pulpares estão associados com a remoção de células mortas, envolvidas na renovação da polpa dental <sup>17,19</sup>.

Ainda, na composição histológica da polpa, há fibras que são principalmente de colágeno tipos I e III, em uma proporção aproximada de 55%:45% <sup>16,20</sup>.

A matriz extracelular da polpa é composta principalmente de componentes complexos de carboidratos com proteínas, denominados de mucopolissacarídeos e também de glicosaminoglicanas e glicoproteínas, atuando como meio de transporte de nutrientes e metabólitos entre células e os vasos sanguíneos <sup>16,20</sup>.

Ricamente vascularizada, os vasos sanguíneos penetram e deixam a polpa via forame apical e forames acessórios. As arteríolas ocupam uma posição central da polpa e a medida que passam através da região radicular, dão origem a ramificações laterais menores. As arteríolas esvaziam-se em pequenas vênulas ligadas a um número menor de veias cada vez maiores. Duas ou três vênulas deixam a polpa através do forame apical, ligando-se posteriormente aos vasos que drenam o ligamento periodontal ou o osso



alveolar adjacente <sup>17</sup>. Vasos linfáticos também são encontrados. Estes se originam como pequenos vasos, de parede fina, alguns de lúmen indistinto, na região coronal e passam através da mesma em direção apical, deixando o tecido pulpar através de um ou dois vasos de calibre maior via forame apical <sup>21</sup>.

A polpa dental é ricamente innervada. Fibras nervosas mielinizadas e amielinizadas penetram via forame apical, junto com os vasos sanguíneos, formando o denominado feixe neurovascular <sup>22</sup>. Além da função sensorial, as terminações nervosas pulpares são responsáveis por manutenção do tônus vascular, comunicação da pressão total no interior dos componentes fluidos e controle da taxa de dentinogênese <sup>23,24</sup>.

## 2.3 Apoptose

A Apoptose é um tipo especial de morte celular, onde a célula é estimulada a acionar mecanismos que culminarão com sua própria morte. Por isso, é também conhecida como suicídio celular <sup>6, 7, 25</sup>. Trata-se de uma morte celular programada e ativa, que requer energia, síntese e degradação protéica <sup>7, 26</sup>. Através dela, os organismos vivos frequentemente eliminam as células potencialmente prejudiciais para a manutenção da homeostase <sup>27, 28</sup>, sendo assim, um mecanismo fisiológico, de controle celular, que regula o tamanho dos tecidos exercendo um papel oposto ao da mitose <sup>29</sup>.

A apoptose pode ocorrer fisiologicamente em cinco situações celulares: em células que não possuem funções no organismo, em células geradas em excesso, em células que se desenvolvem de forma imprópria, em células que já desempenharam suas funções e naquelas que podem ser prejudiciais e devem ser eliminadas <sup>30</sup>.

A ausência ou a exacerbação do fenômeno de apoptose pode resultar em conseqüências desastrosas para os tecidos <sup>31</sup>. Dessa forma, sua inibição, está relacionada com o desenvolvimento de tumores, enquanto sua indução excessiva pode acarretar imunossupressão <sup>7, 26, 32</sup>.

Este tipo especial de morte celular pode também ocorrer como conseqüência a estímulos patológicos, tais como viroses, isquemia, hipertermia, infecções e toxinas bacterianas <sup>33</sup>.

Vários aspectos morfológicos são usados para caracterizar uma célula como apoptótica. À microscopia óptica, as células em apoptose apresentam-se retraídas, tipicamente circundadas por um halo claro e possuem citoplasma acidófilo. Seus núcleos sofrem uma série de alterações, incluindo marginação da cromatina, condensação e fragmentação, seguidas pela fragmentação da própria célula em corpos apoptóticos <sup>25</sup>. Estes podem apresentar fragmentos citoplasmáticos, fragmentos nucleares ou ambos e são reconhecidos e fagocitados por macrófagos ou células parenquimatosas adjacentes <sup>34, 35</sup>.

A ação de endonucleases é principal responsável pelas alterações morfológicas exibidas por uma célula em apoptose. As endonucleases fragmentam o DNA internucleossomal da célula gerando fragmentos que contém sempre 200 pares de bases ou seus múltiplos.

Sendo assim a morte celular via apoptose torna-se bem distinta daquela por necrose em vários aspectos. Na necrose, há tumefação celular com subseqüente perda da integridade da membrana plasmática e o conteúdo da célula é liberado ao espaço extracelular, o que conduz a uma resposta inflamatória naquela região. Além disso, a necrose acomete um maior número de células sendo, portanto, tissular e ocorrendo sempre em caráter acidental ou

patológico. Já a apoptose, caracteriza-se como uma morte silenciosa, pois o conteúdo da célula é transformado em corpos apoptóticos e estes fagocitados por macrófagos ou pelas células adjacentes, não extravasando para o meio extracelular, sendo assim, não há a indução de inflamação<sup>36, 37, 38</sup>. Além disso, ela acomete as células isoladamente, não modificando a arquitetura tecidual e ocorre, na maioria das vezes, de forma programada e não de forma acidental<sup>39</sup>.

## **2.4 Apoptose na cavidade bucal**

Por ser a apoptose um tipo de morte celular fisiológica, ela tem sido relacionada com a fisiologia da cavidade bucal, sendo diretamente responsável pela manutenção da homeostasia de sua mucosa, bem como da renovação (*turn over*) do tecido gengival<sup>40</sup>, estando presente em 90% dos indivíduos estudados<sup>41</sup>.

Estudos histológicos de polpas dentais saudáveis em diferentes estágios de desenvolvimento detectaram odontoblastos em apoptose após terem desempenhado sua função<sup>42</sup>. A apoptose também pode ser observada em odontoblastos devido à diminuição no volume pulpar, após a formação de dentina secundária, ou de forma mais evidente, quando há a formação de dentina terciária após as injúrias<sup>40</sup>.

Segundo Matalová et al.<sup>43</sup> a apoptose exerce um papel crucial no desenvolvimento dental. Durante a morfogênese dentária, na embriogênese, há a formação do germe dentário. Quando este se encontra na fase de campânula, espera-se uma regressão para que haja um correto desenvolvimento. O mecanismo pelo qual se verifica tal regressão é a apoptose.

Em polpas dentárias de dentes permanentes hígidos já foi detectada a presença de proteínas que regulam a via apoptótica, conhecidas como proteínas anti-apoptóticas, tais como a bcl2 (*B cell Lymphoma 2*) e também pró-apoptóticas como a p-53 (proteína 53) <sup>4</sup>. Esse fato pode explicar a via apoptótica utilizada pelos odontoblastos encontrados em polpas dentais adultas saudáveis <sup>42</sup>.

Os corpos apoptóticos são resultados da fragmentação de uma célula em apoptose e são fagocitados por células circunjacentes ou macrófagos. A presença de apoptose, <sup>43</sup> bem como de corpos apoptóticos e também de macrófagos contendo corpos apoptóticos já foi observada em polpas dentárias isoladas <sup>44</sup> e também durante o movimento ortodôntico em ratos <sup>45</sup>.

A apoptose foi também relacionada com algumas doenças que acometem a cavidade bucal. São elas: líquen plano, ceratocisto odontogênico, carcinoma de células escamosas, linfoma oral, eritema multiforme e candidíase mucocutânea <sup>43</sup>.

Alguns microorganismos presentes na flora bucal podem induzir apoptose. Foi demonstrado que o *Streptococcus mutans* levou células pulpares de dentes decíduos humanos, em cultura, a morrerem via apoptose, podendo, portanto, participar da etiopatogenia das pulpites <sup>42</sup>. *Agregactibacter actinomycetemcomitans* também foi capaz de gerar apoptose nos tecidos periodontais estando, o índice apoptótico, diretamente relacionado com a ocorrência e extensão da doença periodontal <sup>33</sup>.

Muitos estudos têm analisado a necrose nos tecidos dentais, porém mais trabalhos se fazem necessários para esclarecer o papel da apoptose nesses

tecidos, principalmente no que diz respeito ao tecido pulpar e seu envolvimento na reabsorção radicular fisiológica de dentes decíduos <sup>44</sup>.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta das polpas de dentes decíduos**

Para o grupo de estudo, foram coletadas 30 amostras de polpas de dentes decíduos humanos hígidos. Anteriormente à extração, já indicada por outros motivos alheios a este estudo, os dentes passaram por exames clínicos e radiográficos para se certificar de que estavam livres de fraturas ou qualquer alteração que possa ter contaminado sua polpa. Os dentes possuíam 1/3 ou mais da raiz com reabsorção radicular fisiológica, o que também foi confirmado através do exame radiográfico. Imediatamente após a exodontia, realizada em ambiente cirúrgico, foi feita a coleta da amostra de polpa dental, com o auxílio de um *rollemback* estéril, via forame apical. As 20 amostras destinadas à morfometria e Reação de TUNEL foram armazenadas em formol a 10% tamponado por um período de até quatro horas e processadas histologicamente. As 10 polpas destinadas à eletroforese em gel de agarose foram armazenadas em TTE (Tris a 10mM, Triton X-100 a 0,25%, EDTA a 1mM) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido.

Esse trabalho tem aprovação do comitê de ética em pesquisa da PUC/MG.

#### **3.2 Coleta das polpas de dentes permanentes**

Para o grupo controle, foram coletadas 20 amostras de polpas de terceiros molares superiores hígidos. Os dentes se encontravam em estágio de rizogênese incompleta, o que facilitou a coleta pulpar realizada via forame apical. Os dentes superiores foram escolhidos por geralmente não ser

necessária a realização de odontosecção para sua remoção, preservando assim as características estruturais de sua polpa. Os dentes já possuíam indicação para extração, a qual foi realizada em ambiente cirúrgico. Apesar de não haver neste grupo reabsorção radicular fisiológica, foram feitos exames radiográficos para confirmação da ausência de alterações ou fraturas associadas ao dente. Para a realização da análise morfométrica e da técnica de TUNEL, 15 amostras foram coletadas e armazenadas em formol a 10% tamponado por um período de até 4 horas e seguiram para o processamento histológico. Para a execução da eletroforese em gel de agarose, 5 amostras foram coletadas, armazenadas em TTE (Tris-Triton-EDTA) e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido.

Cada dente, portanto, correspondeu a uma amostra, devidamente rotulada com identificação, idade e sexo do paciente, data e número correspondente ao dente em questão.

### **3.3 Processamento histológico**

As amostras de polpas de dentes foram processadas segundo técnica de rotina para impregnação em parafina. Secções com 4 micrômetros foram coradas em HE (Hematoxilina-eosina), TG (Tricrômico de Gomori) <sup>46</sup> e submetidas à Reação de TUNEL.

### **3.4 Reação de TUNEL**

A ocorrência de apoptose foi confirmada através da evidenciação da fragmentação do DNA genômico via Reação de TUNEL<sup>47</sup>. Foi utilizado um kit comercial para a detecção *in situ* da fragmentação do genoma (*Klenow FragEl*

*DNA fragmentation. Detection Kit* - No Catálogo QIA21; *Calbiochem /Oncogene-* internet address: <http://calbiochem.com/>). Seguiu-se o protocolo especificado pelo fabricante, sendo que o tempo de proteinase K foi adaptado ao tecido pulpar. Para a obtenção do tempo de proteinase K, várias secções do tecido pulpar foram submetidas à enzima na concentração de 20g/ml, em diferentes tempos: 10, 15, 20 25 e 30 minutos. Determinou-se assim 20 minutos como o tempo suficiente para digerir proteínas com ligações cruzadas, aumentando a permeabilidade e o acesso aos ácidos nucléicos alvo sem modificar significativamente a morfologia celular. As lâminas foram lavadas duas vezes com água destilada. Em seguida, inativou-se a peroxidase endógena, cobrindo as secções com água oxigenada a 3%, por 5 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS (*Phosphate Buffer Saline*) e imersas em solução tampão de equilíbrio. Os cortes foram cobertos com a enzima TdT (transferase terminal de deoxinucleotídeos) e desoxinucleotídeos (marcados e não marcados) e foram incubados sob atmosfera úmida a 37°C por 2 horas. Em seguida foram lavadas com TBS 1X, cobertas com tampão de parada (EDTA 0.5 M, ph=8) por 5 minutos. Novamente as lâminas foram lavadas com TBS 1X e cobertas com o tampão de bloqueio por 10 minutos. Foram então tratadas com o conjugado de peroxidase de estreptavidina diluída em tampão de bloqueio e incubadas em câmara umidificada a 37°C por 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas com TBS 1X e tratadas com DAB (diaminobenzidina) por 6 minutos, lavadas com água destilada, contra coradas com Verde de Metila e montadas.



## **3.5 Morfometria**

### **3.5.1 Determinação do número mínimo representativo de campos**

O número mínimo representativo de campos microscópicos por amostra para a quantificação da apoptose, foi determinado a partir de uma única lâmina na qual foram analisados e registrados os índices apoptóticos, utilizando um analisador de imagens. A contagem foi realizada com objetiva planacromática de 100 vezes e as células estavam coradas com HE. Desses, formaram-se 11 subamostras com número crescente de campos (5, 10, 15... até 54) retirados aleatoriamente com reposição. De cada grupo, calculou-se a média aritmética e respectivos coeficientes de variação (CV) para cada tamanho amostral. À medida que o tamanho amostral aumentava os CVs diminuía. Assim, o tamanho da amostra considerada como mínima representativa foi definida quando o incremento do número de campos não resultava em redução considerável no valor do coeficiente de variação. Determinando, portanto, o número mínimo de representativo campos <sup>48</sup>. Neste trabalho este achado ocorreu após a contagem de 25 campos, como mostra a Figura 1.

### **3.5.2 Análise morfométrica**

Cada corte teve 25 campos capturados em um aumento de 1000 vezes na coloração HE. Foram feitas as contagens das células em apoptose e das células normais em cada campo, tanto no grupo de dentes decíduos, como nos dentes permanentes. As células foram consideradas como apoptóticas quando apresentavam, ao menos, três dos seguintes achados: 1) Anoiquia (retração celular com perda da adesão com as células adjacentes); 2) Condensação

citoplasmática; 3) Condensação nuclear (condensação da cromatina nuclear, às vezes compactação da cromatina contra a carioteca, exibindo figuras de “crescentes”; 4) Fragmentação nuclear; 5) Formação de corpos apoptóticos.

Quantificaram-se os Índices Apoptóticos através de ensaio cego por um mesmo observador, usando um software de análise de imagens (Kontron KS300, v.2.0).

### **3.5.3 Quantificação do índice apoptótico (IA)**

O Índice Apoptótico (IA) foi obtido através da seguinte fórmula:

$$IA = [\text{número de células em apoptose} / \text{número de células totais}] \times 100.$$

### **3.5.4 Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão, depois de confirmada a distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para comparar os resultados obtidos para dentes decíduos e dentes permanentes. Os valores de  $P < 0,001$  foram considerados significativos, utilizando-se o programa GraphPad Prism 3.0.

## **3.6 Eletroforese em gel de agarose**

Para a extração do DNA e eletroforese em gel de agarose, as células pulpares foram tratadas com tampão lítico TTE. Os lisados (500 $\mu$ l) foram congelados a  $-70^{\circ}$  C em tubos de microcentrífuga de 1.0 ml para posterior extração. No momento oportuno, os tubos de microcentrífuga receberam 5 $\mu$ l de proteinase K a 20 $\mu$ g/ml, e foram incubados a  $56^{\circ}$  C por 1 hora. As proteínas foram coaguladas utilizando-se clorofórmio, fenol e álcool isoamílico (24:25:1)

para cada 500µl do lisado, que passaram pelo vórtex por 10 segundos e pela centrifugação a 12.000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante com o DNA (500µl) foi pipetado para outro tubo e acrescentado 25µl de acetato de sódio a 3M e 1 ml de etanol gelado a 96% para precipitação a -20° C durante a noite. O sedimento de DNA foi condensado por centrifugação a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C foi lavado com etanol a 70% por duas vezes e seco à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em volumes variáveis (10 a 50 µl) de tampão TE (Tris-HCl a 10mM, EDTA a 1mM, em pH 7,4), conforme o tamanho do “pellet” e quantificado em *GeneQuant* (Biochrom Ltd). Alíquotas de 15µl contendo aproximadamente 4000 ng de DNA das amostras pulpareas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,8% em TBE 1X (Tris a 10mM, ácido bórico a 10mM e EDTA a 1mM), a 60V por 1,5 horas. O géel foi corado com brometo de etídeo e digitalizado após transiluminação com ultravioleta.

## 4. RESULTADOS

Os dentes decíduos selecionados para este estudo estavam livres de fraturas ou qualquer alteração que pudessem ter contaminado sua polpa, além de possuírem 1/3 ou mais de raiz com reabsorção fisiológica. Os dentes permanentes que formaram o grupo controle ainda se encontravam em um estágio de rizogênese incompleta. Exames radiográficos permitiram certificar tais achados (Fig. 2A e 2B).

A ocorrência de apoptose durante o processo de reabsorção radicular foi evidente. Secções histológicas, coradas com HE e TG, exibiram imagens de células retraídas, com citoplasma acidófilo, apresentando halos claros ao redor, sugerindo menor adesão entre elas, e com condensação nuclear (Fig.3 A e B). Corpos apoptóticos freqüentes e ausência de infiltrado inflamatório também contribuíram para a caracterização da apoptose no quadro histológico.

Quanto à evidenciação da fragmentação do DNA genômico *in situ*, via Reação de TUNEL, houve ampla marcação positiva nas amostras de tecido pulpar de dentes decíduos com reabsorção radicular fisiológica (FIG 4 A). Os núcleos das células em apoptose foram marcados, ficando com uma coloração acastanhada escura, resultado da reação da Peroxidase com o seu substrato, a diaminobenzidina.

Nos dentes permanentes, as alterações morfológicas que caracterizam uma célula como apoptótica foram também encontradas, porém com freqüência visivelmente menor (Fig.3 C). Da mesma forma, a marcação positiva da reação de TUNEL para fragmentação do genoma foi discreta (FIG.4 B).

O valor médio do Índice Apoptótico foi significativamente maior ( $P < 0,001$ ) no grupo de dentes decíduos ( $51,01 \pm 0,52$ ) quando comparado ao grupo controle, composto por dentes permanentes ( $25,32 \pm 0,68$ ). Tais achados podem ser demonstrados na Figura 5.

Uma intensa fragmentação do DNA, considerado como padrão sugestivo de apoptose, foi observada nas amostras de polpas dos dentes decíduos (Fig. 6. Trilha B). Fragmentos do DNA compostos de 200 a 1000 pares de base, foram identificados como bandas discretas pela eletroforese em gel de agarose. Verificou-se uma maior intensidade de DNA de baixo peso molecular na trilha, indicando intensa fragmentação desse DNA genômico. Por outro lado, na trilha das amostras pulpares de dentes permanentes (controles – Fig.6 – trilha A) observou-se quantidade de DNA de alto peso molecular no início da trilha, representado por uma mancha mais intensa perto da origem de migração, indicando que a fragmentação do DNA genômico foi bem mais discreta. Houve também algumas faixas mais fracas ("*background apoptosis*"), indicando que a maioria do DNA não era fragmentada quando comparado à trilha dos dentes decíduos.

## 5. DISCUSSÃO

A reabsorção radicular fisiológica é um fenômeno que só acomete a dentição decídua. Na dentição permanente, a ocorrência de reabsorção radicular está associada a fenômenos externos, como forças oclusais inadequadas, alterações periodontais, microtraumatismos, erupção ectópica de dentes vizinhos, movimentação ortodôntica, dentre outras <sup>49, 50, 51</sup>.

Durante a reabsorção fisiológica todas as estruturas das raízes, cimento, dentina e polpa, são eliminadas <sup>4</sup>. Cimento e dentina são reabsorvidos através da ação dos odontoclastos, ou seja, osteoclastos especializados em reabsorver este tipo de tecido dentário <sup>9, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58</sup>. A forma como os mesmos são recrutados e ativados ainda gera controvérsias. No entanto, o mecanismo fisiológico de reabsorção radicular parece ser similar ao ósseo <sup>10, 58, 59</sup>. Porém, segundo Sahara <sup>9</sup>, o folículo do dente permanente e seus ligamentos periodontais, adjacentes ao dente decíduo, recrutam, desenvolvem e ativam células específicas como os odontoblastos, exercendo um papel importante na reabsorção radicular dos dentes decíduos. Tais autores enfocaram apenas a eliminação das estruturas que compõem o tecido duro radicular, porém o mecanismo responsável pela morte fisiológica das células pulpares ainda não fora elucidado <sup>4</sup>.

A renovação de alguns grupos de células da polpa dental, bem como a ocorrência e o significado da apoptose nesse tecido precisam ser esclarecidas. A possibilidade dos odontoblastos desaparecerem por apoptose tem sido proposta, bem como a presença de células apoptóticas nas camadas

odontoblasticas e subodontoblasticas de ratos e de humanos têm sido descritas <sup>4</sup>.

Os dentes decíduos selecionados para este estudo estavam em um estágio avançado de reabsorção radicular. Eles apresentavam 1/3 ou mais da superfície da raiz reabsorvida. Quando esse nível não ultrapassa 1/3 é definido como precoce <sup>8, 61, 62, 63</sup>.

Este estudo enfocou a eliminação das células pulpares na reabsorção fisiológica da raiz em dentes decíduos humanos e demonstrou a presença marcante da apoptose através de avaliação morfométrica do índice apoptótico. Quando comparado com os dentes permanentes, percebeu-se um maior número de células em apoptose nas polpas dos dentes decíduos. Na evidenciação *in situ* da fragmentação do DNA genômico, via Reação de TUNEL, houve ampla marcação positiva nas amostras de tecido pulpar de dentes decíduos com reabsorção radicular fisiológica, o que ocorreu de maneira menos intensa nos dentes permanentes. Na eletroforese em gel de agarose verificou-se uma maior intensidade de DNA de baixo peso molecular na trilha, indicando intensa fragmentação desse DNA genômico. Nas amostras pulpares de dentes permanentes observou-se grande quantidade de DNA de alto peso molecular no início da trilha, indicando que a fragmentação do DNA genômico foi bem mais discreta.

Simsek & Duruturk <sup>12</sup> concluíram não haver diferenças estruturais entre polpas e tecidos periodontais de dentes decíduos sem reabsorção radicular fisiológica e de dentes permanentes jovens. Sari & Aras <sup>62</sup>, estudando dentes decíduos com reabsorção radicular fisiológica e dentes permanentes jovens, verificaram que as características histológicas destes grupos dentários são

semelhantes. Tais achados indicaram a utilização de polpas de terceiros molares permanentes jovens, com rizogênese incompleta, como grupo controle deste estudo.

A participação ativa do tecido pulpar e a erupção dos dentes permanentes na reabsorção fisiológica das raízes de dentes decíduos têm sido descritas. Segundo Eronat et al. <sup>2</sup>, há um aumento da atividade metabólica da polpa, tanto em estágios iniciais quanto em estágios avançados, de reabsorção radicular fisiológica em dentes decíduos detectado através da coloração para Ag-NOR (Regiões Organizadoras de Nucléolo coradas pela Prata). Tal achado indica a participação pulpar nesse tipo de reabsorção.

Durante a erupção dos dentes permanentes, estão envolvidos dois processos essenciais: reabsorção do dente decíduo e o próprio mecanismo de erupção do dente permanente que deve deslocá-lo na direção oclusal. Embora esses dois processos possam ocorrer de forma simultânea, foi demonstrado que eles não são regidos por um mesmo mecanismo fisiológico. Isso pode ser comprovado pela existência da reabsorção fisiológica dos dentes decíduos mesmo na ausência do dente permanente correspondente <sup>1,2</sup>.

Marks & Schroeder <sup>1</sup>, após estudos com animais, propuseram que a força de erupção dos dentes permanentes é gerada pelos ligamentos periodontais, podendo estar associada com outros processos. Mas, o modo como essa força eruptiva é acionada e o mecanismo ativador da reabsorção radicular dos dentes decíduos ainda continuam obscuros. É possível que além dos fatores mecânicos-compressivos envolvidos com a erupção do dente permanente, a polpa dentária do dente decíduo, particularmente a apoptose nas suas células, também participe da ativação da reabsorção das outras estruturas da raiz.



De acordo com Nishikawa & Sasaki <sup>44</sup> a apoptose é essencial para contrabalancear a mitose. Trata-se de uma morte celular programada e ativa, que requer energia, síntese e degradação protéica <sup>7,26</sup>. Através dela, os organismos vivos frequentemente eliminam as células potencialmente prejudiciais para a manutenção da homeostase <sup>27, 28</sup>. Sendo assim, a apoptose representa um mecanismo fisiológico de controle celular que regula o tamanho dos tecidos exercendo um papel oposto ao da mitose <sup>29</sup>. A polpa dentária, como todos os tecidos vivos, é renovada constantemente. Isto significa um acoplamento entre proliferação celular (produção de novas células) e apoptose (reabsorção de células velhas). Dessa maneira não é inesperado o achado de algum IA nas polpas de dentes permanentes.

Apesar das controvérsias apresentadas e da escassez de trabalhos que indiquem a apoptose como mecanismo importante na eliminação pulpar durante a reabsorção radicular fisiológica de dentes decíduos humanos, o caráter programado, a ausência de processos inflamatórios, associados às evidências morfológicas obtidas, aos resultados da morfometria, a evidenciação da fragmentação do DNA genômico via Reação de TUNEL, bem como o padrão de fragmentação detectado na eletroforese, sugerem a participação da apoptose neste processo.

## **6. CONCLUSÃO**

Apesar de todas as controvérsias e da escassez de trabalhos relacionados, os resultados deste estudo sugerem a participação da apoptose na eliminação pulpar durante a reabsorção fisiológica das raízes dos dentes decíduos humanos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MARKS, S. C., SCHROEDER, H. E. Tooth eruption: theories and facts. *Anat. Rec.* 2001; 245:374-393.
2. ERONAT, C., ERONAT, N., AKTUG, M. Histological investigation of physiologically resorbing primary teeth using Ag-NOR staining method. *Int. J. Paed. Dentist.* 2002; 12: 207-214.
3. HAHN, C. L., BEST, A. M., TEW JC. Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infect & Immunit.* 2000; 68(12):6785-6789.
4. PIATTELLI, A., RUBINI, C., FIORONI, M., CIAVARELLI, L., FAZIO, P. D. Bcl2, p53, and MIB-1 in human adult dental pulp. *J Endodontics.* 2000; 26(4):225-227.
5. TORNECK, C. D. Dentin-pulp complex. In: Ten Cate AR. *Oral histology - development, structure, and function.* 4th.ed. St. Louis: Mosby; 1994. P.169-217.
6. COHEN, J. J. Apoptosis. *Immunol. Today* 1993; 14(3): 126-130.
7. KERR, J. F. R., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British J Cancer* 1972; 26(4):239-257.
8. SCAROLA, V., GALMOZZI, A. Biologia dei processi di riassorbimento radicolare dei denti decidui. *Minerva Stomatol* 2001; 50: 145-150.
9. FUKUSHIMA, H., H. Expression and role of RANKL in periodontal ligament cells during physiological root-resorption in human deciduous teeth. *Eur J Oral Sci* 2003; 111(4): 346-52.

10. SASAKI, T. Cellular roles in physiological root resorption of deciduous teeth in the cat. *J Dent Res*, 1990; 69(1): 67-74.
11. ANGELOVA, A., Y. Immunocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. *Arch Oral Biol* 2004; 49(1): 29-36.
12. SIMSEK, S., DURUTURK, L. A flow cytometric analysis of the biodefensive response of deciduous tooth pulp to carious stimuli during physiological root resorption. *Arch Oral Biol* 50(5): 461-8.
13. CLONEY, A. M. Pulp Histology: A review of the present aspects. *Rev Bras Patol Oral* 2005; 4(1): 42-49.
14. UTRILLA, L. S., ROSLINDO, N. C., RAMALHO, L. T. O., et al. Histofisiologia da polpa dentária. In: Berger CR. *Endodontia*. Rio de Janeiro: EPUC; 1989. p.7-14.
15. SOUZA, M. A. *Biologia pulpar - princípios biológicos e mecânicos*. São Paulo: Artes Médicas; 1999 p.1-24.
16. SMULSON, M. H., SIERASKI, S. M., *Histofisiologia e doenças da polpa dentária*. 5 ed. São Paulo: Santos; 1998.p.84-165.
17. WALTON, R. E., PASHLEY, D. H., Ogilvie AL. *Histologia e fisiologia da polpa dental* 3ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1989. p. 264-290.
18. LANGELAND, K. *Histologia e fisiologia da polpa*. 2ª. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982 p.207-265.
19. SIQUEIRA, J. J. F., DANTAS C. J. S. *Reparação tecidual: aspectos celulares e moleculares*. Rio de Janeiro: Medsi; 2000. p.173-196.
20. TORNECK, C. D., TORABINEJAD, M. *Biology of the dental pulp and periradicular tissues*. 2ª Ed. Philadelphia: Saunders; 1996. p.6-28.

21. BISHOP, M. A. Extracellular fluid movement in the pulp: the pulp/dentin permeability barrier. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88: 331-335.
22. MJOR, I. A., SVEEN, O. B., HEYERAAS, K. J. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. *Quintessence Int* 2001; 32: 427-446.
23. INOUE, H., TANIGUCHI, K., OKAMURA, K., et al. Ultrastructural relation between nerve terminals and dentin bridge formation. *Arch Oral Biol* 1995; 40: 669-675.
24. TSUZUKI, H., KITAMURA, H. Immunohistochemical analysis of pulpal innervation in developing rat molars. *Archs oral Biol* 1991; 36: 139-146.
25. WYLLIE, A. H., Glucocorticoid induced thymocytes apoptosis in associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980; 284(5756): 555-556.
26. WYLLIE, A. H., KERR, J. F. R., CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. *Intern Review Cytology* 1980; 68:251-305.
27. HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-776.
28. AMARANTE-MENDES, G. P., GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1999; 32:1053-1061.
29. VASCONCELOS, A. C., VASCONCELOS, M. M. A. Apoptose ou morte celular programada – Um novo conceito em Patologia? *Rev Med Minas Gerais.* 1996, 5(2):103-108.
30. ELLIS, R. E., YUAN, J., HORVITZ, H. R. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biology* 1991; 7:115-119.
31. MILLER, L. J., MARX, J. Apoptosis. *Science* 1998; 281(5381):1305-1309.

32. BARINAGA, M. Is apoptosis key in Alzheimer's Disease? *Science* 1998; 281(5381):1301-1304.
33. KATTO, S., NAKASHIMA, K., INOUE, M., TOMIOKA, J., et al. Human epithelial cell death caused by *Actinobacillus actinomycetes* infection. *J Med. Microbiol.* 2000; 49(8):739-745.
34. HACKER, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000; 301(1):5-17.
35. ARENDS, M. J., WYLLIE, A. H. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Internat. Rev. Exp. Pathol.* 1991; 32:223-254.
36. KRESSEL, M., GROSCURT, P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labeling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res.* 1994; 278(3):549-556.
37. MAJNO, G., JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995; 146:3-15.
38. BORISENKO, G. G., MAYSURA, T., LIU, S., TYURIN, V. A., JIANG, J., SERINKAN, F. B., et al. Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cell-existence of a threshold. *Arch Biochem & Biophys.* 2003; 413(1):41-52.
39. DOSEFF, A. I. Apoptosis: the sculptor of development. *Stem Cells Dev.* 2004; 13:473-483.
40. SATCHELL, P. G., GUTMANN, J. L., WITHERSPOON, D. E. Apoptosis: an introduction for endodontist. *Intern. Endond. J* 2003; 36:237-245.
41. YOSHIOKA, C., MURAKI, Y., FUKUDA, J., HANEJI, T., KOBAYASHI, N. Identification of fas antigen in human gingiva. *J Dental Res.* 1996; 75:1353-1357.

42. WANG, P. L., SHIRASU, S., DAITO, M., OHURA K. *Streptococcus mutans* lipoteichoic acid-induced apoptosis in cultured dental pulp cells from human deciduous teeth. *Biochem Biophys. Res Commun.* 2001; 281:957-961.
43. BRONCKERS, A. L. J. J., GOEI, D. E., LYARUU, D. M., WOLTGENS, W. L., HEERDE, W. L., REUTELINGSPERGER, C. P. M., *et al.* *Histochem Cell Biol.* 2000; 13:293
44. NISHIKAWA, S., SASAKI, F. Apoptosis of dental pulp cells and their elimination by macrophages and MHC class II expressing dendritic cells. *J Histochem. Cytochem.* 1999; 47:303-311.
45. RANA, M. W. Z., POTHISIRI, V., KILLIANY, D. M., XU, X. M. Detection of apoptosis during orthodontic tooth movement in rats. *American J Orth. Dent. Orthop.* 2000; 119(5):516-521.
46. LUNA, L. G. *Manual of Histology. Staining methods of Armed Forces Institute of Pathology.* 3 ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258-301.
47. GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-BASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 1972;v.119, p. 493-501,
48. MORO, L., VASCONCELOS, A. C., SANTOS F. G. A., ALVES, C. M., NUNES, I. B. M. Determination of the minimal representative number of microscopic fields to quantify apoptosis in canine lymph nodes. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 2004, 56:408-410.
49. LLENA-PUY, M. C., AMENGUAL-LORENZO, J., *et al.* Idiopathic external root resorption associated to hypercalciuria. *Med Oral*, 2002 7(3): 192-9.
50. RATHE, F., NOLKEN, R., *et al.* External root resorption. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 2006, 116(3): 245-53.

51. HARADA, K., ARITA, K., et al. Histological study on root resorption of upper permanent incisor. *Shoni Shikagaku Zasshi*, 1989, 27(3): 663-71.
52. LINSUWANONT-SANTIWONG, B., TAKAGI, Y., et al. Expression of MT1-MMP during deciduous tooth resorption in odontoclasts. *J Bone Miner Metab*, 2006; 24(6): 447-53.
53. TAKADA, K., KAJIYA, H., et al. Calcitonin in human odontoclasts regulates root resorption activity via protein kinase A. *J Bone Miner Metab*, 2004; 22(1): 12-8.
54. KIMURA, R., ANAN, H., et al. Dental root resorption and repair: histology and histometry during physiological drift of rat molars. *J Periodontal Res*, 2003; 38(5): 525-32.
55. SASAKI, T. Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. *Microsc Res Tech* 2003; 61(6): 483-95.
56. LOSSDORFER, S., GOTZ, W., et al. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tissue Int*, 2002; 71(1): 45-52.
57. OSHIRO, T., SHIBASAKI, Y., et al. Immunolocalization of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase, cathepsin K, matrix metalloproteinase-9, and receptor activator of NFkappaB ligand in odontoclasts during physiological root resorption of human deciduous teeth. *Anat Rec*, 2001; 264(3): 305-11.
- 58 SAHARA, N. Cellular events at the onset of physiological root resorption in rabbit deciduous teeth. *Anat Rec*, 2001, 264(4): 387-96.
59. DOMON, T., OSANAI, M., et al. Ultrastructural study of the root dentine surface resuming resorption on human deciduous teeth. *Ann Anat*, 2000; 182(2): 175-84.



60. LIAO, S. C., CHANG, H. P. The study of root resorption of human deciduous teeth. I. Histological observation by light microscope. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi*, 1990; 6(2): 88-99.
61. FRANCINI, E., MANCINI, G., et al. Microscopical aspects of root resorption of human deciduous teeth. *Ital J Anat Embryol*, 1992, 97(3): 189-201.
62. SARI, S., ARAS, S., GUNHAN, O. The effect of physiological root resorption on the histological structure of primary tooth pulp. *J. Clin. Pediat.*, 1999; 23(3): 221-225.
63. SARI, S., ARAS, S., GUNHAN, O. The effect of physiological root resorption on repair potential of primary tooth pulp. *J. Clin. Pediat.*, 1999; 23(3): 227-233.

## 8. Figuras e Legendas

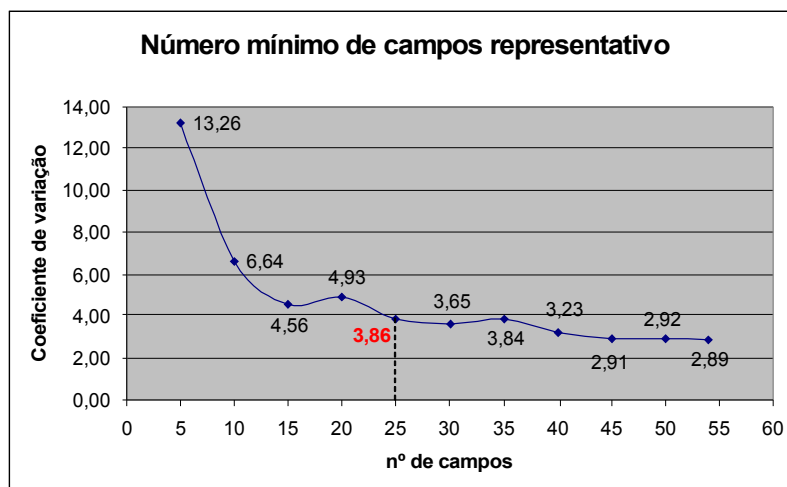
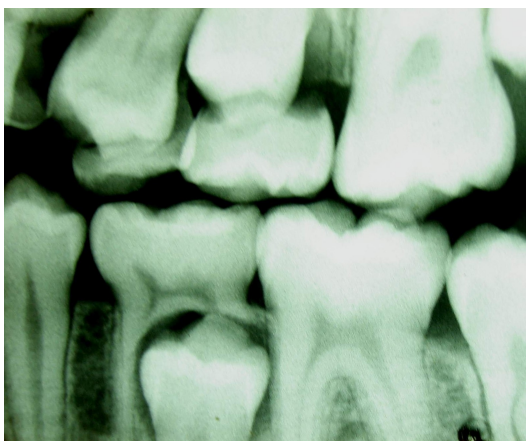


Figura 1: Resultado da Análise para determinação do número mínimo representativo de campos.

**A**



**B**

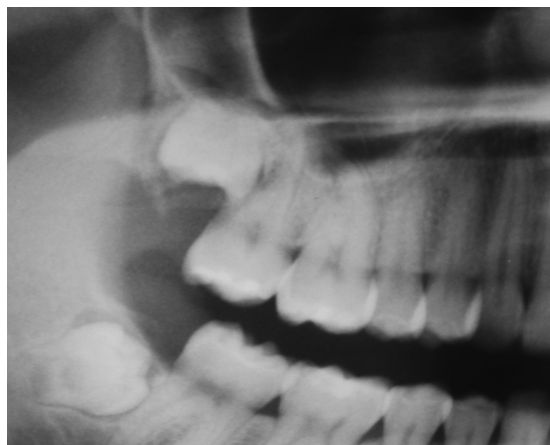


Figura 2: Radiografias exibindo (A): Dentes decíduos humanos com mais de 1/3 de suas raízes com reabsorção fisiológica; (B). Terceiros molares permanentes com rizogênese incompleta.

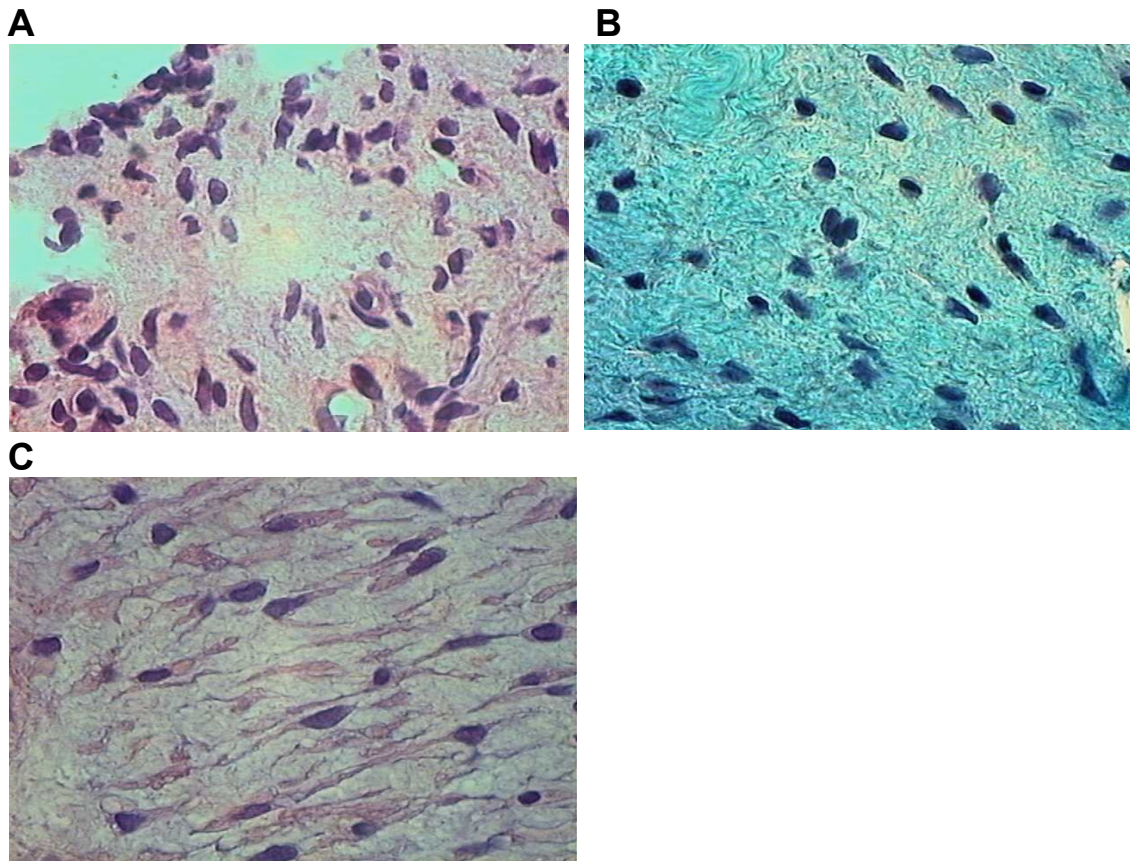


Figura 3: Fotomicrografias de tecido pulpar de dente decíduo em HE (A) e em TG (B) e de dente permanente humano (C) corada em HE. Em A e B observam-se, com freqüência, figuras típicas de células em apoptose com retração, presença de halo claro circundando a célula e núcleos condensados. Tais características são encontradas em menos intensidade na fotomicrografia de dentes permanentes (C). (aumento de 1000x).

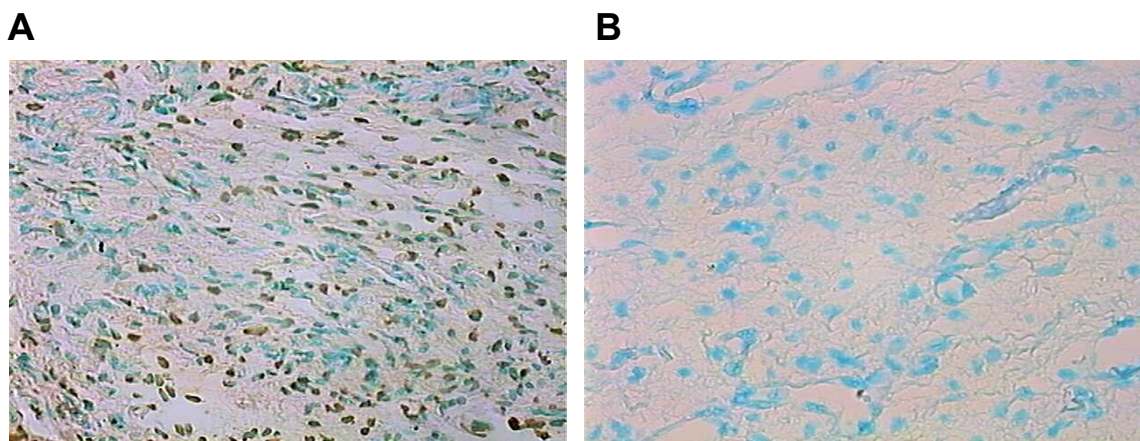


Figura 4: Fotomicrografias de tecido pulpar de dente decíduo humano (A) com reabsorção radicular fisiológica, apresentando intensa marcação difusa para fragmentação do genoma e de tecido pulpar de dente permanente (B) apresentando marcação escassa ou insignificante (TUNEL; aumento de 400x; contra coloração com verde de metila).

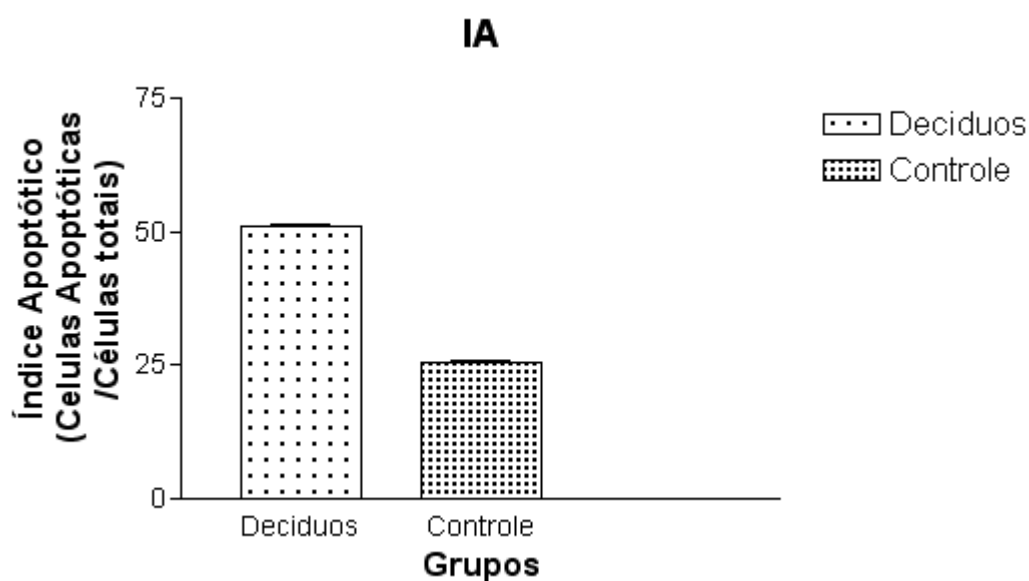


Figura 5: Gráfico do Índice Apoptótico obtido de tecido pulpar de dentes decíduos com reabsorção radicular fisiológica e de tecido pulpar de dentes permanentes (controle).

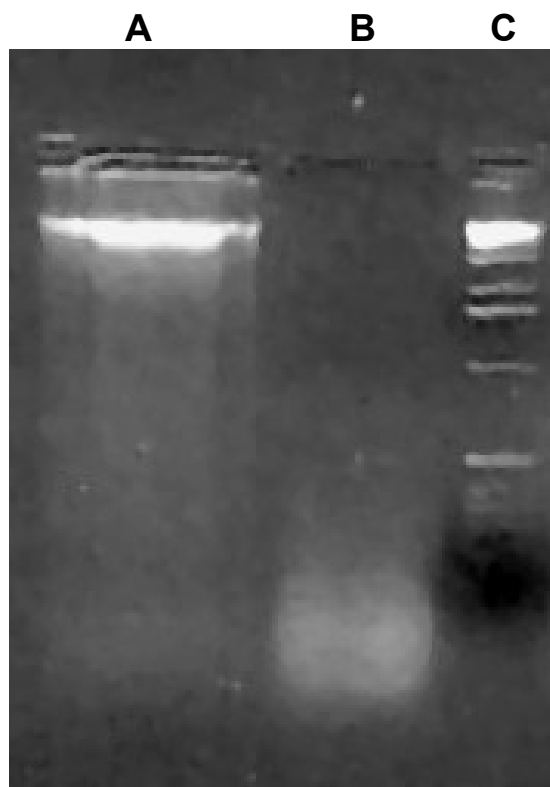


Figura 6: Eletroforese de DNA genômico extraído de polpas de dentes decíduos (trilha B) e de dentes permanentes (trilha A) em gel de agarose corado com brometo de etídeo e digitalizado sob transiluminação com ultravioleta. Marcador de 200 pares de base (trilha C). Na trilha B verificou-se uma maior intensidade de DNA de baixo peso molecular na trilha, indicando intensa fragmentação desse DNA genômico. Nas amostras pulpares de dentes permanentes (trilha A) observou-se grande quantidade de DNA de alto peso molecular no início da trilha, indicando que a fragmentação do DNA genômico foi bem mais discreta.