

RICARDO REIS OLIVEIRA

**“Resposta imune a agentes
clareadores e reparadores
dentais.”**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE
2012**

RICARDO REIS OLIVEIRA

**“Resposta imune a agentes clareadores
e reparadores dentais.”**

**Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação da
Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor em Odontologia- área de
concentração em Endodontia.**

Orientador: Prof. Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho.

Coorientador(a): Prof Dra. Leda Quercia Vieira.

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA

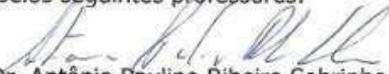
O48r	Oliveira, Ricardo Reis.
2012	Resposta imune a agentes clareadores e reparadores dentais
T	[manuscrito] / Ricardo Reis Oliveira. – 2012. 95 f.: il.
	Orientador: Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho Co-orientador: Leda Quercia Vieira Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.
	1. Clareamento dental. 2. Reabsorção de dente. 3. Osteoclastos. 4. Reabsorção óssea. I. Ribeiro Sobrinho, Antônio Paulino. II. Vieira, Leda Quercia. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.
	BLACK D047

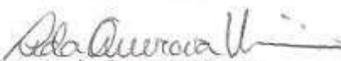
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Odontologia - UFMG

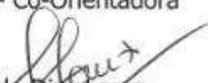


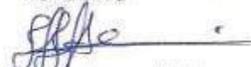
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE DONTOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

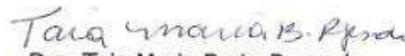
Tese intitulada "*Resposta imune a agentes clareadores e reparadores dentais*", área de concentração em **Endodontia**, apresentada por **Ricardo Reis Oliveira**, para obtenção do grau de **Doutor em Odontologia**, **APROVADA** pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes professores:

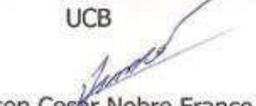

Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho
FO-UFMG - Orientador

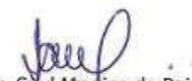

Dra. Leda Quercia Vieira
ICB-UFMG - Co-Orientadora


Dr. Lincoln Dias Lanza
FO-UFMG


Dr. Hugo Henriques Alvim
FO-UFMG


Dra. Taia Maria Berto Rezende
UCB


Dr. Gilson Cesar Nobre Franco
UNITAU


Prof. Dr. Saul Martins de Paiva
Coordenador do Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Belo Horizonte, 30 de agosto de 2012.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 Faculdade de Odontologia
 Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
 Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
 Belo Horizonte - MG - 31.270-901
 Tel: (31) 3409 2470 Fax: (31) 3409 2472
 www.odonto.ufmg.br - odonto-posgrad@ufmg.br



Ata da Comissão Examinadora para julgamento da Tese de Doutorado em Odontologia, área de concentração em **Endodontia**, do candidato **Ricardo Reis Oliveira**.

Aos 30 de agosto de 2012, às 14:00 h, na sala de Pós-Graduação (3418) da Faculdade de Odontologia, reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, Dra. Leda Quercia Vieira, Dr. Lincoln Dias Lanza, Dr. Hugo Henriques Alvim, Dra. Taia Maria Berto Rezende e Dr. Gilson Cesar Nobre Franco. O Professor Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, Orientador da Tese, na qualidade de Presidente da sessão, apresentou a Comissão Examinadora e declarou abertos os trabalhos. Ao candidato foi dado o tempo de até 50 (cinquenta) minutos para fazer a exposição oral sobre o seu trabalho **"Resposta imune a agentes clareadores e reparadores dentais"**. Encerrada a exposição, foi iniciada a arguição, dentro do limite de tempo de 30 (trinta) minutos, pelos Professores Dr. Lincoln Dias Lanza, Dr. Hugo Henriques Alvim, Dra. Taia Maria Berto Rezende e Dr. Gilson Cesar Nobre Franco, com limite de 30 (trinta) minutos para a resposta. Terminadas as arguições, o Presidente suspendeu os trabalhos por 10 minutos para que os examinadores pudessem decidir pelo resultado a ser dado ao candidato. A Comissão Examinadora opta pela *aprovação* do candidato. Para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada por mim, Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, Presidente e pelos demais membros desta comissão examinadora. Belo Horizonte, 30 de agosto de 2012.

Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho
 FO-UFMG - Orientador

Dra. Leda Quercia Vieira
 ICB-UFMG - Co-Orientadora

Dr. Lincoln Dias Lanza
 FO-UFMG

Dr. Hugo Henriques Alvim
 FO-UFMG

Dra. Taia Maria Berto Rezende
 UCB

Dr. Gilson Cesar Nobre Franco
 UNITAU

Confere com o original

12/04/12

Elizabeth Soares Telles
 Secretária do Colegiado do Programa
 de Pós-Graduação em Odontologia-FO/UFMG
 SIAPE 0321131

Homologado pelo Colegiado do
 Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Em reunião de 12/09/12

Dedicatória

À minha família,

À **minha esposa**, companheira, incentivadora incondicional, que pacientemente entendeu minha ausência por diversos momentos. Agradeço por todos os momentos onde trouxe luz e sentido. Quero você sempre ao meu lado.
Amo você, **Andressa!**

À minha mãe **Angela**, muito obrigado por todo amor e apoio. Sem você nada disso seria possível

À minha avó **Nair**, pelo carinho incondicional e exemplo de vida.
Me orgulho de ser seu neto.

À minha irmã **Renata**, por torcer por mim, de perto ou de longe.
E pelo meu **sobrinho Thiago**.

À **Silvana, Angela e Carlínha**, pelo carinho, apoio e por terem se tornado tão importantes na minha vida

A **toda a minha família**, por compreender e apoiar sempre.

Amo vocês!

Agradecimentos Especiais

À professora Doutora Leda Quercia Vieira, acima de tudo pelo carinho e acolhimento. Pela oportunidade, paciência e incentivo. Por nos receber não apenas como alunos, mas também como filhos.

Ao professor Doutor Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, pela grande capacidade e discernimento ao conduzir a orientação de um amigo. Obrigado pelo constante incentivo, disponibilidade, por ser sempre tão verdadeiro e bem intencionado.

Aprendi muito com vocês. Sinto me honrado pelos orientadores que ambos foram para mim.
À vocês dois externo minha eterna gratidão.
Nunca os esquecerei!

Aos **professores: Lincoln, Luiz Thadeu e Rodrigo**, eternos mestres, amigos companheiros e pais odontológicos. Vocês foram e serão sempre fonte de inspiração e de incentivo. Agradeço pelos ensinamentos e pelos momentos que engrandeceram muito a minha vida. Com vocês três aprendi muita odontologia, mas acima de tudo muito sobre a vida.
Serei eternamente grato.

Agradecimentos

Ao curso de Doutorado em Odontologia, pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao Laboratório de Imunologia e Gnotobiologia (LAGI) que forneceu toda a estrutura para a realização desta pesquisa.

Aos meus amigos e companheiros de Doutorado: Luiz Carlos e Warley Tavares, pelo constante incentivo, cumplicidade e valorosos momentos de convivência.

Aos meus colegas de Pós-graduação: Kamilla, Fabiano, Esdras e Luciana pela amizade e disponibilidade.

Aos alunos de iniciação científica: Virgínia, Rose, Tamires e Diogo, por toda ajuda.

Aos meus colegas do LAGI: Matheus, Waldionê, Paula, Grazielle, Lílíane, Leonardo, Yuri, Ana Clara, Louisa, Claudia, Marcello, pela parceria e ensinamentos compartilhados.

À Taia e Sônia, grande parte disso começou com vocês. Muito obrigado.

Às instituições que possibilitaram minha capacitação:
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior (CAPES), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A Deus por me conceder mais esta oportunidade.

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram no decorrer desta caminhada.

Resumo

Embora eficientes quanto ao aspecto estético, as técnicas de clareamento endógeno ainda apresentam graus variáveis de toxicidade e muitas vezes podem levar ao desenvolvimento de reabsorção cervical inflamatória. Neste estudo, avaliou-se a resposta imune aos efeitos da aplicação de agentes clareadores tradicionalmente utilizados na clínica, assim como os de agentes reparadores utilizados no tratamento destas alterações. Inoculou-se, os agentes clareadores, perborato de sódio misturado ao peróxido de hidrogênio [20 volumes] (PS+H₂O₂ 20V) e peróxido de carbamida [37%] (PC), na calvária de camundongos. Após 7 e 14 dias, extraiu-se as calvárias, fez-se a marcação histológica do tecido para a enzima TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) e a quantificação de citocinas, por PCR em tempo real. No mesmo modelo, testou-se os efeitos dos agentes reparadores MTA, Emdogain[®] e Geristore[®]. As calvárias foram extraídas após 14 e 21 dias, analisando-se a expressão gênica (PCR em tempo real) de citocinas. Os resultados demonstraram que PS+H₂O₂ 20V e PC induziram a expressão de TRAP pelos osteoclastos da calvária em ambos os períodos avaliados. A expressão gênica de RANKL, TNF- α , IL-6 e IL-4 foi induzida nos 7^o e 14^o dias após aplicação de PC. No 14^o dia este agente induziu alta expressão de IFN- γ , comparativamente ao tratamento com PS+H₂O₂ 20V. Este último, por sua vez, induziu expressão de RANKL e TNF- α , no 7^o e 14^o dia experimental. PS+H₂O₂ 20V induziu baixa expressão de IL-6 e IFN- γ no 14^o dia. Quanto aos agentes reparadores, observou-se que o Emdogain[®] suprimiu a expressão das citocinas (RANKL, RANK, OPG, IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-4 e TGF- β) avaliadas no 14^o dia. O MTA não induziu ou suprimiu a expressão das citocinas no primeiro momento

avaliado. O tratamento com Geristore[®] não alterou ou suprimiu a expressão gênica dos mediadores avaliados em ambos os períodos, com exceção de TNF- α (14^o e 21^o dias), IL-6 e IL-4, no 14^o dia. No segundo momento a indução dos mediadores RANKL, RANK, OPG, IL-6, IFN- γ , IL-10 e IL-4, observada em resposta ao Emdogain[®], foi significativamente menor do que aquela observada frente ao tratamento com MTA. Em contrapartida, neste mesmo período, o MTA induziu uma expressão de TGF- β , discretamente menor que o Emdogain[®], além de não induzir expressão de TNF- α em nenhum dos períodos.

Conclui-se, que o modelo utilizado neste estudo, pioneiro em avaliar os efeitos de agentes clareadores e reparadores sobre a atividade de células ósseas, foi capaz de mimetizar a ação destes agentes, permitindo a avaliação longitudinal dos mediadores envolvidos nos fenômenos de reabsorção e reparação ósseos.

Palavras chave: Clareamento Endógeno, Reabsorção Cervical Externa, Osteoclastos, Resposta Imune, Reparo Ósseo, MTA, Geristore, Emdogain.

Abstract

Immune response to dental bleaching agents and repairers

The endogenous bleaching techniques present varying degrees of toxicity and can often lead to development of cervical inflammatory resorption. In this study, it was evaluated the immune response to the application of bleaching agents.. Additionally it was studied the same parameters in regards to repairing agents used in the treatment of cervical resorption. It was inoculated the bleaching agents, sodium perborate mixed with hydrogen peroxide [20 volumes] (PS+H₂O₂ 20V) and carbamide peroxide [37%] (PC) in the skullcap of mice. After 7 and 14 days, calvaria have been extracted: tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) expression was defined by histology and cytokines were assayed by real time PCR. Using the same animal model, it was evaluated the effects of repairing agents MTA, Emdogain[®] and Geristore[®] in regards to cytokine expressions, at 14 and 21 days after surgical procedures. The results showed that PS+H₂O₂ 20V and PC induced the expression of TRAP in both periods. The gene expression of RANKL, TNF- α , IL-6 and IL-4 was induced by PC at 7 and 14 days. On the 14th day this agent induced higher expression of IFN- γ than PS+H₂O₂ 20V. The gene expression of RANKL and TNF- α were induced by PS+H₂O₂ 20V on the 7th and 14th day. On the other hand, this agent induced low expression of IL-6 and IFN- γ at 14 days. Concerning to repairing agents, it was observed Emdogain[®] suppressed the gene expression of RANKL, RANK, OPG, IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-4 and TGF- β , on the 14th day. MTA did not induce or suppress the expression of cytokines on the 14th day. Geristore[®] did not alter or suppress the gene expression of all mediators, in both periods, except for TNF- α (14 and 21 days), IL-6 and IL-4 on the 14th day. The induction of RANKL, RANK, OPG, IL-6, IFN- γ , IL-10 and IL-4 was observed in response to Emdogain[®],

on the 21th day. However, it was significantly lower than that observed to MTA. In contrast, in this same period, the MTA induced expression of TGF- β , slightly lower than the Emdogain[®], and it did not induce the expression of TNF- α in any period.

We can conclude the model used in this study, a pioneer in evaluating the effects of bleaching agents and repairers on the activity of bone cells, was able to mimic the action of these agents, allowing longitudinal evaluation of the mediators involved in the phenomena of bone resorption and repair.

Lista de figuras

Figura 01.....	página 39
Figura 02.....	página 41
Figura 03.....	página 43
Figura 04.....	página 43
Figura 05.....	página 50
Figura 06.....	página 51
Figura 07.....	página 51
Figura 08.....	página 52
Figura 09.....	página 53
Figura 10.....	página 53
Tabela 01.....	página 54
Figura 11.....	página 55
Figura 12.....	página 55
Figura 13.....	página 56
Figura 14.....	página 56
Figura 15.....	página 57
Figura 16.....	página 57
Figura 17.....	página 58
Figura 18.....	página 58
Figura 19.....	página 58
Tabela 02.....	página 59

Lista de abreviaturas e siglas

1. APC: célula apresentadora de antígeno
2. CD: cluster of differentiation
3. DEPC: dietilpirocarbonato
4. H₂O₂: peróxido de hidrogênio
5. IL-: interleucina
6. IFN-: interferon
7. Ig: imunoglobulina
8. M1: macrófago do tipo 1
9. M2: macrófago do tipo 2
10. M-CSF: fator estimulador de colônias de monócitos
11. MTA: Mineral trioxide aggregate
12. N- κ B: Fator nuclear Kappa B
13. NK: natural Killer
14. NO: óxido nítrico
15. OPG: osteoprotegerina
16. P.A. : pura para análise
17. P.C.: peróxido de carbamida
18. P.S.: perboradto de sódio
19. PG-: prostaglandina
20. PMN: leucócitos polimorfonucleares
21. ROIs: radicais livres de oxigênio
22. RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B
23. RANK: receptor ativador do fator nuclear Kappa B
24. TGF-: fator de transformação de crescimento
25. Th: célula T-auxiliar (T-helper)
26. TNF: fator de necrose tumoral
27. TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato
28. TREM: receptor de transdução expresso em células mielóides
29. Treg: célula T regulatória

Sumário

1. Introdução.....	página 12
2. Revisão de literatura.....	página 15
3. Objetivos.....	página 34
4. Metodologia.....	página 36
4.1 Caracterização do projeto.....	página 36
4.2 Plano Amostral.....	página 38
4.3 Fármacos utilizados.....	página 39
4.4 Animais.....	página 39
4.5 Anestesia.....	página 39
4.6 Procedimentos cirúrgicos utilizados na inoculação dos Agentes Clareadores.....	página 40
4.7 Procedimentos cirúrgicos utilizados na experimentação dos agentes reparadores.....	página 41
4.8 Procedimentos para análise de PCR em Tempo Real.....	página 44
4.9 Análise Histológica (experimento com agentes clareadores).....	página 47
4.10 Análise estatística.....	página 48
5. Resultados.....	página 40
6. Discussão.....	página 60
7. Conclusão.....	página 73
8. Referências bibliográficas.....	página 75