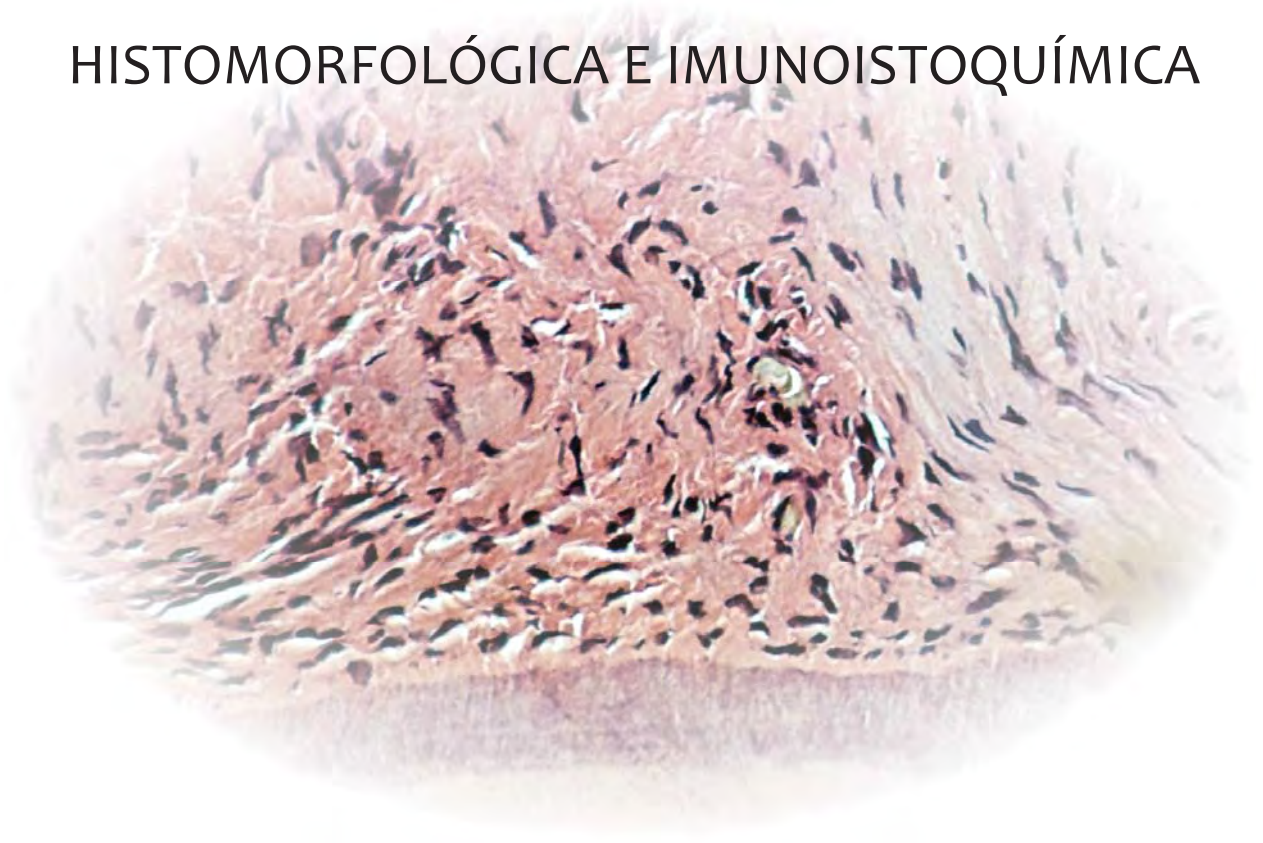


Elizane Ferreira Hamanaka

RESVERATROL COMO MEIO DE CONSERVAÇÃO
PARA DENTES AVULSIONADOS: ANÁLISE
HISTOMORFOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA



ARAÇATUBA – SP
- 2010 -

Elizane Ferreira Hamanaka

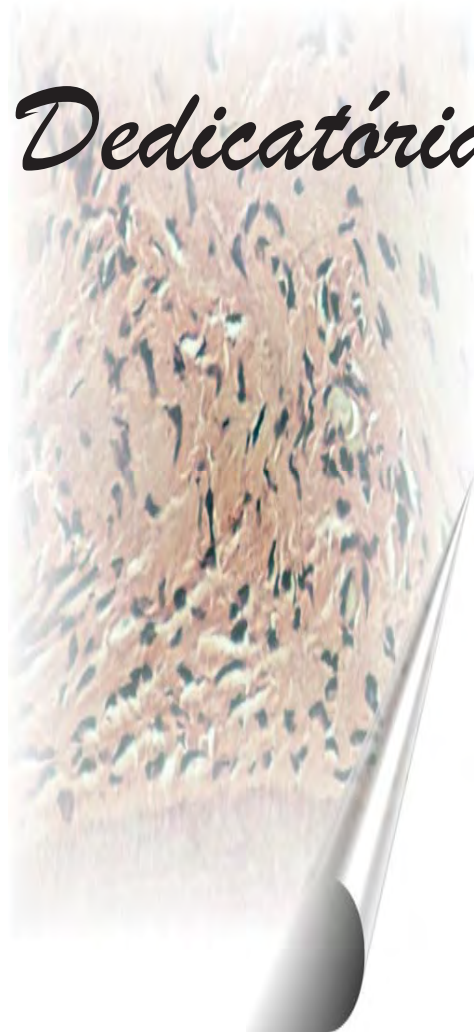
RESVERATROL COMO MEIO DE CONSERVAÇÃO PARA DENTES AVULSIONADOS: ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Unesp, para a obtenção do Grau de “Mestre em Odontologia” – Área de Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Adj. Wilson Roberto Poi
Coorientadora: Prof. Roberta Okamoto

ARAÇATUBA – SP
- 2010 -

Dedicatória



Dedicatória

A Deus,

*por sempre iluminar meu caminho e me conceder força para
continuar lutando em busca das conquistas da minha vida.*

Aos meus pais Luiz e Neuza,

por todo amor, carinho, incentivo, confiança e dedicação.

*Vocês sempre me apoiaram em minhas decisões, e se
esforçaram muito para que eu conseguisse alcançar meus
objetivos. Muito obrigada por tudo! Amo vocês!*

Aos meus irmãos Fabrício e Liziane,

por toda amizade, carinho, amor, paciência e convivência maravilhosa. Tenho muito orgulho de vocês! E tenho muito a lhes agradecer pelo incentivo e apoio em momentos difíceis.

Ao meu namorado Alessandro,

pelo amor, compreensão, incentivo, carinho e amizade. Você se tornou uma pessoa muito importante em minha vida. Te amo!

Agradecimentos Especiais



Agradecimentos Especiais

Ao Meu Orientador Wilson Roberto Poi,

Palavras nunca serão suficientes para expressar a intensidade dos meus sentimentos de gratidão, admiração e carinho. Agradeço a Deus por ter lhe colocado em meu caminho. Muito obrigada pela amizade, pelos conselhos, pelo incentivo, proteção, por acreditar em mim e não me deixar desistir. Obrigada por todo carinho, cuidado, apoio, paciência, compreensão e pela convivência extremamente agradável. Obrigada pelos ensinamentos científicos, pela ajuda profissional... Enfim, obrigada por tudo!

À Minha Coorientadora Roberta Okamoto,

Pelo carinho, amizade, colaboração, inestimável ajuda e pelas análises críticas de extrema importância na qualificação desta dissertação.

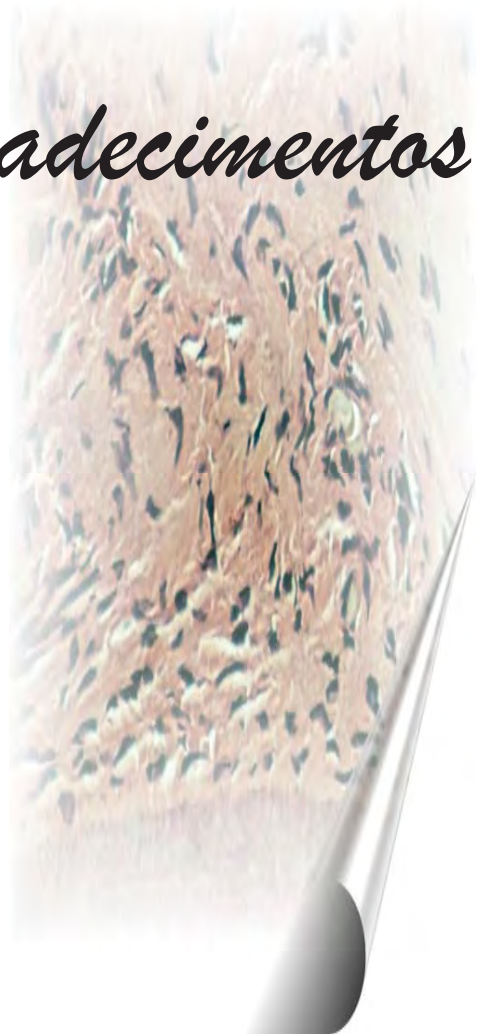
À minha amiga Lucieni Campoli Alves Furlan, pela convivência maravilhosa. Compartilhamos alegrias, angústias, experiências, aprendizado... Muito obrigada pela verdadeira amizade, companheirismo, força, incentivo, apoio e carinho. Você é minha irmã de coração!

Às minhas amigas Carolina Lunardelli Trevisan e Daniela Maria de Mendonça Janjacom. Obrigada pela convivência, companheirismo e amizade.

Às minhas amigas Juliana Aparecida Delben, Kizzy dos Santos Fernandes, Patricia Antunes e Roberta Lopes Zingaro. A distância não abalou nossa amizade sincera de todos esses anos. Obrigada pelos momentos inesquecíveis, pelo apoio e carinho. Vocês são pessoas muito especiais!

À todos os meus familiares e amigos que me incentivaram e apoiaram nesta importante etapa da minha vida. Muito obrigada!

Agradecimientos



Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Clínica Integrada, aos professores: Celso Koogi Sonoda, Sônia Regina Panzarini Barioni, Denise Pedrini, José Carlos Monteiro de Castro e Daniela Brandini pela amizade, carinho, convivência e por todo o aprendizado. Vocês são grandes exemplos, pessoas que admiro muito!

Ao professor Dr. Tetuo Okamoto pelo ensinamento, orientação, atenção, disponibilidade e contribuição para esse trabalho.

Aos colegas do Curso de pós-graduação pela convivência e companheirismo.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Unesp: Ana Cláudia, Isabel, Izamar, Ivone, Cláudia e Luzia, pela ajuda e atenção.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Maria Dirce Colli Boatto, Gilmar Martins de Oliveira e Paulo Roberto Gratão, pela inestimável ajuda durante a realização deste trabalho.

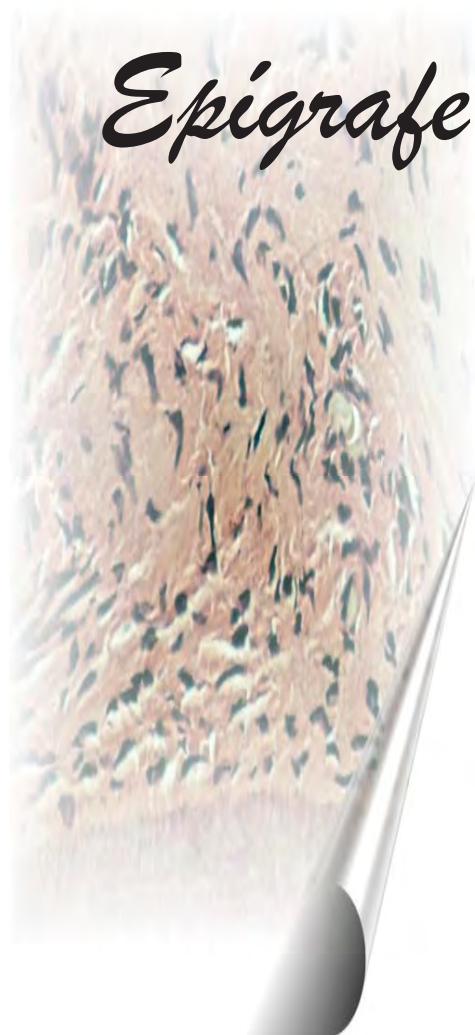
À funcionária Antonia Ferreira Artioli, uma pessoa maravilhosa que sempre me apoiou desde a época da graduação. Obrigada pelo carinho!

À aluna da graduação Paula Ervolino da Silva, por toda ajuda e paciência durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Unesp: Valéria de Zueiroz M. Zagatto e Diogo Luís Reatto, pela assistência e atenção.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pelo auxílio financeiro que viabilizou a realização desse trabalho de pesquisa.

Επίγραφε



Epígrafe

“ Bom mesmo é ir a luta com determinação,

Abraçar a vida com paixão,

Perder com classe e vencer com ousadia,

pois o triunfo pertence a quem se atreve. . .

A vida é muito para ser insignificante. ”

Charles Chaplin

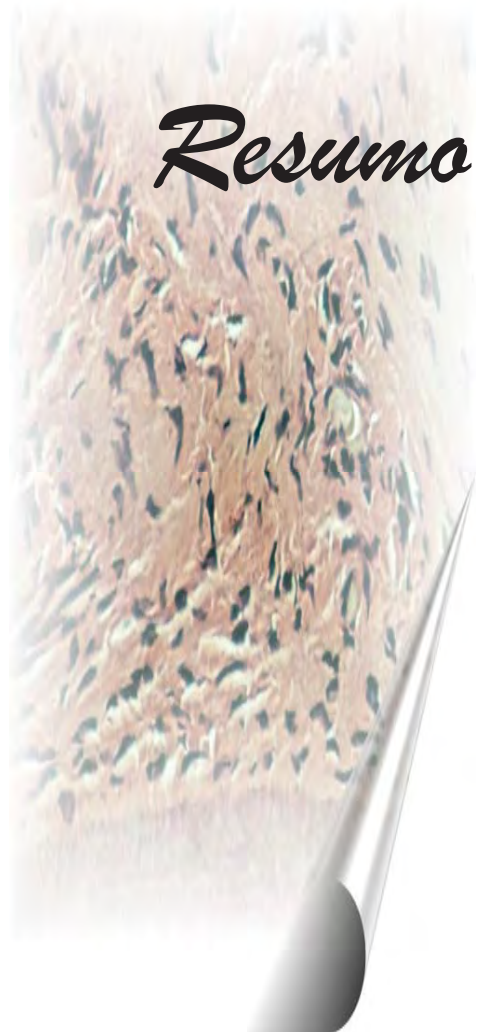
Sumário

Resumo	19
Abstract	22
1. Introdução	25
2. Proposição	30
3. Material e Método	32
4. Resultado	38
5. Discussão	45
6. Conclusão	51
7. Referências	53
Anexo A – Comissão de Ética	62
Anexo B – Ilustração da Fase Experimental	63

Lista de Figuras

FIGURA 1 - Teste de solubilidad.	34
FIGURA 2 - Grupo I – imediato.	40
FIGURA 3 - Grupo II – resveratrol 1 hora.	41
FIGURA 4 - Grupo III – resveratrol 2 horas.	41
FIGURA 5 - Grupo IV – resveratrol 6 horas.	42
FIGURA 6 - Grupo V – resveratrol 12 horas.	42
FIGURA 7 - Grupo VI – resveratrol 24 horas.	43
FIGURA 8 - Grupo VII – seco 6 horas.	43

Resumo



Resumo

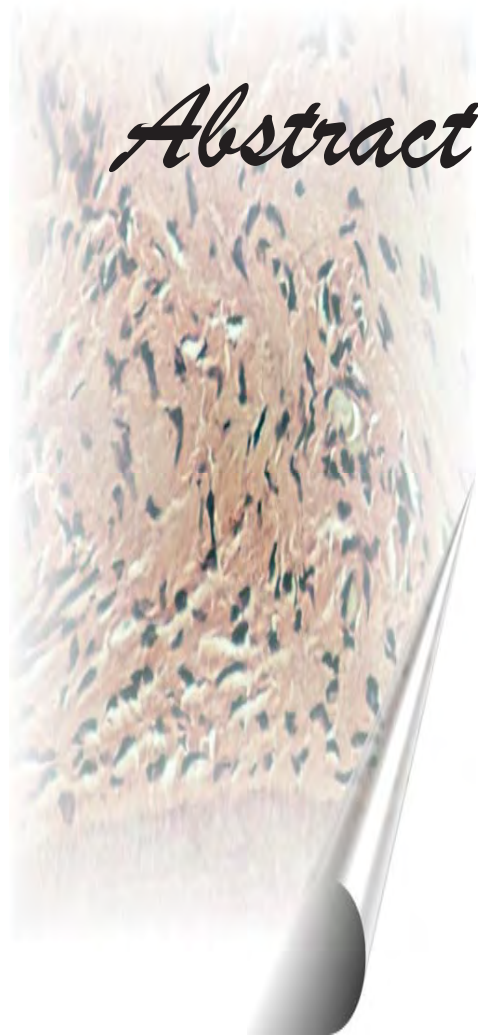
HAMANAKA EF. Resveratrol como meio de conservação para dentes avulsionados: análise histomorfológica e imunoistoquímica, [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2010.

A manutenção da vitalidade do ligamento periodontal cementário é de extrema importância para o sucesso do reimplante dentário. Minimizar o período de exposição do dente avulsionado ao meio seco ou mantê-lo em meio úmido, se constitui em importante conduta para o tratamento. Recentemente, o resveratrol tem sido bastante estudado, em razão das suas propriedades antioxidantes e da sua capacidade de prolongar a vida de diversos organismos desde as leveduras até os mamíferos. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar a manutenção da vitalidade do ligamento periodontal cementário armazenado em resveratrol. Para isso foram empregados incisivos superiores e inferiores de sete macacos, totalizando 56 dentes. No grupo I os dentes foram extraídos e imediatamente imersos em solução fixadora. Nos grupos II a VI os dentes foram imersos em 50mL de solução de resveratrol em propilenoglicol ($5 \mu\text{M/L}$) durante 1, 2, 6, 12 e 24 horas, respectivamente. No grupo VII os dentes foram mantidos em meio seco por 6 horas. Parte dos cortes obtidos foi corada em H.E. para

estudo histomorfológico e outra parte para análise imunoistoquímica utilizando anticorpos primários contra osteopontina e caspase. Os resultados demonstraram que nos grupos imediato e resveratrol 12 horas houve presença de moderado número de fibroblastos, alguns macrófagos e linfócitos. Nos grupos resveratrol 1, 2, 6 e 24 horas houve presença de pequeno número de fibroblastos e discreta vascularização. O grupo seco apresentou ausência de vasos sanguíneos e fibroblastos em degeneração. Houve imunomarcção moderada de osteopontina nos grupos imediato, resveratrol 12 e 24 horas. Nos demais grupos a imunomarcção variou de ausente a leve. Quanto à caspase, foi observada imunomarcção moderada nos grupos resveratrol 1, 2, 6 e 24 horas. No restante dos grupos a imunomarcção variou de ausente a leve. Foi possível concluir que o resveratrol parece ser um bom meio de conservação da vitalidade das células do ligamento periodontal até o tempo de 12 horas.

Palavras-Chave: Reimplante dentário; avulsão dentária; resveratrol.

Abstract



Abstract

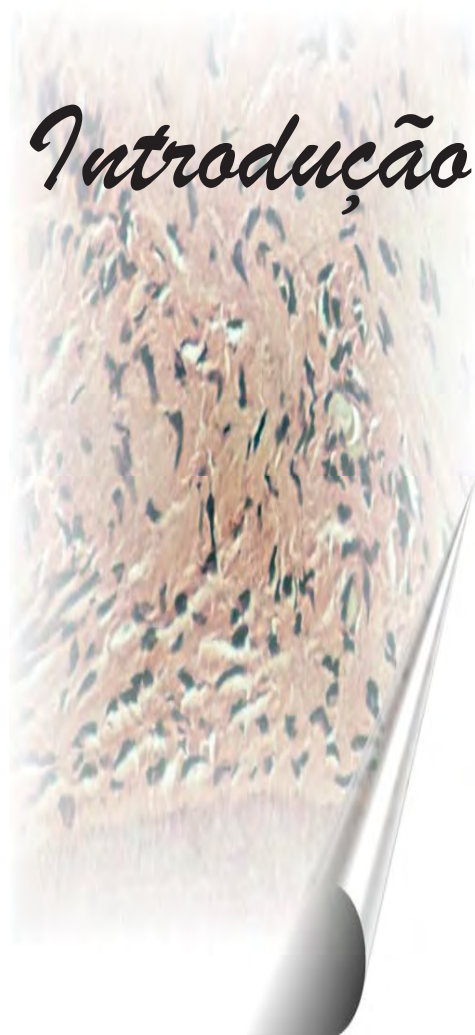
HAMANAKA EF. Resveratrol as storage media for avulsed teeth: histomorphological and immunohistochemical analysis, [dissertation]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, 2010.

The maintenance of vitality of the cement periodontal ligament is important for success of tooth reimplantation. It has been suggested to minimize the period of exposure of the avulsed tooth to dry environment or keep it in wet storage. Recently, resveratrol has been extensively studied due to its antioxidant properties and ability to prolong the lives of several organisms since yeast to mammals. The aim of this study is to evaluate the maintenance of vitality of the cement periodontal ligament stored in resveratrol. The analysis was conducted using maxillary and mandibular incisors of seven monkeys, total of 56 teeth. In group I, the teeth were extracted and immediately immersed in fixative solution. In groups II to VI, the teeth were immersed in 50ml of solution of resveratrol in propylene glycol (5 μ M/L) for 1, 2, 6, 12 and 24 hours; respectively. In group VII, the teeth were maintained in dry environment for 6 hours. Some cuts were stained with HE for histomorphological analysis while

some cuts were submitted to immunohistochemical analysis using primary antibody against osteopontin and caspase. The results demonstrated that in the groups immediate and resveratrol 12 hours showed presence of a moderate number of fibroblasts, some macrophages and lymphocytes. In the groups resveratrol 1, 2, 6 and 24 hours showed presence of small numbers of fibroblasts and mild vascularization. The dry group showed absence of blood vessels and fibroblasts in degeneration. There was moderate immunomarcation of osteopontin in the groups immediate, and resveratrol 12 and 24 hours. In the other groups, immunomarcation ranged from absent to light. Considering the caspase, it was observed moderate immunomarcation in the groups resveratrol 1, 2, 6 and 24 hours. In the remaining groups, immunomarcation ranged from absent to light. It was concluded that the resveratrol may be adequate for maintenance of vitality of cells of periodontal ligament until 12 hours.

Keywords: tooth reimplantation; tooth avulsion; resveratrol.

Introdução



1 Introdução

A

avulsão dentária se constitui em um trauma complexo caracterizado pelo rompimento do feixe vâsculo-nervoso e ligamento periodontal, expondo o dente ao meio externo. Apesar de pouco freqüente entre as agressões traumáticas, pode levar a perda do elemento dentário. A prática de esportes, trabalhos de alto risco e o uso cada vez maior de veículos automotores têm contribuído para isso (1).

O procedimento ideal para tratamento da avulsão é o reimplante dentário, mesmo quando as condições não sejam as mais favoráveis, pois restabelece a função e a estética, mesmo que temporariamente (1). Para se obter um prognóstico favorável, a manutenção da vitalidade do ligamento periodontal é de extrema importância e o reimplante imediato é a melhor opção de tratamento (2). Porém, tal conduta raramente ocorre, seja por conta da extensão do trauma que coloca em risco a vida do paciente, ou devido à complexidade do dano à área receptora e ainda a falta de conhecimento sobre a possibilidade do reimplante dentário (3-7).

Em tais condições, quanto menor o tempo em que o dente avulsionado permanecer em meio seco, melhor o prognóstico, sendo que os melhores resultados foram obtidos para reimplantes feitos em até 5 minutos (5,8). Para contornar esse inconveniente os meios de conservação para manutenção da vitalidade celular têm sido estudados, pois essa capacidade pode ser até mais importante que o tempo extra-alveolar (3,9,10).

O meio de conservação deve estar disponível no momento da avulsão e ser capaz de manter a vitalidade, a capacidade de fixação e a clonogenicidade da célula (11,12). Deve possuir pH e osmolaridade fisiologicamente compatíveis e não provocar danos às células (13,14). Dentre os vários tipos estudados encontramos o Viaspan®, a solução salina balanceada de Hank (15,16), o Eurocollins (17), a própolis (18), a água de torneira (12), a saliva (14,19), o soro fisiológico (20) e o leite (9-11,13,15,16,21).

Alguns meios de conservação como o Viaspan® e a solução salina balanceada de Hank possuem melhores propriedades do que o leite e podem manter a vitalidade das células por longos períodos de tempo (15,16).

Recentemente, um composto tem chamado a atenção dos pesquisadores por apresentar a capacidade de prolongar o tempo de vida das células (22-26). Inicialmente isolado das raízes do heléboro-branco (*Veratrum grandiflorum*), em 1940, o resveratrol (trans-3,5,4'-

triidroxistilbeno), um composto polifenólico natural, é também encontrado em outras plantas incluindo amora, amendoim, castanhas, legumes e, especialmente, na casca das uvas vermelhas. É encontrado em alta concentração em alguns tipos de vinhos elaborados a partir de uvas tintas, podendo alcançar até 14 mg/L. Sendo uma fitoalexina, ou o antibiótico da planta, é produzido em resposta ao estresse, tais como uma infecção por fungos, radiação ultravioleta e alterações de temperatura (27).

Pesquisas têm demonstrado que apresenta potente ação antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana, antiplaquetária, além de efeitos antiproliferativos (26,28,29). Está associado a um grande número de benefícios à saúde, notadamente aqueles que envolvem o envelhecimento, incluindo as doenças neurodegenerativas, câncer e arteriosclerose (30-33).

Achados recentes indicam também benefícios para o sistema cardiovascular (33) tais como a redução do estresse oxidativo do miocárdio (34), a redução da apoptose (35) e o aumento da formação capilar (36).

Esse composto comprovadamente estende a vida de diversos organismos como nematóides (37), leveduras (22,38,39), mosca da fruta (37,40), peixes (41) e camundongos (42).

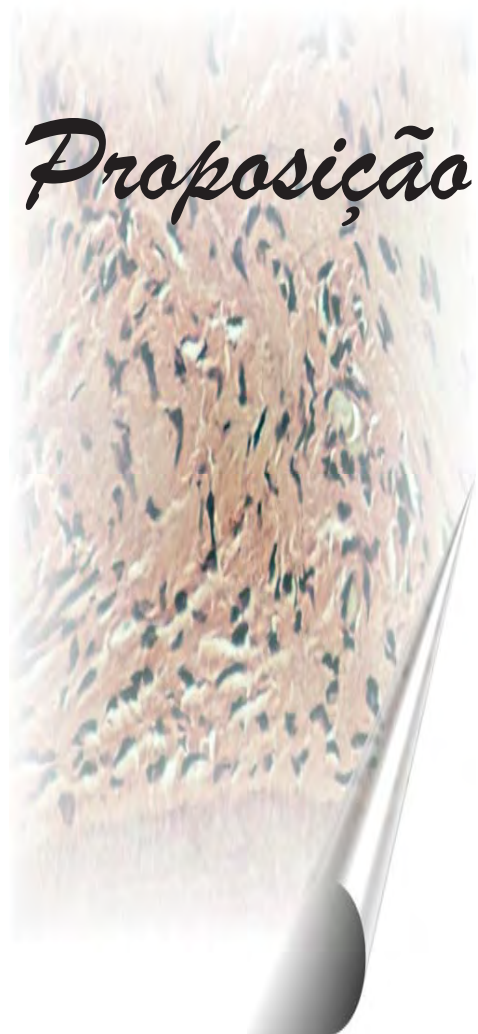
Uma metodologia utilizada para avaliar a manutenção da vitalidade das células é a imunoistoquímica. A cultura de células do ligamento periodontal de camundongos mostrou a sua capacidade de secretar osteopontina, uma glicoproteína fosforilada secretada na matriz

óssea extracelular. Está associada à regulação do processo de mineralização do tecido ósseo, sendo evidenciada em células ósseas (osteoblastos e osteócitos) e em células osteoprogenitoras em proliferação e diferenciação (43). Alguns autores relatam que a osteopontina tem papel importante no processo de regeneração óssea induzido pelas células do ligamento periodontal (44).

As caspases constituem uma família de proteases baseadas em cisteína e desempenham um papel fundamental durante a morte celular por apoptose. São divididas em dois grupos, iniciadoras e efetoras, sendo as últimas responsáveis pela execução do processo em si. Por meio da ação das caspases são gerados, pela reação em cascata, fragmentos característicos da apoptose (45).

Como não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliam a vitalidade celular utilizando o resveratrol como meio de conservação e, em razão das suas propriedades já relatadas, é oportuna a realização deste estudo.

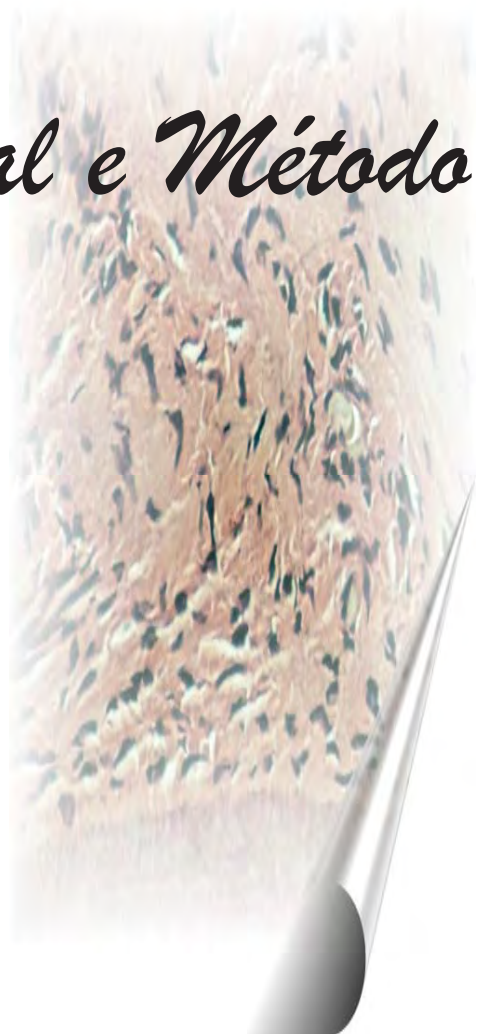
Proposição



2 Proposição

O propósito deste trabalho é analisar a vitalidade das células do ligamento periodontal de dentes de macaco mantidos em resveratrol por vários períodos de tempo, utilizando avaliação histomorfológica e imunoistoquímica.

Material e Método



3 Material e Método

Previamente à sua realização, a metodologia empregada no trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Anexo A). Para a realização deste trabalho foram utilizados os incisivos superiores e inferiores de sete macacos (*Cebus apella*) com boa saúde, adultos, cedidos e alojados no Núcleo de Procriação de Macaco-Prego do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP. Esses animais também foram utilizados em outros estudos experimentais.

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram inicialmente pesados e sedados por meio de inalação de éter sulfúrico (Miyako do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Guarulhos, SP, Brasil), recebendo a seguir 0,1mL de Diazepan (Sigma Pharma, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) intramuscular para promover um relaxamento e, logo após, anestesiados com injeção intraperitonal de Thionembutal (Abbott Laboratórios do Brasil Ltda) na dosagem de 30 mg/kg por peso corporal. Alcançado o

estado de anestesia cirúrgica foi realizada a sindesmotomia, luxação e extração dos incisivos superiores e inferiores, previamente à eutanásia.

Após a extração, os dentes foram divididos em sete grupos (com oito dentes cada):

Grupo I: os dentes foram imersos imediatamente em solução fixadora (formalina a 10%).

Grupo II: os dentes foram imersos em solução de resveratrol por 1 hora.

Grupo III: os dentes foram imersos em solução de resveratrol por 2 horas.

Grupo IV: os dentes foram imersos em solução de resveratrol por 6 horas.

Grupo V: os dentes foram imersos em solução de resveratrol por 12 horas.

Grupo VI: os dentes foram imersos em solução de resveratrol por 24 horas.

Grupo VII: os dentes foram mantidos em meio seco, presos pela coroa dental em uma lâmina de cera utilidade, por um período de 6 horas.

Nos grupos II a VI os dentes foram imersos em 50mL de solução de resveratrol em propilenoglicol (baseado em teste de solubilidade previamente realizado - Figura 1) 5 $\mu\text{M/L}$ (Apothicário Farmácia de

Manipulação, Araçatuba, São Paulo, Brasil), contidos em copos plásticos descartáveis. Todos os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente.



FIGURA 1 – Teste de solubilidade previamente realizado para os seguintes solventes: Tubo 1: Álcool de Cereais (produto completamente solúvel neste solvente); Tubo 2: Propilenoglicol (produto completamente solúvel neste solvente); Tubo 3: Glicerina (produto parcialmente solúvel neste solvente, formando uma suspensão, pouca presença de corpo de fundo); Tubo 4: Sorbitol (produto parcialmente solúvel neste solvente, formando uma suspensão, pouca presença de corpo de fundo); Tubo 5: Saliva Artificial (produto parcialmente solúvel neste solvente, formando uma suspensão, mas sendo menos solúvel do que no Sorbitol e Glicerina, além de formar um corpo de fundo mais volumoso); Tubo 6: Leite (produto pouco solúvel neste solvente, sem formação de uma suspensão perceptível, formando um corpo de fundo equivalente a quase toda a amostra testada).

As peças obtidas foram fixadas em solução de formalina a 10% por 24 horas e descalcificadas em solução de EDTA 4,13% (Ácido

Etileno Diamino Tetracético - pH 7,0, Merck, Darmstadt, Alemanha). O ponto exato da descalcificação foi obtido quando, ao introduzir uma agulha (Terumo Medical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) na coroa de cada dente, a mesma não apresentou resistência. Em seguida, as peças foram embebidas em parafina e submetidas a cortes transversais de 6µm de espessura.

Parte dos cortes obtidos foi corada em hematoxilina e eosina, para análise histomorfológica. A outra parte foi preparada para o processamento imunoistoquímico previamente à adição dos anticorpos primários. Estes foram: anticorpos policlonais de cabra contra a osteopontina – OPN (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, USA) e anticorpos policlonais de cabra contra a caspase 3 (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, USA). O anticorpo secundário utilizado foi o biotinilado anti-cabras, produzido em burros (Pierce Biotechnology, Illinois, USA).

O sinal da reação imunoistoquímica foi amplificado com o sistema avidina-biotina (Kit DAKO, Glostrup, Dinamarca) e a reação foi revelada utilizando a diaminobenzidina (DAB, DAKO Co., Califórnia, USA) como cromógeno, resultando em uma imagem acastanhada. A contracoloração foi obtida com a hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha).

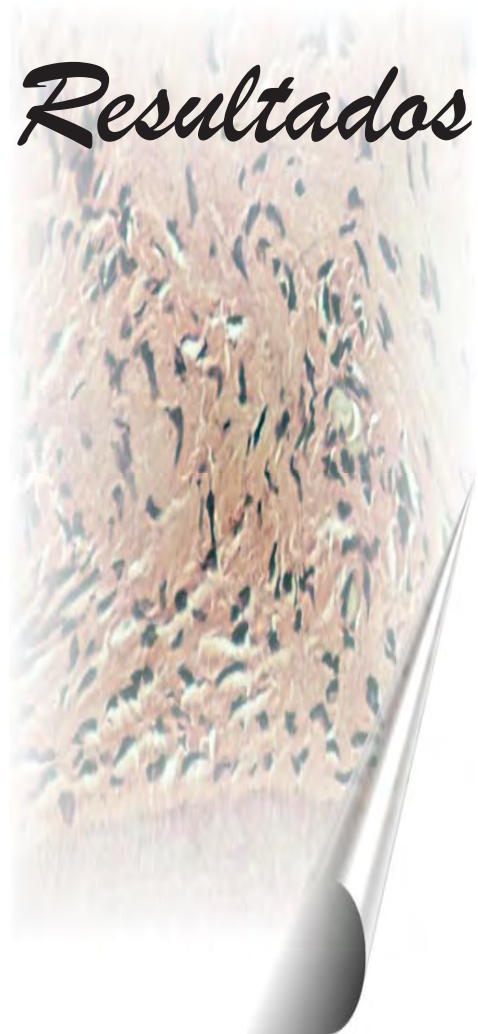
Para todos os grupos foram realizados controles imunoistoquímicos, pela adição apenas do anticorpo secundário após o processamento convencional. O objetivo foi avaliar a efetividade e a especificidade das reações de OPN e caspase 3. Assim, como uma contraprova, se houver marcação no controle, reações inespecíficas estão ocorrendo, inviabilizando a metodologia.

As análises foram realizadas qualitativamente em microscópio de luz. As características do ligamento periodontal foram observadas nos diversos tempos de conservação em resveratrol. Para a análise histomorfológica foram considerados os fibroblastos, as células inflamatórias e os vasos sanguíneos.

Em seguida, para a captura das imagens, foi utilizado o microscópio óptico Leica Aristoplan Microsystems (Leitz, Bensheim, Alemanha) acoplado a uma câmera de captação da imagem (Leica DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrug, Switzerland) conectada a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box, Leica Imaging Manager – IM 50 Demo software).

A análise imunoistoquímica foi realizada com a atribuição de escores, variando de 0 para as lâminas que não apresentaram marcação alguma, 1 para as que apresentaram marcação leve, 2 para moderada e 3 para as lâminas que apresentaram marcações intensas.

Resultados



4 Resultados

Pela análise histomorfológica, o grupo I (imediato) apresentou alguns espécimes com ligamento periodontal bem vascularizado com moderado número de fibroblastos e alguns macrófagos. Em outros espécimes, pode ser notada a presença de feixes de fibras colágenas com moderado número de fibroblastos, ao lado de raros linfócitos e macrófagos (Figura 2).

No grupo II (resveratrol – 1 hora) foi evidenciada, em alguns espécimes, a presença de remanescentes do ligamento periodontal pouco vascularizado, ao lado de pequeno número de fibroblastos e alguns macrófagos e linfócitos (Figura 3). Nos demais espécimes, os remanescentes do ligamento periodontal exibiram pequeno número de fibroblastos e vasos sanguíneos.

O grupo III (resveratrol – 2 horas) apresentou alguns espécimes com áreas ocupadas por remanescente do ligamento periodontal, exibindo pequeno número de fibroblastos ao lado de raros macrófagos e linfócitos (Figura 4). Em outros espécimes, foram observadas extensas

áreas ocupadas por raros fibroblastos. Nas áreas mais próximas à superfície do dente, houve presença de moderado número de fibroblastos.

No grupo IV (resveratrol – 6 horas) uma delgada faixa de tecido conjuntivo é observada em um dos espécimes, com raros fibroblastos e macrófagos e ausência de vasos sanguíneos. Outros espécimes apresentaram remanescente do ligamento periodontal com moderado número de fibroblastos e discreta vascularização (Figura 5).

No grupo V (resveratrol – 12 horas) a maioria dos espécimes apresentou remanescente do ligamento periodontal com elevado número de fibroblastos ao lado de alguns macrófagos e linfócitos (Figura 6). Em um dos espécimes evidenciou-se o remanescente do ligamento periodontal com pequeno número de fibroblastos e ausência de vasos sanguíneos.

No grupo VI (resveratrol – 24 horas) a maioria dos espécimes apresentou o remanescente do ligamento periodontal com pequeno número de fibroblastos, alguns macrófagos e linfócitos (Figura 7). Em todos os casos houve ausência quase total de vasos sanguíneos.

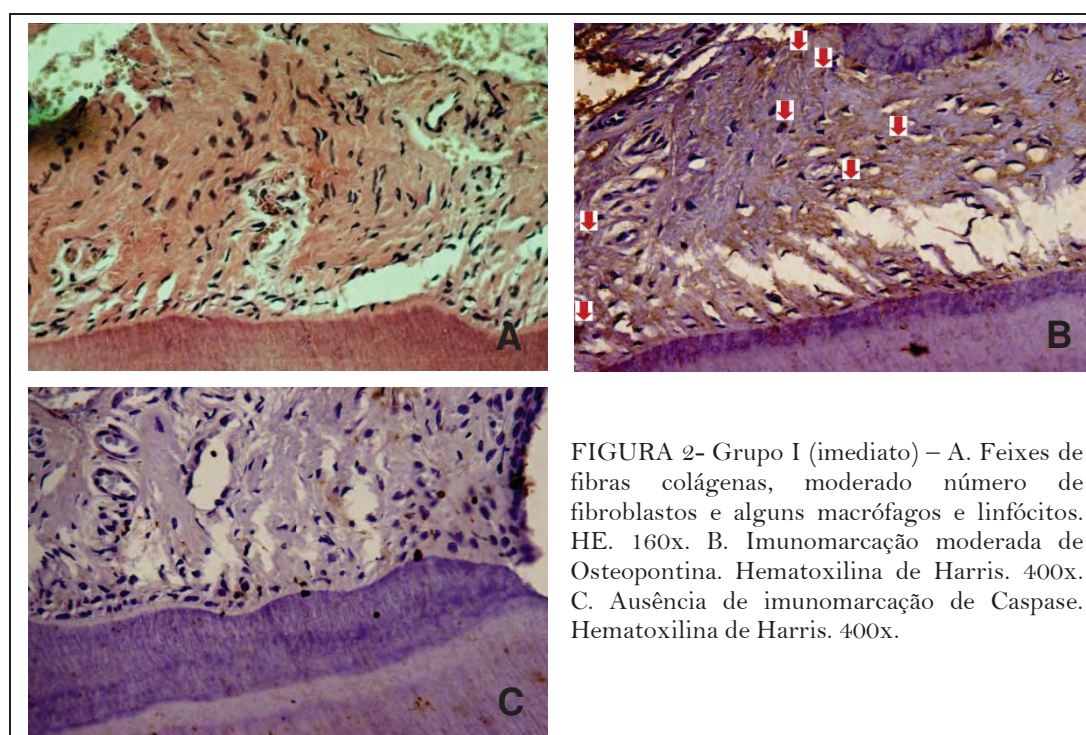
O grupo VII (Seco) mostrou o remanescente do ligamento periodontal com ausência de vasos sanguíneos ao lado de alguns fibroblastos em degeneração (Figura 8).

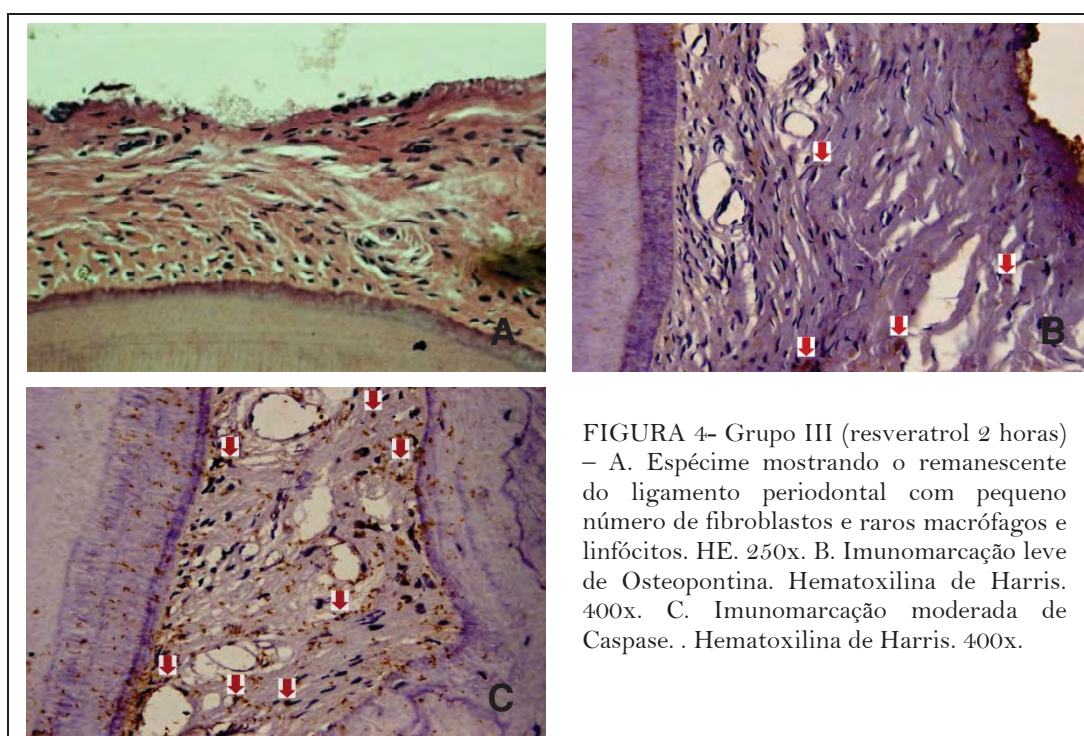
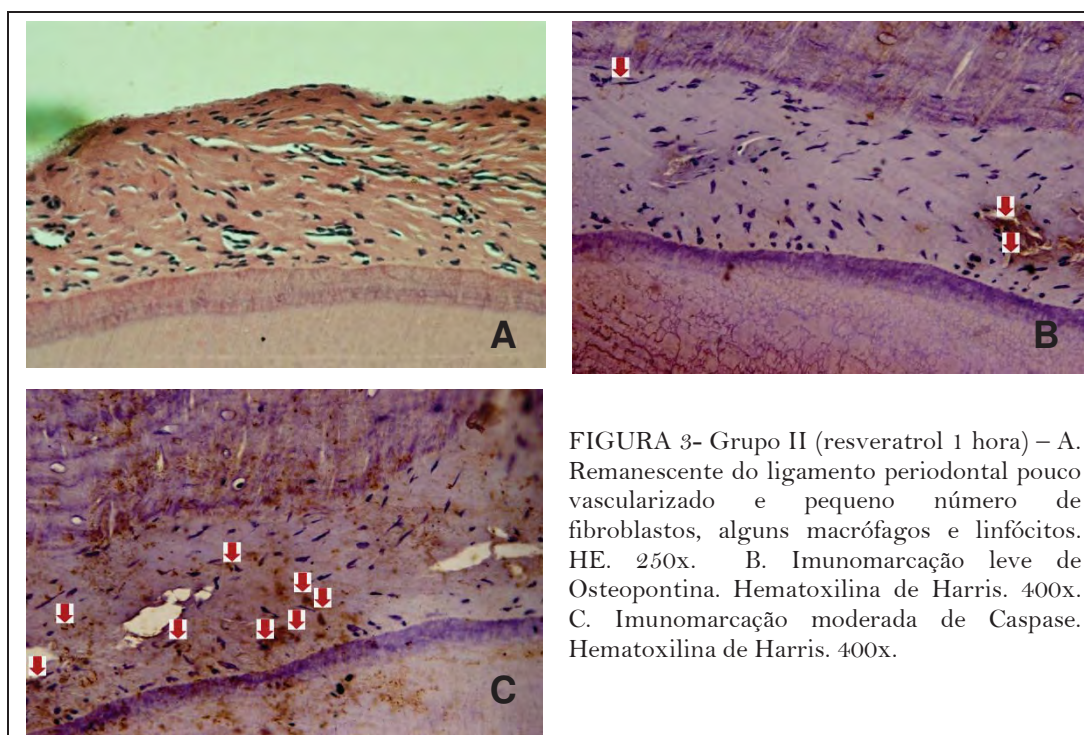
A análise imunoistoquímica mostrou imunomarcacão moderada de Osteopontina nos grupos Imediato, Resveratrol 12 e 24 horas (Tabela 1). Nos demais grupos a imunomarcacão variou de ausente a leve.

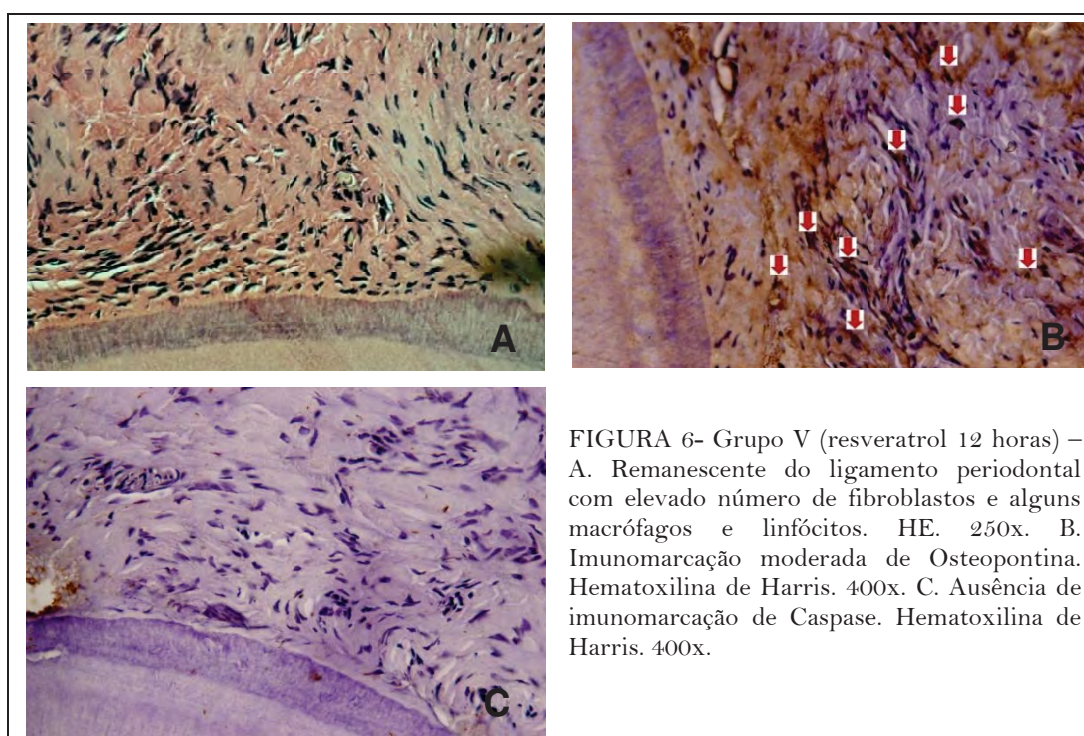
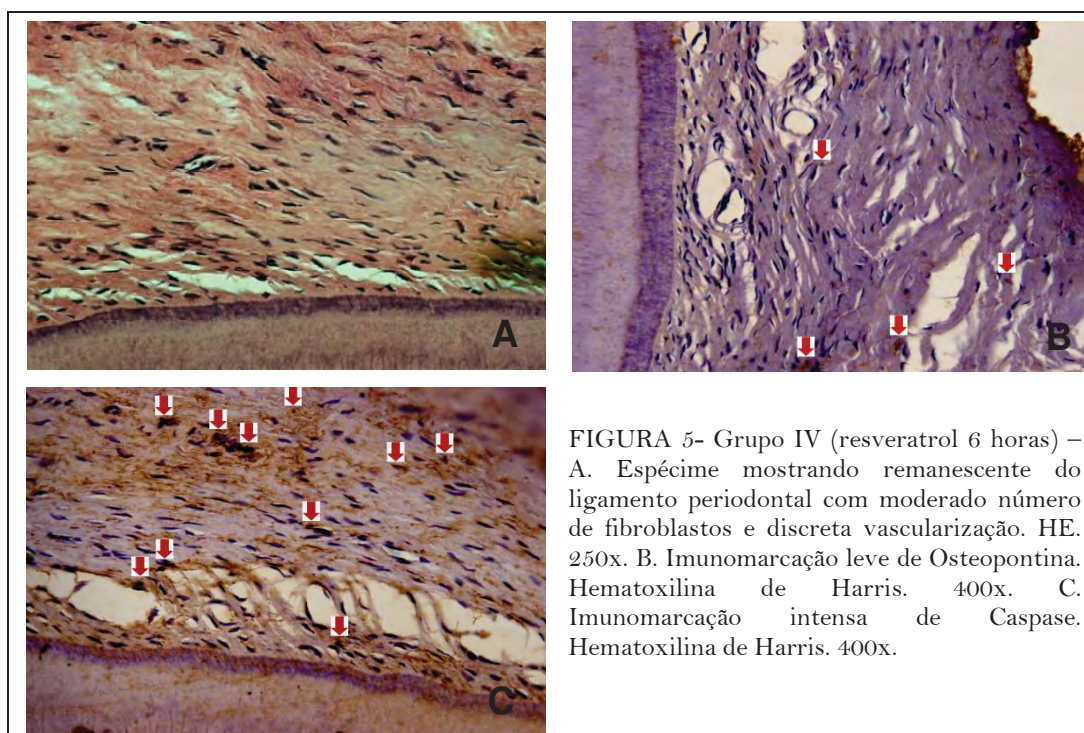
Quanto à Caspase, foi observada imunomarcacão moderada nos grupos Resveratrol 1, 2 e 24 horas. O grupo Resveratrol 6 horas apresentou imunomarcacão variando de moderada e intensa. Já nos grupos Imediato, Resveratrol 12 horas e Seco a imunomarcacão variou de ausente a leve.

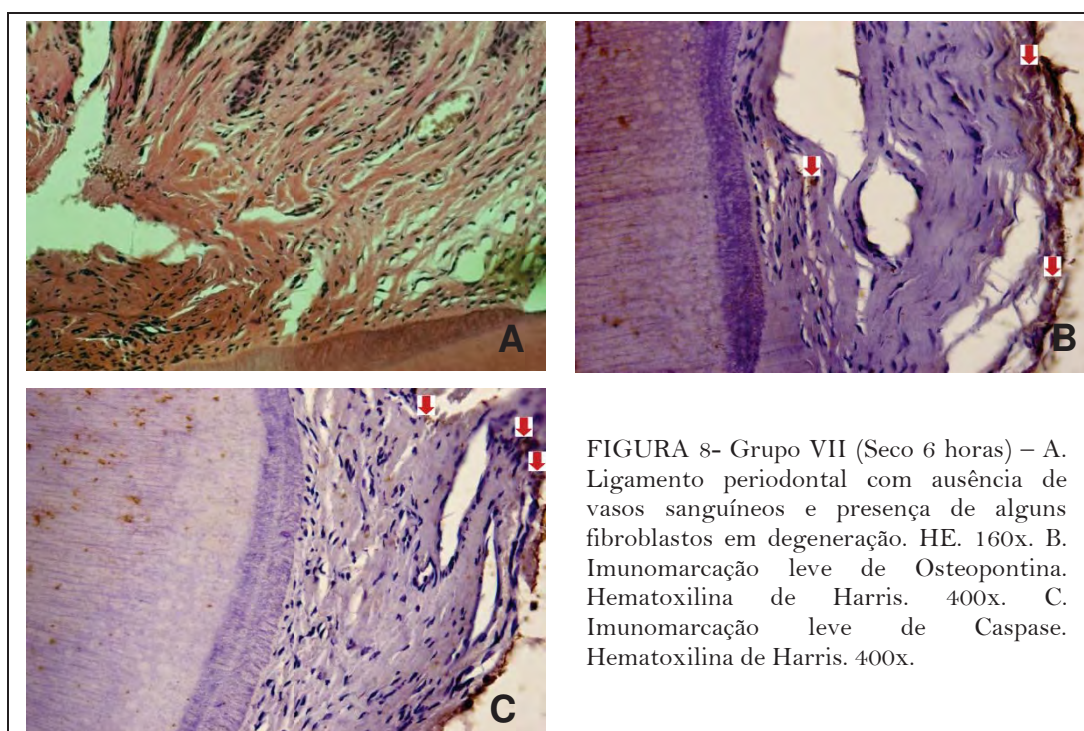
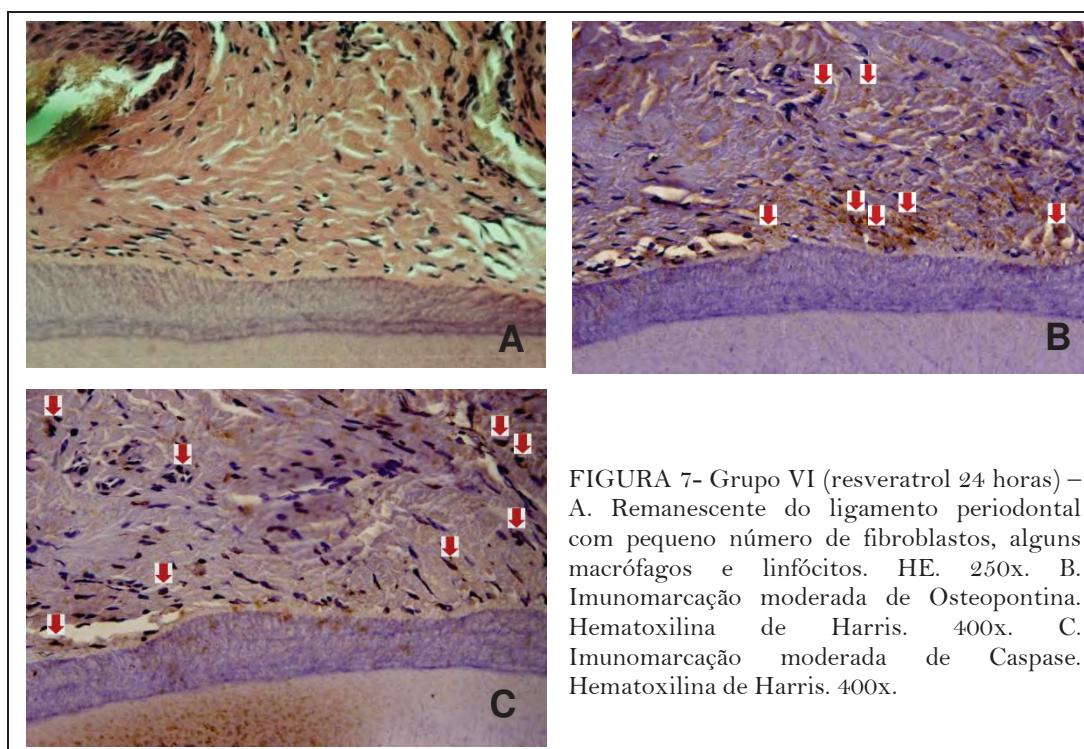
Tabela 1 – Imunomarcaco (escores) de osteopontina e caspase em todos os grupos.

	Imediato	Resv 1 h	Resv 2 h	Resv 6 h	Resv 12 h	Resv 24 h	Seco 6 h
OPN	moderada	leve	leve	leve	moderada	moderada	leve
Caspase	-	moderada	moderada	intensa	-	moderada	leve

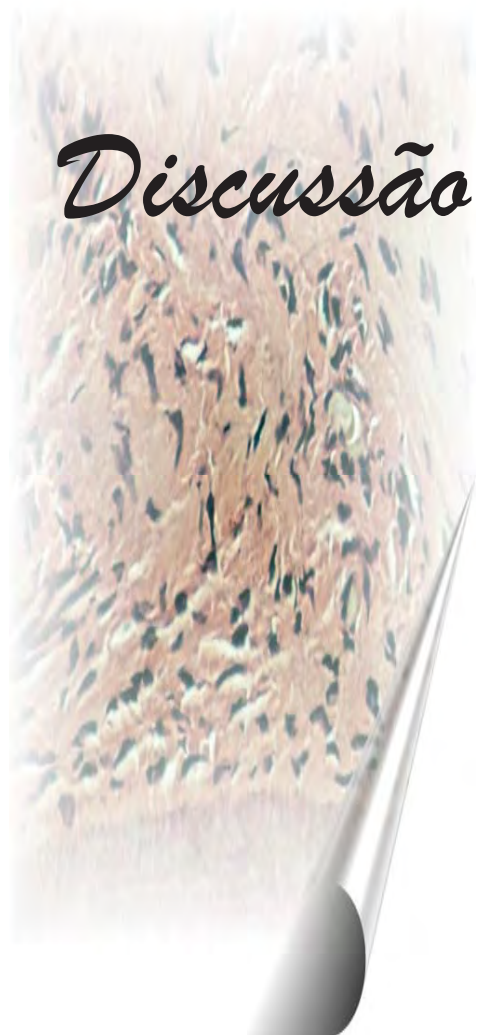








Discussão



5 Discussão

O reimplante dentário exige atenção especial com relação às suas principais complicações, as reabsorções radiculares (17,46-48). Durante a avulsão, o rompimento das fibras do ligamento periodontal não pode ser evitado. No entanto, as complicações adicionais durante o tempo em que o dente encontra-se fora do alvéolo podem ser evitadas ou minimizadas (47) pelo reimplante imediato (49,50) ou pela manutenção em meios de conservação adequados, tais como solução salina balanceada de Hank, Viaspan®, Eurocollins, leite, soro fisiológico e saliva (17,46,47).

O resveratrol tem a capacidade de prolongar o tempo de vida das células. A redução do suprimento alimentar (restrição calórica) aumenta a expectativa de vida de um grande número de espécies desde as leveduras até os mamíferos (51). Quando as leveduras sofrem restrição calórica, dispositivos de estresse são ativados e as células são forçadas a encontrar energia em substratos alternativos. Isso produz alteração no consumo de oxigênio, que por sua vez afeta os padrões de oxidação e redução do DNA

que estimula a atividade da SIR2 (*silent information regulator 2*), que codifica uma enzima, a histona desacetilase dependente de NAD⁺.

O Resveratrol ativa diretamente a SIR2 e gera benefícios similares àqueles encontrados diante da restrição alimentar (52). Tais caminhos podem existir também em organismos superiores, pois em mamíferos há sete genes de sirtuínas, sendo que a SIRT1 é a mais parecida com SIR2. A concentração ideal para a ativação da proteína recombinante SIR2 varia de 2 a 5µM (22,53). Em virtude disso, foi utilizada solução de resveratrol em propilenoglicol 5µM, sendo que tal solvente foi escolhido devido às suas propriedades já conhecidas em Odontologia.

Apesar de não estar bem conhecido o mecanismo pelo qual as sirtuínas participam do envelhecimento nos mamíferos, recente investigação indica que parece agir como regulador da programação de morte e maturação celular (apoptose e diferenciação, respectivamente, 54).

No presente estudo, o quadro histológico encontrado nos grupos imediato e resveratrol 12 horas demonstra a presença de moderado número de fibroblastos, alguns macrófagos e linfócitos. Em contrapartida, nos grupos resveratrol 1, 2, 6 e 24 horas observou-se pequeno número de fibroblastos e discreta vascularização.

O grupo seco 6 horas se caracterizou pela ausência de vasos sanguíneos e fibroblastos em degeneração. Já no grupo resveratrol 6 horas observou-se moderado número de fibroblastos e discreta vascularização.

Comparando o grupo Imediato com o resveratrol 12 horas é possível verificar que ambos apresentaram moderado número de fibroblastos. Esses resultados sugerem certo grau de eficiência do resveratrol quanto à manutenção da vitalidade do ligamento periodontal até o período de 12 horas.

Essa situação pode ser verificada também na análise imunoistoquímica. O grupo Imediato se caracterizou pela imunomarcção intensa de osteopontina e de leve a ausente de caspase. Essa resposta é esperada, visto que a osteopontina está envolvida nos processos de proliferação celular (vitalidade) e a caspase está relacionada a apoptose (ausência de vitalidade).

Diante disso, se o material não tivesse capacidade de manter a vitalidade das células, a imunomarcção de osteopontina deveria diminuir gradativamente nos grupos resveratrol, 1, 2, 6, 12 e 24 horas, assim como no grupo seco. Já a imunomarcção de caspase deveria aumentar a partir do grupo imediato.

No entanto, essa condição não foi observada. O grupo resveratrol 12 horas se mostrou semelhante ao imediato. Talvez o material tenha um período de latência, um intervalo de tempo entre o estímulo e a reação associada a ele.

Resultado semelhante já foi relatado quando do uso da própolis, ou seja, a manutenção por 6 horas foi melhor do que 60 minutos.

Segundo os autores esse fato pode ser explicado em razão da maior incorporação dos princípios ativos responsáveis pela ação antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante no período de 6 horas (55).

Essas perguntas não poderiam ser respondidas com a metodologia aqui empregada, pois este estudo traz algumas limitações. É possível determinar, pelo aspecto morfológico, que os fibroblastos do ligamento periodontal apresentam vitalidade, mas não é possível afirmar que as células sejam capazes de se proliferar. Entretanto, trata-se do primeiro ensaio diante do ineditismo do assunto.

A despeito da diferença de metodologia, é possível fazer alguma inferência, comparando os resultados aqui obtidos com aqueles de trabalhos que estudaram as propriedades favoráveis de outros meios de conservação.

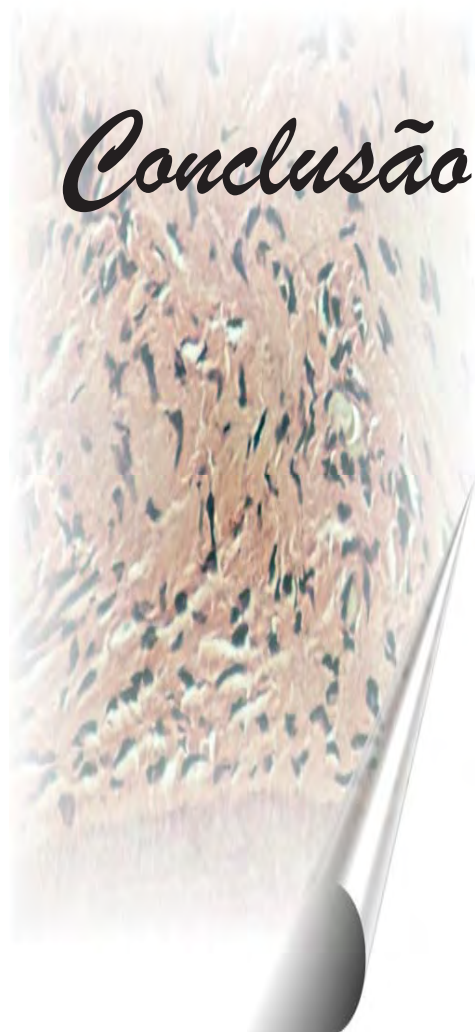
O leite tem sido recomendado pela maioria dos pesquisadores (4,9,10,21,56,57). A sua eficácia está relacionada à osmolaridade, à presença de substâncias nutritivas, fatores de crescimento, e ao baixo conteúdo bacteriano (9). A manutenção do dente avulsionado em leite não deve ser superior a 6 horas (9,57), considerando que após esse período sua eficácia diminui substancialmente (10).

O Viaspan® e a solução salina balanceada de Hank possuem capacidade de proporcionar a preservação da vitalidade das células por longos períodos de tempo (15).

Por sua vez, os resultados obtidos com o resveratrol podem ser explicados pelas suas propriedades antiinflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antiplaquetária, além de efeitos antiproliferativos (26,28,29).

Deve ser enfatizada a importância da realização de outros trabalhos utilizando métodos mais aprimorados de detecção de vitalidade celular, abrindo perspectiva para novas pesquisas.

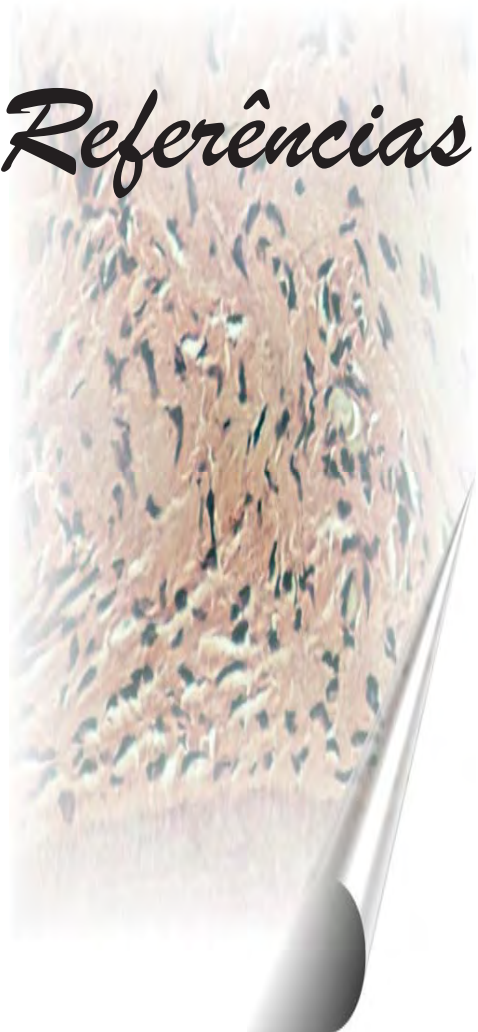
Conclusão



6 Conclusão

A pós a análise dos resultados, foi possível concluir que o resveratrol parece ser um bom meio de conservação da vitalidade das células do ligamento periodontal até o tempo de 12 horas.

Referências



7 Referências

1. Andreasen JO, Andreasen FM. Avulsões. In: Andreasen, JO, Andreasen FM. Texto e atlas colorido de traumatismo dental. Porto Alegre: Artmed; 2001. p.383-425.
2. Patil S, Dumsha TC, Sydiskis RJ. Determining periodontal ligament (PDL) cell vitality from exarticulated teeth stored in saline or milk using fluorescein diacetate. *Int Endod J* 1994;27:1-5.
3. Andreasen JO. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisor in monkey. *Int J Oral Surg* 1981;10:43-53.
4. Blomlöf L, Andersson L, Lindskog S, Hedstrom KG, Hammarström L. Periodontal healing of replanted monkey teeth prevent from drying. *Acta Odontol Scand* 1983;41:117-123.
5. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:76-89.
6. Poi WR, Salineiro SL, Miziara FV, Miziara EV. A educação como forma de favorecer o prognóstico do reimplante dental. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 1999;53:474-479.

7. Panzarini SR, Saad Neto M, Sonoda CK, Poi WR, Carvalho ACP. Avulsões dentárias em pacientes jovens e adultos na região de Araçatuba. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 2003;57:27-31.
8. Olson BD, Mailhot JM, Anderson RW, Schuster GS, Weller RN, Comparison of various transport media on human periodontal ligament cell viability. *J Endod* 1997;23:676-679.
9. Marino TG, West LA, Liewehr FR, Mailhot JM, Buxton TB, Runner RR, et al. Determination of periodontal ligament cell viability in long shelf-life milk. *J Endod* 2000;26:699-702.
10. Pearson RM, Liewehr FR, West LA, Patton WR, McPherson JC, Runner RR. Human periodontal ligament cell viability in milk and milk substitutes. *J Endod* 2003;29:184-186.
11. Ashkenazi M, Sarnat H, Keila S. In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media. *Endod Dent Traumatol* 1999;15:149-156.
12. Lekic PC, Kenny DJ, Barret EJ. The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. *Int Endod J* 1998;31:137-140.
13. Blomlöf L, Otteskog P. Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1980;88:436-440.
14. Hiltz J, Trope M. Vitality of human lip fibroblast in milk, Hanks

- balanced salt solution and Viaspan storage media. *Endod Dent Traumatol* 1991;7:69-72.
15. Trope M, Friedman S. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hank's balanced salt solution. *Endod Dent Traumatol* 1992;8:183-188.
 16. Martin MP, Pileggi R. A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. *Dent Traumatol* 2004;20:85-89.
 17. Sottovia AD, Sottovia Filho D, Poi WR, Panzarini SR, Luize DS, Sonoda CK. Tooth replantation after use of Euro-Collins solution or bovine milk as storage medium: a histomorphometric analysis in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:111-19.
 18. Blomlöf L, Lindskog S, Hammarström L. Periodontal healing of exarticulated monkey teeth stored in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1981;89:251-259.
 19. Cvek M, Granath LE, Hollender L. Treatment of non vital permanent incisors with calcium hydroxide 3. Variation of occurrence of ankylosis of reimplanted teeth with duration of extra-alveolar period and storage environment. *Odontol Revy* 1974;25:43-56.
 20. Blomlöf L. Storage of human periodontal ligament cells in a combination of different media. *J Dent Res* 1981;60:1904-1906.

21. Blomlöf L, Lindskog S, Andersson L, Hedstrom KG, Hammarström L. Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to reimplantation. *J Dent Res* 1983;62:912-916.
22. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003;425:191-196.
23. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004;16:390-392.
24. Lamming DW, Wood JG, Sinclair DA. Small molecules that regulate lifespan: evidence for xenohormesis. *Mol Microbiol* 2004;53:1003-1009.
25. Sinclair DA. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev* 2005;126:987-1002.
26. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:493-506.
27. Dawn B. Resveratrol: Ready for prime time? *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:484-486.
28. Bhat KPL, Kosmeder II JW, Pezzuto JM. Biological effects of resveratrol. *Antiox Redox Signal* 2001;3:1041-1064.
29. Alarcón de la Lastra C, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem*

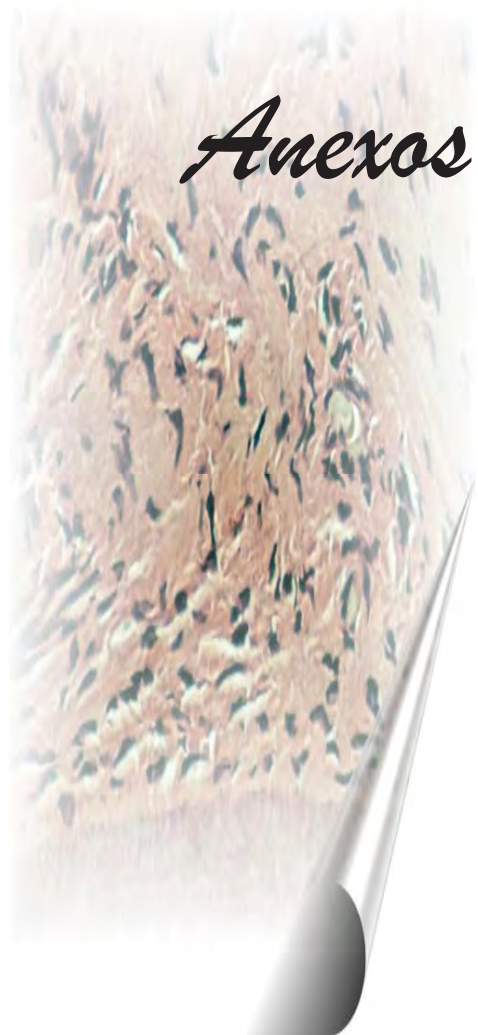
- Soc Trans 2007;35:1156-1160.
30. Ferguson LR. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res* 2001;475: 89–111.
 31. Middleton EJr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000;52: 673–751.
 32. Jang M, Cai L, Udeani OG, Slowing KV, Thomas CF, Beecher C, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997;275:218–220.
 33. Vidavalur R, Otani H, Singal PK, Maulik N. Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Exp Clin Cardiol* 2006;11:217-225.
 34. Ray PS, Maulik G, Cordis GA, Bertelli A, Das DK. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1999;27:160-169.
 35. Sato M, Maulik N, Das DK. Cardioprotection with alcohol: role of both alcohol and polyphenolic antioxidants. *Ann N Y Acad Sci* 2002;957:122-135.
 36. Kaga S, Zhan L, Matsumoto M, Maulik N. Resveratrol enhances neovascularization in the infarcted rat myocardium through the induction of thioredoxin-1, heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:813-822.

37. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 2004;430:686–689.
38. Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 2000;289:2126–2128.
39. Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 1999;13:2570–2580.
40. Bauer JH, Goupil S, Garber GB, Helfand SL. An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proc Nat Acad Sci* 2004;101:12980–12985.
41. Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellierino A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current Biology* 2006;16:296–300.
42. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006;444:337–342.
43. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:279–303.

44. Terashima Y, Shimabukuro Y, Terashima H, Ozasa M, Terakura M, et al. Fibroblast growth factor-2 regulates expression of osteopontin in periodontal ligament cells J. Cell Physiol 2008;216:640-650.
45. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death Differ 1999;6:1028-42.
46. Flores MT, Andersson L, Andreasen JO, Bakland LK, Malmgren B, et al. Guidelines for the management of traumatic dental injuries. II. Avulsion of Permanent Teeth. Dent Traumatol 2007;23:130-6.
47. Trope M. Clinical management of the avulsed tooth: present strategies and future directions. Dent Traumatol 2002; 18:1-11.
48. Sato K, Muramatsu T, Tsuchiya Y, Masaoka T, Enokiya Y, et al. Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation. Oral Diseases 2010;16:263-268.
49. Hammarström L, Blomlöf L, Lindskog S. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. Endod Dent Traumatol 1989; 5(4):163-75.
50. Lam K, Sae-Lim V. The effect of Emdogain gel on periodontal healing in replanted monkeys' teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004; 97(1):100-7.
51. Koubova J, Guarente L. How does calorie restriction work? Genes

- Dev 2003;17: 313–321.
52. Finkel T. Ageing: A toast to long life. *Nature* 2003;425:132–133.
 53. Allard JS, Perez E, Zou S, Cabo R. Dietary Activators of Sirt1. *Mol Cell Endocrinol* 2009;299:58–63.
 54. Denu JM. Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD(+)-dependent deacetylases. *Trends Biochem Sci* 2003;28:41–48.
 55. Mori GG, Nunes DC, Castilho LR, de Moraes IG, Poi WR. Propolis as storage media for avulsed teeth: microscopic and morphometric analysis in rats. *Dent Traumatol* 2010;26:80–85.
 56. Lindskog S, Blomlöf L, Hammarström L. Mitoses and microorganisms in the periodontal membrane after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1983;91:465–72.
 57. Lindskog S, Blomlöf L. Influence of osmolality and composition of some storage media on human periodontal ligament cells. *Acta Odontol Scand* 1982;40:435–41.

Anexos



ANEXO A - Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa - FOA –UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEAA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"MANUTENÇÃO DA VITALIDADE DO LIGAMENTO PERIDONTAL CEMENTÁRIO E DA POLPA DE DENTES DE MACACO ARMAZENADOS EM RESVERATROL"** sob responsabilidade do **Prof. Adj. Wilson Roberto Poi e colaboração de Elizane Ferreira Hamanaka, Roberta Okamoto, Sônia Regina Panzarini, Celso Koogi** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 23/04/2009 de acordo com o protocolo 2009-002980.

Araçatuba, 23 de Abril de 2009

Prof.ª Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva

Presidente da CEEA- FOA/UNESP

ANEXO B – Ilustração da Fase Experimental



FIGURA 9- Adaptação de cânula para abertura bucal.



FIGURA 13- Incisivos superiores.

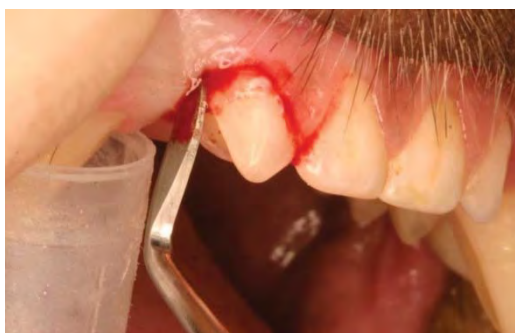


FIGURA 10- Síndesmotomia.



FIGURA 14- Luxação.



FIGURA 11- Extração dentária.



FIGURA 15- Dente extraído.



FIGURA 12- Frasco com solução de Resveratrol.



FIGURA 16- Dente extraído mantido em solução de Resveratrol.